

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

Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler

Polymorphismen im Toll-Like-Rezeptor 9 Gen bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen

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

vorgelegt von

Johanna Ruth Herzog, geb. Konnerth

aus

München

Jahr

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Folwaczny

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Stephan Brand, Priv. Doz. Dr. Ellen Renner

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung	2
1.2 Allgemeines zu Geschichte und Epidemiologie der chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	2
1.2.1 Kurzer historischer Abriss	2
1.2.2 Allgemeine Epidemiologie der chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	3
1.2.3 Morbus Crohn	3
1.2.4 Colitis ulcerosa	5
1.2.5 Extraintestinale Manifestationen der chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	6
1.2.6 Therapeutische Ansätze	7
1.2.6.1 Vorgehensweise und Therapieziel	7
1.2.6.2 Medikamentöse Therapie	7
1.2.6.3 Chirurgische Therapie	8
1.2.6.4 Nutritive Therapie	9
1.3 Ätiologie und Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	10
1.3.1 Umweltfaktoren	10
1.3.2 Das Krankheitsgeschehen in der Mukosa und die Rolle des intestinalen Immunsystems	12
1.3.2.1 Das intestinale Immunsystem	14
1.3.2.2 Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei MC vs CU	14
1.3.2.3 Autoimmunität bei chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	16
1.3.2.4 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen als überschießende Immunantwort gegenüber nicht pathogenen luminalen Antigenen	17
1.3.2.5 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen als Barriestörung	18
1.3.2.6 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen als Infektionskrankheiten	18
1.3.2 Der Einfluss genetischer Faktoren	19
1.3.2.1 Genetische Epidemiologie	19
1.3.2.2 Ansätze zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	20
1.3.2.3 Gene der angeborenen Immunantwort	22
1.3.2.3.1 <i>NOD2</i>	22
1.3.2.3.2 <i>ATG16L1</i>	24
1.3.2.3.3 <i>TLR4</i>	24
1.3.2.3.4 <i>HBD-2</i> , <i>HBD-3</i> und <i>HBD-4</i>	25
1.3.2.3.5 <i>TNFSF15</i>	25
1.3.2.4 Gene der adaptiven Immunantwort	25
1.3.2.4.1 <i>MHC</i>	26
1.3.2.4.2 <i>IL-23R</i>	26
1.3.2.5 Weitere Gene	27
1.3.2.5.1 IBD5 Lokus	27
1.3.2.5.2 <i>DLG5</i>	27
1.3.2.5.3 <i>ABCB1</i>	28
1.4 TLR9	28
1.4.1 Toll-like-Rezeptoren	28
1.4.2 TLR9	31
1.4.3 Die Bedeutung von <i>TLR9</i> -Polymorphismen für verschiedene Erkrankungen	35
1.4.4 Mögliche Bedeutung von TLR9 in der Pathogenese der CED	36
1.4.4.1 Gestörte Barrierefunktion	36
1.4.4.2 Verminderte Sekretion von Defensinen	36
1.4.4.3 Fehlende antiinflammatorische Effekte	37
1.4.4.4 Verlust der Polarität	37
2. Zielsetzung der Arbeit	39
3. Material und Methoden	40
3.1 Material	40
3.1.1 Studienpopulation	40
3.1.1.1 Patientenkollektiv	40
3.1.1.2 Kontrollkollektiv	40
3.1.2 Chemikalien und Enzyme	41
3.1.3 Geräte	43
3.2 Methoden	44
3.2.1 Allgemeine Vorgehensweise	44
3.2.2 Arbeiten mit DNA	44
3.2.2.1 Isolation von DNA	44

3.2.2.2 PCR	44
3.2.2.2.1 Reaktionsansätze der PCR	45
3.2.2.2.2 Bedingungen der PCR	45
3.2.2.3 Purifizierung von DNA	46
3.2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration	46
3.2.2.5 Sequenzierung von DNA	47
3.2.3 RT-PCR zur Genotypisierung	47
3.2.3.1 Reaktionsansätze der RT-PCR	48
3.2.3.2 Bedingungen der RT-PCR	48
3.2.4 Statistische Auswertung	49
3.2.4.1 Studiendesign	49
3.2.4.2 Chi-Quadrat (χ^2)-Test	50
3.2.4.3 Fisher-Exakt-Test	51
3.2.4.4 Berechnung der Allelfrequenzen	51
3.2.4.5 Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	51
3.2.4.6 Berechnung von genetischen Interaktionen und Assoziationen mit klinischen Charakteristika	52
3.2.4.7 Software	52
4. Ergebnisse	53
4.1 Ergebnisse der Genotypisierung	53
4.1.1 Polymorphismen im Promotor des <i>TLR9</i> -Gens	53
4.1.1.1 Der Polymorphismus <i>TLR9</i> -1923 A/C	53
4.1.1.2 Der Polymorphismus <i>TLR9</i> -1486 C/T	55
4.1.2 Der Polymorphismus 1174 A/G im Intron 1 des <i>TLR9</i> -Gens	56
4.2 Verteilung der <i>TLR9</i> -Genotypen in den klinischen Subgruppen beim Morbus Crohn	58
4.3 Verteilung der <i>TLR9</i> -Genotypen in den klinischen Subgruppen bei der Colitis ulcerosa	59
4.4 Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Genen	61
4.4.1 Interaktionen zwischen den untersuchten Polymorphismen und Mutationen im <i>NOD2</i> -Gen bei Patienten mit Morbus Crohn	63
4.4.2 Interaktionen zwischen den untersuchten Polymorphismen und Polymorphismen im <i>IL23R</i> -Gen	64
4.4.3 Interaktionen zwischen den untersuchten Polymorphismen und Polymorphismen im <i>IBD5</i> -Lokus	65
5. Diskussion	66
5.1 Studiendesign und Methoden	66
5.1.1 Studiendesign bei genetischen Assoziationsstudien	66
5.1.2 Validität der verwendeten Genotypisierungsmethoden	67
5.2 Bewertung der Ergebnisse	68
5.2.1 Vergleich der Frequenzen der untersuchten <i>TLR9</i> -Polymorphismen in der Kontrollpopulation mit Daten aus der Literatur	68
5.2.1.1 Der Polymorphismus -1923 A/C	69
5.2.1.2 Der Polymorphismus -1486 C/T	69
5.2.1.3 Der Polymorphismus 1174 A/G	70
5.2.2 Bewertung der Verteilung der untersuchten <i>TLR9</i> -Polymorphismen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	71
5.2.2.1 Der Polymorphismus -1923 A/C	71
5.2.2.2 Der Polymorphismus -1486 C/T	71
5.2.2.3 Der Polymorphismus 1174 A/G	72
5.2.3 Bewertung der Assoziationen mit klinischen Subtypen	73
5.2.4 Bewertung der Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Genen	74
5.2.4.1 Interaktionen zwischen den Polymorphismen im <i>TLR9</i> -Gen und Mutationen im <i>NOD2</i> -Gen beim Morbus Crohn	74
5.2.4.2 Interaktionen mit weiteren krankheitsassoziierten Polymorphismen	75
6. Zusammenfassung	77
7. Literaturverzeichnis	79
8. Abbildungsverzeichnis	88
9. Tabellenverzeichnis	88
10. Abkürzungsverzeichnis	89
11. Danksagung	90
12. Lebenslauf	91

1. Einleitung

1.1 Einführung

In den letzten zehn Jahren wurden zahlreiche Suszeptibilitätsgene für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) identifiziert. Dies gelang mittels genomweiter Kopplungsanalysen, ausgehend von epidemiologischen Beobachtungen in Zwillings- und Familienstudien, und hat zu einem vertieften Verständnis der molekularen Grundlagen der CED geführt. Seit der bahnbrechenden Entdeckung von *NOD2* als Suszeptibilitätsgen für Morbus Crohn (MC) im IBD1-Lokus auf Chromosom 16 ist die angeborene Immunantwort ins Zentrum der CED-Forschung gerückt. Dabei richtet sich das Interesse besonders auf Zytokine, Rezeptoren und andere Moleküle, die in der Regulation der angeborenen Immunantwort von Bedeutung sind. Dazu gehören auch die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Assoziationen verschiedener Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) im Toll-like Receptor 9 (*TLR9*) Gen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Im Folgenden soll zunächst ein knapper Überblick über die Epidemiologie, Pathogenese, Klinik und Therapie der CED gegeben werden. Außerdem wird auf die derzeitigen Vorstellungen zur Ätiologie dieser Krankheitsbilder in Kürze eingegangen, und bereits bekannte genetische Assoziationen beschrieben.

1.2 Allgemeines zu Geschichte und Epidemiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Bei den unter dem Begriff "Chronisch entzündliche Darmerkrankungen" zusammengefassten Krankheitsbildern handelt es sich nach derzeitigem Verständnis um eine anhaltende, überschießende Aktivität des mukosalen Immunsystems, die sich auf dem Boden einer genetischen Prädisposition unter dem Einfluss bestimmter Umweltfaktoren, v.a. der eigenen Darmflora, entwickelt. Zwar ist die Mortalität der CED relativ gering, d.h. die Lebenserwartung eines CED-Patienten ist kaum vermindert, aufgrund des oft lebenslangen Verlaufs und der für den Patienten häufig sehr belastenden Auswirkungen der Erkrankung im Alltag ist jedoch eine multimodale, durch ein Team kooperierender Spezialisten überwachte Diagnostik und Therapie dringend notwendig. Auch die optimale Abstimmung des Behandlungskonzeptes auf den individuellen Patienten spielt eine entscheidende Rolle. Diesbezüglich konnte die Forschung in den letzten Jahren zeigen, dass sich nicht nur aus Faktoren wie Alter und Allgemeinzustand des Patienten, Krankheitstyp, Ausprägung oder Befallsmuster, sondern auch aufgrund genetischer Merkmale, speziell einzelner SNPs, wertvolle Hinweise auf den Krankheitsverlauf ergeben könnten. Die Kenntnis von verschiedenen SNPs und ihren Auswirkungen wird in Zukunft vermutlich nicht nur für die Pharmakogenetik eine Rolle spielen. SNPs könnten auch therapeutische Konsequenzen haben, wenn zugrundeliegende Pathomechanismen, die sich aus speziellen Genotypen ergeben, bekannt wären {Ferguson, 2007; Peppercorn, 2007a; Peppercorn, 2007b}.

Als CED werden verschiedene Krankheitsentitäten zusammengefasst, deren Gemeinsamkeit eine idiopathische, chronische oder chronisch-intermittierende hohe

Immunaktivität und Inflammation innerhalb des Gastrointestinaltraktes darstellt. Die beiden wichtigsten Erkrankungen stellen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) dar. Zwar handelt es sich bei MC und CU um eigenständige Krankheitsbilder, die sich in zahlreichen Aspekten deutlich unterscheiden, in 10-15% der Fälle ist eine eindeutige Zuordnung zu einem der beiden Krankheitsbilder jedoch nicht möglich, weshalb der Begriff "nicht klassifizierbare Kolitis" (auch "Inflammatory Bowel Disease Unclassified" (IBDU)) geprägt wurde. Das teilweise vertretene Verständnis von CU und MC als entgegengesetzte Enden eines Krankheitsspektrums bietet eine gute Erklärung für die teilweise uneindeutige Präsentation {Hanauer, 2006}. Bei manchen Patienten wird die genauere Charakterisierung im Verlauf der Erkrankung möglich, sie bewegen sich sozusagen in eine der beiden Richtungen, bei anderen jedoch bleibt das Bild heterogen. Bei bis zu 10% aller Patienten muss die Zuordnung innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung korrigiert werden. Auch die Frage, ob bei einem Patienten parallel beide Krankheitstypen koexistieren können, ist bislang nicht eindeutig geklärt {Sands, 2002}.

1.2.1 Kurzer historischer Abriss

Die Entität einer chronischen Entzündung des Magen-Darm-Trakts unbekannter Ursache findet sich schon in der antiken medizinischen Literatur. So lieferte Aretaeus von Cappadocia (ca. AD 300) eine eindrucksvolle klinische Beschreibung der CU, allerdings ohne dass eine post-mortem Obduktionen durchgeführt worden wäre. Erst im 18. Jahrhundert wird die Krankheit dann wieder mit erweitertem wissenschaftlichen Anspruch dokumentiert, hier sollen nur einige als Meilensteine betrachtete Beispiele erwähnt werden: 1769 verfasste Giovanni Battista Morgagni den Autopsiebericht eines 20-jährigen Mannes, der Zeit seines Lebens an Diarrhö gelitten hatte, und schließlich nach einer fieberhaften Episode mit blutigen Stühlen und massiven, krampfartigen abdominalen Schmerzen verstorben war. Seine detaillierte Schilderung des pathologischen Befundes gilt als erster, eindeutig dokumentierter Fall von Crohn's Disease {Morgagni, 1960}. 1813 stellten C. Combe und W. Saunders in London einen Fall von MC des Ileums vor. 1828 konnte John Abercrombie in Edinburgh 144 Fälle chronisch-entzündlicher Darmerkrankung dokumentieren, in denen sich ilealer Befall von auf das Kolon beschränkter Entzündung unterscheiden ließ, d.h. er untersuchte vermutlich sowohl Fälle von MC als auch von CU {Abercrombie, 1828}. Der erste eindeutig dokumentierte Patient mit CU wurde von Sir Samuel Wilks 1859 in London beschrieben. Es tauchten in der medizinischen Literatur also schon lange Schilderungen von MC auf, ehe Burill Bernard Crohn, Leon Ginzburg und Gordon B. Oppenheimer im Oktober 1932 Ort ihr klassisches Paper "Ileitis terminalis" im *Journal of the American Medical Association* veröffentlichten. Sie beschrieben darin 14 Fälle von Ileitis terminalis bei jungen Erwachsenen, die im Mount Sinai Hospital in New York operiert worden waren. Sowohl die Veröffentlichung, als auch die vorausgehende Vorstellung des Materials auf dem jährlichen Kongress der *American Medical Society* stieß auf großes Interesse in der Fachwelt. Verschiedene namhafte Gastroenterologen und Chirurgen, darunter J.A. Bagen von der Mayo Clinic, Louis J. Hirschman aus Detroit und Julius Friedenwald aus Baltimore kommentierten, ähnliche Fälle gesehen und behandelt zu haben, oder trugen zur Spezifizierung des Krankheitsbildes bei {Crohn, 2000}. Unabhängig von Crohn hatte auch der polnische Chirurg Antoni Lesniowski 1904 eine Beschreibung der später als Crohn's Disease bezeichneten Erkrankung

verfasst. Die Unterscheidung zwischen CU und MC auf makroskopischer Ebene wurde erst 20 Jahre nach Crohns Veröffentlichung vorgenommen, und 1960 von Hugh Lockhart-Mummery und B.C. Morson vervollständigt, die eine genaue Charakterisierung des den beiden CED zugrundeliegenden Entzündungsprozesses lieferten {Lockhart-Mummery, 1960}{Übersicht in: Aufses, 2001, Moum, 2002}.

1.2.2 Allgemeine Epidemiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Einige epidemiologische Charakteristika gelten gleichermaßen für MC und CU und sollen hier aufgezeigt werden. Die genauen Prävalenzen, Inzidenzen und deren Entwicklung werden in den jeweiligen Unterpunkten zu den beiden Erkrankungen detaillierter ausgeführt. Für die CED finden sich die höchsten Zahlen in Skandinavien, UK und Nordamerika, die geringsten Inzidenzen sind in Entwicklungsländern zu beobachten. Eine grobe geographische Nord-Süd-Verteilung, die sich auch am wirtschaftlichen Gefälle orientiert, scheint trotz Unterschieden in medizinischer Versorgung, diagnostischen Möglichkeiten, wie auch in den Definitionen der einzelnen Krankheitsbildern unbestreitbar und lässt sich auf beide Krankheitsentitäten anwenden. Ein Ost-West-Gefälle ist ebenfalls festzustellen, allerdings weniger ausgeprägt und vermutlich eher auf kulturelle Unterschiede in Lebensweise und Ernährung zurückzuführen. Verschiedene Tendenzen werden im zeitlichen Verlauf deutlich. Die beobachteten Unterschiede zwischen der kaukasischen Bevölkerungsgruppe und den Afro-Amerikanern in den Vereinigten Staaten scheinen sich anzugleichen, die zu den Latein-Amerikanern und Asiaten hingegen weiter zu bestehen. Allerdings gleichen sich auch die Inzidenzen in diesen Gruppen bei Einwanderern in wirtschaftlich weiter entwickelte Länder in der zweiten Generation zunehmend an. Migrationsstudien betonen einen deutlichen Einfluss der geographischen Ansiedelung sowie weiterer Umweltfaktoren auf die Inzidenz- und Prävalenzraten der beiden Krankheitsentitäten. Beide Erkrankungen scheinen durch einen hohen sozioökonomischen Status eher gefördert zu werden. Ebenfalls gemeinsam ist den CED die zweigipflige Altersverteilung: abgesehen von den c.a. 10% mit einem Manifestationsalter unter 18, manifestieren sie sich vor allem zwischen 20 und 40 Jahren. Der zweite, kleinere Erkrankungsgipfel liegt zwischen 50 und 70 {Übersicht in: Hanauer, 2006; Jewell, 2002; Karlinger, 2000; Loftus, 2002; Nikolaus, 2007; Peppercorn, 2007c; Sands, 2002}.

1.2.3 Morbus Crohn (MC)

Die Erhebung epidemiologischer Daten für MC wird durch einige Faktoren erschwert, die dazu führen, dass vermutlich nur ein Bruchteil der tatsächlichen Fälle erfasst wird. Dazu gehören der fehlende Gold-Standard zur Diagnosestellung ebenso wie die teilweise invasiven und sehr kostenintensiven diagnostischen Modalitäten, die nicht überall und nicht für alle Bevölkerungsschichten gleichermaßen zugänglich sind. Dadurch, dass viele Studien auf den Zahlen von großen Behandlungszentren basieren, an die vor allem schwerere Fälle der Erkrankung überwiesen werden, kommt es zu einem Bias in Richtung der aggressiveren Verlaufsformen und gleichzeitig zur Unterschätzung der Inzidenz milderer Erkrankungsfälle. In den

westlichen Industriestaaten liegt die Inzidenz von MC im Mittel etwa bei 7, die Prävalenz bei etwa 150. In Europa schwanken die Zahlen zwischen 3,6 (Italien) und 10 (Norwegen), in den USA zwischen 3,6 (Süden) und 8,8 (Norden). In Japan liegt die Inzidenz bei nur 0,08-0,5, in Australien und Neuseeland bei 1,75-2,1 und in Südamerika und Südafrika sind Fälle von CED extrem selten. Die Zahl der Neuerkrankungen begann Mitte der 50er Jahre deutlich anzusteigen, dies dauerte bis in die späten 70er Jahre an. Dabei scheint es sich um eine tatsächliche Zunahme der Inzidenz und nicht nur um verbesserte Diagnostik gehandelt zu haben, da in diesem Zeitraum auch die Anzahl der Todesfälle durch MC deutlich anstieg. Um 1980 kam es zu einer zunehmenden Stabilisierung in Nordeuropa und Nordamerika. Vor allem in den Entwicklungsländern der Südhalbkugel, wie auch im asiatischen Raum kann nach wie vor eine Zunahme beobachtet werden, die primär auf Veränderungen in Ernährung und Lebensweise zurückgeführt wird. Beide Geschlechter sind nahezu gleich häufig betroffen. In manchen Studien ist der Anteil an Frauen jedoch höher, wobei unklar ist, ob hormonelle Faktoren dafür verantwortlich sind. Meist erkranken junge Erwachsene zwischen dem 16. und 35. Lebensjahr, ein zweiter Erkrankungsgipfel findet sich in der 7. Dekade. Während die Gruppe der jüngeren Patienten dabei häufiger ilealen Befall aufweist und aus Familien mit mehreren Erkrankten stammt, wird angenommen, dass bei Patienten mit hohem Manifestationsalter, bei denen öfter eine Kolonbeteiligung auftritt, weniger genetische als Umweltfaktoren entscheidend sind {Übersicht in: Sands, 2002}.

Die Diagnose Morbus Crohn kann weder aufgrund eines einzigen diagnostischen Test noch allein aufgrund der klinischen Präsentation gestellt werden. Stattdessen muss ein entsprechender Verdacht, basierend auf einer umfassenden Anamnese, mittels radiologischer, endoskopischer und zumeist auch histopathologischer Befunde bestätigt werden. Laborbefunde können zur Identifizierung möglicher Mangelzustände und zur Verlaufsbeobachtung mit herangezogen werden. Zur Differenzierung zwischen MC und CU bei unklaren Fällen werden teilweise auch Autoantikörper (pANCA und ASCA) bestimmt, wobei ASCAs eher bei MC und pANCA eher bei der CU vorkommen. Die Autoantikörper sind sehr spezifisch, jedoch wenig sensitiv, weswegen diese Untersuchungen nur als zusätzliche Hinweise betrachtet werden können, um unklare Fälle einzuordnen {Desplat-Jego, 2007; Peppercorn, 2007a; Sands, 2002}.

Nach erfolgreicher Diagnosestellung erlaubt die Vienna-Klassifikation von 1998 eine systematische Einteilung nach zahlreichen Merkmalen, wie Lokalisation, Verlauf, Erstmanifestationsalter, Geschlecht, ethnischer Herkunft und Familienanamnese {Gasche, 2000}. Das klassische Befallsmuster des MC schließt den ileozökalen Übergang mit Befall des Zökum und des Ileum ein. Typisch ist das diskontinuierliche Verteilungsmuster der Entzündung, d.h. zwischen befallenen Segmenten finden sich immer wieder Bereiche gesunder Schleimhaut. Prinzipiell kommt beim MC jegliche Lokalisation, bereits mit dem orofazialen Bereich beginnend, bis zum Anus hin vor. Immerhin 80% der Patienten weisen einen Dünndarmbefall - hauptsächlich des Ileums - auf, daher das Synonym "Ileitis terminalis". Bei 50% der Erkrankten ist zusätzlich der Dickdarm betroffen. Bei 20% besteht eine reine Kolitis, wobei anders als bei der CU die Hälfte dieser Patienten wiederum keine anorektale Beteiligung erlebt. Insgesamt findet man anorektalen Befall bei einem Drittel aller Betroffenen. Eher selten werden Teile des oberen Verdauungstraktes, d.h. proximal des terminalen Ileums involviert. Häufig treten im Verlauf der Erkrankung Fisteln, Abszesse und Strikturen auf {Peppercorn, 2007a; Sands, 2002}. Kennzeichnend für

das histopathologische Bild des MC ist das fokale Auftreten von Entzündungsherden. Dabei kann es sich um fokale Endzündung von Krypten, sichtbar abgegrenzte Bereiche chronischer Entzündung oder auch um Aphten und Ulcera mit geringer oder gar fehlender Entzündung in der Umgebung handeln. Der inflammatorische Prozess kann sich von der Mukosa, über die Serosa bis hin zur Mesenterialwurzel ausdehnen. Man findet also eine transmurale Entzündung in den betroffenen Segmenten. Dabei präsentiert sich die Darmschleimhaut makroskopisch ödematös und oft, infolge der chronischen Entzündung, fibrotisch verdickt, wodurch es zur Stenosierung und der Ausbildung des sogenannten Pflastersteinreliefs, aber auch zur Entstehung von Fisteln kommen kann. Die Schleimhautoberfläche kann bei Auftreten lymphofollikulärer Hyperplasien einen "Gänsehautaspekt" erkennen lassen. Histologisch findet sich ein entzündliches Infiltrat, vorwiegend aus Makrophagen und Lymphozyten. Diagnostisch richtungsweisend sind die nicht-verkäsenden, epitheloidzelligen Granulome und mehrkernigen Riesenzellen. Die Angaben über die Häufigkeit von Granulomen schwanken zwischen 15% und 70%, was u.a. abhängig vom Ausmaß untersuchten Gewebes zu sein scheint. Granulome können in befallenen und gesunden Abschnitten, wie auch in den mesenterialen Lymphknoten auftreten. Zudem kommt es neben der Hyperplasie der Lymphknoten auch zu Lymphangiectasien und aphtenähnlichen Geschwüren mit Fissuren und Fistelbildung. In 43% der Patienten findet sich eine typische Gastritis, charakterisiert durch diskontinuierlich verteilte Herde mit periglandulären Lymphozyteninfiltraten.

In der klinischen Präsentation sind die häufigsten Symptome Abdominalschmerzen (62-95%), die häufig kolikartig und oft im Unterbauch lokalisiert sind, meist nicht-blutige Diarrhö (52-78%), rektale Blutungen (14-60%), Gewichtsverlust (43-92%) und Fieber (11-48%). Komplikationen bestehen in Fistelbildung, Abszessformation, Passagebehinderungen bis zum Ileus und, bei längerer Dauer der Erkrankung in Karzinomen des Dün- und Dickdarms. Typisch für MC ist der Verlauf in Schüben. Die Rezidivwahrscheinlichkeit steigt mit der Krankheitsdauer (30% nach 1 Jahr, 40% nach 2 Jahren), von einem chronisch-aktiven Verlauf geht man bei Persistenz der Symptome über mehr als 6 Monate aus. Beurteilt wird der Verlauf über sogenannte Aktivitätsindizes, wie z.B. den CDAI (Crohn's Disease Activity Index, USA) oder SAI (Severity Activity Index, Europa) {Übersicht in: Sands, 2002}.

1.2.4 Colitis ulcerosa (CU)

In westlichen Industrieländern liegt die Inzidenz der CU zwischen 3 und 15, die Prävalenz zwischen 80 und 120. Beide Geschlechter sind gleichermaßen betroffen. Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr mit einem zweiten, kleineren Erkrankungsgipfel ab dem 60. Lebensjahr. Anders als beim Morbus Crohn konnte kein starker Anstieg der Inzidenzen in den westlichen Industrieländern seit 1950 vermerkt werden. In Asien, Afrika und Südamerika, wo die Erkrankung früher sehr selten war, ist allerdings ein gewisser Anstieg der Neuerkrankungen zu beobachten {Jewell, 2002; Various, 2008a}.

Die Diagnose der CU wird basierend auf Anamnese, Stuhluntersuchung, Endoskopie und Histopathologie gestellt. Bei der CU ist ein rektaler Befall nahezu in allen Fällen vorhanden. Von dort findet eine kontinuierliche Ausbreitung nach proximal statt. In 12-37% der Fälle erstreckt sich die Entzündung auf das gesamte Kolon, häufiger

beobachtet man eine Beschränkung auf Rektosigmoid oder linksseitiges Kolon. Zusätzlich ist eine Beteiligung des terminalen Ileums im Sinne einer „Backwash-Ileitis“ möglich. Im Gegensatz zum MC sind bei der Colitis ulcerosa Fisteln, Abszesse und Strikturen selten. Makroskopisch findet man im frischen Stadium entzündlich gerötete, ödematöse Schleimhaut mit kleinen, fibrinbelegten Ulzerationen, typisch ist auch die Neigung zu Kontaktblutungen. Im chronisch-fortgeschrittenen Stadium ist das normale Faltenrelief zerstört, unversehrte Schleimhautinseln imponieren als "Pseudopolypen". Histologisch charakterisiert eine auf die Mukosa beschränkte Entzündung mit Infiltration von Lymphozyten und Histozyten die CU. Die atrophische Schleimhaut neigt zu Epitheldysplasien als Vorläufer einer karzinomatösen Entartung. Das Auftreten sogenannter Kryptenabszesse wird häufiger als beim MC beobachtet, deutlich seltener dagegen findet man sogenannte epitheloidzellige Granulome.

Die Symptomatik der CU unterscheidet sich grundsätzlich nicht von der des MC, lediglich die Häufigkeiten der einzelnen Symptome variieren: krampfartige Abdominalschmerzen haben 54-76% der Patienten, und auch Diarrhö mit 67-93%, sowie die rektalen Blutungen (52-97%) sind häufiger zu beobachten. Systemische Symptome in Form von Gewichtsverlust und Fieber treten mit 22-55% und 4-34% deutlich seltener auf, wie auch extraintestinale Manifestationen. Auch wenn dies sich nicht für alle Patienten anwenden lässt, stellt doch die blutige, schleimige Diarrhö das typische Merkmal der CU dar. Im Rahmen der rektalen Beteiligung tritt sehr häufig ein für den Patienten äußerst belastender Tenesmus auf. Komplikationen stellen chronische Blutverluste, Malabsorption, toxisches Megakolon und die Entwicklung kolorektaler Karzinome bei langjähriger Erkrankung dar. In 85% der Fälle kommt es zum chronisch-rezidivierenden (intermittierenden) Verlauf, wobei es zwischen beschwerdefreien Intervallen zu Exazerbationen der Erkrankung kommt. Diese können durch körperliche oder psychische Belastungen ausgelöst werden, oder auch ohne erkennbaren Auslöser auftreten. 5-10% dieser Patienten erleben nur einen solitären Ausbruch und bleiben nach dessen Abklingen beschwerdefrei. Bei 10% aller CU-Patienten findet sich ein chronisch-kontinuierlicher Verlauf ohne komplette Remissionen, allerdings kann die Krankheitsaktivität und damit das Beschwerdebild im Verlauf dennoch deutlich variieren. Der dramatische akute-fulminante Verlauf ist selten, nur in 5% aller Patienten kommt es zu einem plötzlichen, dramatischen Krankheitsbeginn mit Tenesmen, Durchfällen, Dehydratation, septischen Temperaturen und Schock, häufig im toxischen Megakolon endend {Übersicht in: Jewell, 2002; Peppercorn, 2007b}.

1.2.5 Extraintestinale Manifestationen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Ungefähr 25% der Patienten mit CED leiden auch an extraintestinalen Manifestationen ihrer Erkrankung, wovon ungefähr 25% von mehr als einer solchen berichten. Einige extraintestinale Manifestationen entstehen dabei in direktem Zusammenhang mit der intestinalen Entzündung, wie z.B. Nephrolithiasis infolge der Malabsorption von Oxalat, andere wiederum, wie z.B. die muskuloskelettalen Manifestationen könnten über die im Magen-Darm-Trakt aktivierten Mononukleären Zellen, die sich "auf Abwege begeben", vermittelt werden. Patienten mit MC weisen etwas häufiger extraintestinale Manifestationen auf, als solche mit CU {Sands, 2002}.

Es treten kutane (Erythema nodosum, Pyoderma gangrenosum), orofaziale (Aphten, Ulcera) und ophthalmologische (Uveitis, Iritis) Läsionen ebenso wie die häufigen Arthropathien auf (Arthralgia, periphere Arthritiden, Sacroiliitis, seronegative oder auch HLA-B27 assoziierte Spondylitis ankylosans). Degenerative Leberverfettung, Primär-sklerosierende Cholangitis, Cholelithiasis und granulomatöse Hepatitis finden sich ebenfalls gehäuft in Assoziation mit CED. Auch das Auftreten von Osteopenie und Osteoporose, und zwar unabhängig von längerer Glukokortikoideinnahme, und die Nephrolithiasis zeigen einen statistisch relevanten Zusammenhang mit CED. Eine seltene, aber in einzelnen Fällen dramatische Folge der chronischen Entzündung stellt die systemische Amyloidose dar {Übersicht in: Nikolaus, 2007; Sands, 2002}.

1.2.6 Therapeutische Ansätze

1.2.6.1 Vorgehensweise und Therapieziel

Ausgehend von den gegenwärtigen Hypothesen einer überschießenden Immunantwort als pathophysiologisches Korrelat der CED bauen fast alle gebräuchlichen Pharmakotherapien auf Immunsuppression oder anti-entzündlichen Effekten auf, wie auch die nutritiven Therapieansätze eine Vermeidung immunstimulierender Exposition anstreben. Neuere, sogenannte "biologic agents" blockieren spezifisch Komponenten der intestinalen oder auch systemischen Immunantwort, wie z.B. die TNF- α Inhibitoren. In der Therapie des Morbus Crohn wurden kürzlich erstmals auch Erfolge mit immunstimulatorischen Wirkstoffen erzielt, was neue Perspektiven für die Zukunft der medikamentösen Behandlung dieser Erkrankung eröffnen könnte. Um optimale, dauerhafte Therapieerfolge zu erzielen ist fast immer eine Kombinationstherapie notwendig. Die Abstimmung der Therapie auf den einzelnen Patienten basiert auf klinischer, endoskopischer, histologischer und biochemischer Charakterisierung. Auch wenn zunehmend Faktoren gefunden werden, die Vorhersagen über den weiteren klinischen Verlauf und zu erwartenden Benefit unterschiedlicher Therapien ermöglichen, muss für den einzelnen Patienten die optimale Behandlung individuell erprobt und auf ihn abgestimmt werden. Therapieziel ist immer die Einleitung der Remission gefolgt von der Remissionserhaltung. Konkrete weitere Ziele der Therapie sind neben einer generell höheren Lebensqualität aus Sicht des Patienten die Schmerzreduktion, Milderung der Diarrhö, bessere Leistungsfähigkeit, Ausgleich und Vermeidung von Mangelzuständen, geringere Entzündungsaktivität, die Milderung extraintestinaler Manifestationen, weniger Hospitalisationen sowie die Umgehung von Komplikationen, die eine chirurgische Intervention unumgänglich machen.

1.2.6.2 Medikamentöse Therapie

Je nach Schwere der Erkrankung und momentanem Therapieziel (Remissionseinleitung vs Erhaltung) stehen verschiedene Behandlungsoptionen zur Verfügung, die unter Umständen kombiniert werden können und müssen. Die geringste Potenz, aber auch häufig gute Verträglichkeit bieten orale oder topische Sulfasalazine, Mesalamine und ihre Derivate. Davon ausgehend, dass der

intestinalen Flora eine entscheidende Rolle zukommt, werden auch orale Antibiotika, primär Metronidazol, Ciprofloxazin und Rifaximin, das aufgrund seiner geringen intestinalen Resorption von besonderem Interesse ist, eingesetzt. Die Evidenz für diesen Behandlungsansatz ist jedoch nur für einzelne klinische Subgruppen gegeben {Sartor, 2007}. Der Behandlungserfolg beider Ansätze ist beschränkt, stellt sich keine Besserung ein, muss die nächstwirksamere Wirkstoffgruppe eingesetzt werden. In schwereren Fällen sollte direkt aggressiver therapiert werden. Der nächste Schritt besteht in der Gabe oraler, topischer oder auch intravenöser Steroide zur Remissionsinduktion und anschließendem Ausschleichen. Versagen Steroide in der Remissionsinduktion oder besteht eine fortdauernde Steroidabhängigkeit, stehen hochpotente Immunsuppressiva in Form von Thiopurin-Antimetaboliten, Methotrexat, Cyclosporin und schließlich in der Therapie des Morbus Crohn die TNF- α Inhibitoren Infliximab und Adalimumab zur Verfügung. Die hier beschriebene traditionelle "step-up" Vorgehensweise wird inzwischen teilweise von dem "top-down" Ansatz abgelöst, speziell in der Therapie des MC. Dahinter steht die Hoffnung, ähnlich dem therapeutischen Regime bei Rheumatoider Arthritis, mit dem frühen Einsatz hochpotenter Pharmaka den Krankheitsverlauf günstig zu beeinflussen und Komplikationen und lange Leidenswege von Anfang an zu umgehen. Gegner der "top-down" Strategie verweisen auf die - teilweise noch nicht bekannten - Langzeiteffekte durch Toxizität und Nebenwirkungen von klassischen Immunsuppressiva und TNF- α Inhibitoren.

Welcher Ansatz richtungsweisend für die Zukunft ist, wird sich erst erweisen. Eine weitere Gruppe von Wirkstoffen stellen immunstimulatorische Pharmaka dar. Diese in der Therapie des MC einzusetzen erwuchs aus dem Verständnis der Erkrankung als Folge einer beeinträchtigten Immunantwort. Getestet wurden unter anderem CpG-DNA-Motive, die als Liganden von TLR9 wirken, und GM-CSF. GM-CSF wurde bereits in einer randomisierten klinischen Studie überprüft und führte dort zu einer signifikanten Reduktion der Krankheitsaktivität {Korzenik, 2005}. Der Nutzen der verschiedenen Wirkstoffe ist von Patient zu Patient sehr variabel, weshalb stets eine optimal individualisierte Therapie angestrebt werden muss. Die sehr unterschiedlichen Reaktionen individueller Patienten auf verschiedene Medikation sind vermutlich nicht zuletzt auf genetische Prädispositionen zurückzuführen. Das betrifft nicht nur den therapeutischen Nutzen, sondern ebenso unerwünschte Nebenwirkungen. Allerdings hat derzeit trotz zahlreicher Studien zu möglicherweise für Metabolismus oder Wirkung der verwendeten Pharmaka bedeutenden genetischen Merkmalen nur ein einziger Test die klinische Anwendung erreicht, und zwar die Genotypisierung für Thiopurin S-Methyltransferase (TPMT). Damit soll eine hämatotoxische Reaktion auf Behandlung mit Thiopurin ausgeschlossen werden {Pierik, 2006b}. Diesbezüglich ist zu erwarten, dass in Zukunft weitere Möglichkeiten erschlossen werden, auf genetischer Basis Vorhersagen über vielversprechende bzw zu vermeidende Behandlungsansätze für den individuellen Patienten zu machen {Übersicht in: Jewell, 2002; Peppercorn, 2007d; Sands, 2002; Torok, 2008}.

1.2.6.3 Chirurgische Therapie

Auch wenn die medikamentöse Therapie zweifelsohne die tragende Säule der Behandlung der CED darstellt, können chirurgische Eingriffe im Verlauf der Erkrankung häufig nicht völlig umgangen werden. Bis zu 75% der MC-Patienten und

25% bis 33% der CU-Patienten müssen sich einer Operation unterziehen. Damit wird ungefähr für die Hälfte aller Patienten mit CED mindestens einmal im Verlauf der Erkrankung ein chirurgischer Eingriff notwendig, sei es im Rahmen von Komplikationen, oder aber zur Heilung (CU) oder Milderung der Symptome. Beim MC hat eine operative Therapie immer palliative Ziele. Sie ist damit nur bei Komplikationen indiziert (akut bei Perforation, Peritonitis, Ileus, etc. bzw. elektiv bei rezidivierende Fisteln, Subileus, Stenosen, etc.) und sollte immer nach dem Prinzip der darmerhaltenden "minimal surgery" erfolgen. Infolge des diskontinuierlichen Ausbreitungsmuster muss immer mit neuen Manifestationsorten und damit verbundenen möglichen Komplikationen gerechnet werden. Großzügige Resektionen können zukünftig notwendige Operationen erschweren und zu Komplikationen wie dem Kurzdarm-Syndrom führen. Bei der CU kann bei Versagen der konservativen Therapie die kontinenzhaltende Proktokolektomie zur Heilung führen. Allerdings kommt es bei dieser Therapieform häufig als Komplikation zu einer Pouchitis (nach 10 a in 50% der Fälle). Akute Operationsindikationen können toxisches Megakolon, Perforationen, schwere Blutungen u.a. sein. Da die Letalität bei akut indizierten Eingriffen deutlich höher ist, sollte dann immer eine zweizeitige Operation vorgenommen werden, d.h. die ileoanale Pouchanlage erfolgt nach der akuten Phase, in welcher nur eine subtotale Kolektomie durchgeführt wird {Übersicht in: Hanauer, 2006; Heppell, 2007; Jewell, 2002; Sands, 2002}.

1.2.6.4 Nutritive Therapie

Häufig unterschätzt wird die Unterstützung der anderen Säulen der Therapie durch die angemessene Anpassung der Diät. Gerade in der Therapie der CED im pädiatrischen Bereich ist diese jedoch sehr wichtig und bietet großes Potential. Beim MC sollten Patienten mit nachgewiesener Laktoseintoleranz (30% aller Patienten) laktosefreie Kost einhalten, wobei auf eine ausreichende Kalziumzufuhr geachtet werden muss. Ob Lebensmittel, die der Patient subjektiv schlecht verträgt, gemieden werden sollten, wird kontrovers diskutiert. Es konnte bisher nicht belegt werden, dass das Weglassen einzelner Lebensmittel zu einer Besserung führt, wohl aber steigt das Risiko von Mangelzuständen. Im akuten Schub ist ballaststofffreie Kost indiziert, bei hochakutem Verlauf auch kurzfristig parenterale Kost. Die befristete Umstellung auf parenterale Kost oder aber der Versuch einer "elemental nutrition" über eine nasogastrale Sonde mit anschließender schrittweise erfolgreicher diätetischer Rehabilitation kann insbesondere bei Kindern zu kompletter Remission führen. Ziel ist dabei die Aufnahme und die darauf folgende intestinale Präsentation als Antigene wirkender Nahrungsbestandteile zu umgehen, bis eine Remission erreicht ist. Besteht ein Malabsorptionssyndrom müssen Eiweiß, Kalorien, Elektrolyte, Vitamin B₁₂, A, D, E, K, Kalzium und andere apparent fehlende Stoffe substituiert werden. Bei Eisenmangelanämie muss Eisen, bei langfristiger, ausgeprägter Entzündungsanämie kann versuchsweise Erythropoietin gegeben werden. Zur Osteoporoseprophylaxe werden Vitamin D und Kalzium empfohlen. Auch bei der CU sollte unbedingt eine Ernährungsberatung angeraten werden. Je nach Zustand des Patienten kann zusätzliche Trinknahrung, befristet Sondenernährung und wenn nötig auch parenterale Ernährung eingesetzt werden. Mangelzustände müssen auch hier mit Substitution der fehlenden Stoffe ausgeglichen werden {Übersicht in: Jewell, 2002; Sands, 2002; Tamboli, 2007; Teitelbaum, 2007}.

1.3 Ätiologie und Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die Ätiologie der CED ist nach wie vor weitgehend unklar. Zahlreiche Hinweise sprechen dafür, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, in dem sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle spielen. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Theorien zur Pathogenese diskutiert, wie etwa CED als Infektionskrankheiten, als Autoimmunerkrankungen {Das, 1999}, aber auch als Immundefizienzen {Folwaczny, 2003}. Nach derzeitigem Verständnis tragen zur Entstehung der CED mehrere Pathomechanismen bei, die schließlich in einer anhaltenden, überschießenden Immunantwort gegenüber der intestinalen Flora resultieren. Als ursächlich betrachtet werden verschiedene Defekte des intestinalen Immunsystems: Zum einen scheint die Regulation der normalen Immunantwort zu versagen, die gegen luminale Bakterien und ihre Bestandteile gerichtet ist. Infolgedessen fehlt die notwendige Toleranzentwicklung. Zum anderen findet aber auch eine in ihrem Ablauf physiologische Immunantwort statt, die gegen Organismen gerichtet ist, welche unter normalen Umständen keine Immunreaktion auslösen. Möglicherweise tragen dazu vorhergehende Defekte in der Barrierefunktion der Mukosa bei. Außerdem wird der mikrobiellen Exposition im Intestinaltrakt eine bedeutende Rolle zugesprochen. Nicht zuletzt scheint genetischen Faktoren ein entscheidender Anteil zuzukommen, so wie sich auch die Hinweise auf den starken Einfluss von Umweltfaktoren häufen, die sowohl zur Auslösung, als auch zur Aufrechterhaltung der Erkrankung beitragen können {Übersicht: Hanauer, 2006; Karlinger, 2000}. Im Folgenden soll auf die Rolle der Umweltfaktoren, der genetischen Faktoren und des mukosalen Immunsystems näher eingegangen werden.

1.3.1 Umweltfaktoren

Zwar kommt der genetischen Komponente in der Pathogenese der CED wohl eine entscheidende Rolle zu, es gibt jedoch einige Hinweise, dass auch Umweltfaktoren großen Einfluss auf die Krankheitsentstehung haben. So betragen die Konkordanzraten monozygoter Zwillinge nur 42-58% für Morbus Crohn und 6-17% für Colitis ulcerosa und nicht 100%, wie es bei einer rein genetisch determinierten Erkrankung der Fall sein müsste {Bonon, 2003; Orholm, 2000; Thompson, 1996; Tysk, 1988}. Die Veränderung der Inzidenzen in ethnischen Gruppen bei Änderung ihrer geographischen Ansiedlung {Shanahan, 2002}, und der beschriebene deutliche Anstieg der Inzidenzen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts deuten ebenfalls auf die Bedeutung von Umweltfaktoren hin {Sands, 2002}. Die Identifizierung einzelner Umweltfaktoren erweist sich bei einer derart multifaktoriellen Krankheit als äußerst schwierig. Dennoch sind einzelne, als bedeutsam erachtete Faktoren relativ gut untersucht. Bei manchen lässt sich im Modell eine mögliche Rolle in der Pathogenese der CED durch Auswirkungen auf das Immunsystem erklären, bei anderen dagegen ist der Wirkmechanismus völlig unklar. Schwierig an einzelnen Faktoren festzumachen, aber auf jeden Fall von Bedeutung sind Zivilisationsfaktoren, plakativ als "**westlicher Lebensstil**" oder "Verwestlichung" bezeichnet. Das zeigt sich nicht nur im rasanten Anstieg der Inzidenzen im 20. Jahrhundert, sondern auch im Vergleich von urbanen Gegenden mit ländlichen Regionen, in der steigenden Inzidenz bei Einwanderern in wirtschaftlich höher entwickelte Länder oder im

Rahmen der wirtschaftlichen Entwicklung südlicher und asiatischer Räume. Die Identifizierung der verantwortlichen Einzelfaktoren ist dabei sehr schwierig. Man geht davon aus, dass die "Verwestlichung" von Ernährung, Rauchgewohnheiten und die veränderte Exposition gegenüber Sonnenlicht, Umweltverschmutzung und Industriechemikalien von Bedeutung sind {Hanauer, 2006}. Sowohl CU als auch MC zeigen bei Angestellten in Berufen mit vorwiegend sitzender, in geschlossenen Räumen stattfindender Tätigkeit nicht nur eine höhere Prävalenz, sondern in einzelnen Berufsgruppen auch eine erhöhte Mortalität. Dazu zählen Managerberufe, Bürotätigkeiten und Jobs im Verkauf. Dagegen ist die Mortalität unter Bauern und Bauarbeitern deutlich verringert. Es wird angenommen, dass der Aufenthalt im Freien in Kombination mit körperlicher Anstrengung protektiv wirkt, hingegen Arbeiten in geschlossenen Räumen das Risiko an einer CED zu erkranken erhöht {Sonnenberg, 1990}. Welche Faktoren dabei genau zur Wirkung kommen, ist derzeit noch nicht bekannt {Hanauer, 2006}. Häufig gekoppelt an einen hohen sozioökonomischen Status wird auch der Hygiene und verminderten Exposition gegenüber bakteriellen Infektionen eine Rolle bei der Entstehung der CED zugeschrieben. Dabei erweist sich, ähnlich wie bei Asthma, MS oder Rheumatoider Arthritis, dass die CED durch hohe **Hygienestandards** gefördert werden. So haben Kinder, die mit modernen Sanitäreinrichtungen aufwachsen und selten Badezimmer oder Schlafgelegenheiten teilen ein erhöhtes Risiko an einer CED zu erkranken {Farrell, 2002; Krishnan, 2002}. Man nimmt an, dass es dabei zu einer Veränderung der intestinalen Flora durch verminderte oder fehlende Exposition gegenüber bestimmten Bakterien in der Kindheit kommt {Hanauer, 2006}. Eine **Appendektomie** scheint protektive Wirkung gegenüber CU zu haben. In einer Metaanalyse wurde eine Risikoreduktion von 69% ermittelt {Koutroubakis, 2002; Loftus, 2004}. Die Datenlage zur Auswirkung der Appendektomie auf MC ist weniger eindeutig, insgesamt weisen verschiedene Studien jedoch darauf hin, dass diese das Relative Risiko für MC eher erhöht {Loftus, 2004}. Obwohl ein Einfluss der **Ernährung** sich beinahe aufdrängt, da das intestinale Immunsystem ja abgesehen von bakteriellen Antigenen der Darmflora primär mit Antigenen aus der Nahrung konfrontiert wird, sind die Studienergebnisse zu diesem Thema recht unbefriedigend. Stillen scheint protektiv zu wirken {Jewell, 2002}. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass eine gesteigerte Aufnahme von Fettsäuren das Erkrankungsrisiko erhöht. Konsistent damit ist, dass sich in einer Studie ein 3-4 mal erhöhtes Relatives Risiko durch häufigen Fast-Food-Konsum ergab {Hanauer, 2006; Persson, 1992}. Die Einnahme **nicht-steroidaler antiinflammatorischer Pharmaka** wird nicht nur als Ursache von akuten Exazerbationen der Colitis ulcerosa, sondern sogar als auslösendes Ereignis bei Ersterkrankung an einer CED diskutiert {Evans, 1997}. Ein diesbezüglich vorgeschlagener Pathomechanismus ist die Erhöhung der Permeabilität der Mukosa infolge der Einnahme von NSAIDs {Cipolla, 2002}. **Rauchen**, speziell das Rauchen von Zigaretten, stellt einen der am besten untersuchten Umweltfaktoren dar. Dabei scheinen für CU und MC unterschiedliche Pathomechanismen zu wirken. So konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass aktuelle Raucher ein gegenüber Nichtrauchern auf 40% vermindertes Relatives Risiko haben, an CU zu erkranken. Auch das Risiko an Sklerosierender Cholangitis und Pouchitis im Rahmen einer bestehenden CU zu erkranken vermindert sich. Dieser protektive Effekt ist sowohl Dosis-, als auch altersabhängig {Merrett, 1996}. Ganz anders sieht es erstaunlicherweise für Ex-Raucher aus: ihr Relatives Risiko erhöht sich auf 1,7, zudem haben sie einen ungünstigeren Krankheitsverlauf mit häufigeren Hospitalisationen zu erwarten, die Wahrscheinlichkeit einer notwendigen Kolektomie verdoppelt sich sogar {Boyko, 1988; Tuvlin, 2007}. Vor allem eine späte Manifestation der CU scheint durch vormaliges Rauchen begünstigt zu werden

{Lindberg, 1988}. Für MC konnte in zahlreichen Studien beobachtet werden, dass Rauchen einen signifikanten Risikofaktor darstellt. Das Relative Risiko eines Rauchers erhöht sich auf 1,15 - 3,9, abhängig von der betrachteten Population {Krishnan, 2002; Lindberg, 1988}. Auch beim MC gestaltet sich der Krankheitsverlauf für Raucher ungünstiger. Speziell familiär auftretender MC wird durch Rauchen begünstigt, bei Aufgabe des Rauchens familiär auftretende frühe CU {Krishnan, 2002}. Eine interessante Ausnahme stellen jüdische, in Israel lebende Patienten dar: bei ihnen wirkt Rauchen zwar nicht als Risikofaktor für MC, wohl aber protektiv gegen CU {Reif, 2000}. In experimentellen Untersuchungen zeigte sich, dass Nikotin zur Aktivierung der humoralen Immunität und zu erhöhter Schleimproduktion im Kolon führt {Cope, 1986; Srivastava, 1991}. Zudem hemmte es T_H2-T-Zellen, die speziell bei der CU von Bedeutung zu sein scheinen, ohne einen Effekt auf die beim MC dominierenden T_H1-T-Zellen zu haben {Madretsma, 1996}.

Den wohl wichtigsten Umweltfaktor stellt die **bakterielle Darmflora** dar. Obwohl bislang zwar kein spezieller mikrobieller Erreger gefunden werden konnte, der ursächlich eine CED auslöst, spricht Verschiedenes für die Bedeutung mikrobieller Faktoren in der Pathogenese von MC und CU. Die bevorzugten Lokalisationen beider Erkrankungen, nämlich das terminale Ileum sowie das Kolon, weisen die höchste Bakteriendichte des gesamten Intestinaltrakts auf {Sartor, 1997}. Das Vorhandensein von mikrobiellen Strukturen im Allgemeinen scheint zur Aufrechterhaltung der Erkrankung beizutragen, da eine antibiotische Behandlung oder die vorübergehende Unterbrechung der Darmpassage beim MC mittels eines Anus praeter nicht selten in einer deutlichen Verminderung der Entzündungsaktivität in distal gelegenen Darmläsionen resultieren {Sartor, 2007}. Die Instillation von Darminhalt aus betroffenen Arealen in operativ ausgeschaltete Abschnitte kann dort zum erneuten Aufflammen der Entzündung führen {D'Haens, 1998}. Das beweist zwar nicht, dass es sich bei den triggernden Antigenen um bakterielle Bestandteile handelt, zeigt jedoch eindeutig, dass es sich um Bestandteile des Darminhaltes handelt. Auch im transgenen Tiermodell entwickelte sich in keimfreier Umgebung, also auch ohne bakterielle Besiedlung des Magen-Darm-Traktes, keine Kolitis. Sobald die Exposition gegenüber einer einzigen Bakterienspezies oder aber auch einer entsprechend der intestinalen Flora zusammengesetzten Kombination von Bakterien erfolgte, kam es in verschiedenen Tiermodellen rapide zur Schleimhautentzündung {Rath, 2001; Sartor, 1999}. Über Bakterien werden aber offensichtlich nicht nur pathogene Prozesse induziert, sondern es können auch protektive Effekte erzielt werden. Dies belegt der erfolgreiche Einsatz von Probiotika, also lebenden, apathogenen Bakterien, meist aus den Gattungen Lactobacillus oder Bifidobakterium. Probiotika werden u.a. in der Therapie der akuten Proktokolitis und zur Remissionserhaltung bei CU und chronischer Pouchitis verwendet. Mögliche Wirkmechanismen sind die Verdrängung pathogener Keime oder die Induktion protektiver Antikörper {Übersicht in: Sartor, 2004}.

1.3.2 Das Krankheitsgeschehen in der Mukosa und die Rolle des intestinalen Immunsystems

Als Zentrum des Krankheitsgeschehens stellt die gastrointestinale Mukosa natürlich auch einen Ort dar, wo ätiologische Faktoren der CED vermutet werden. Um mögliche Pathomechanismen aufzudecken, ist es nötig, sich die zahlreichen

Aufgaben und die Struktur der Mukosa und ihres Immunsystems zu vergegenwärtigen. Der gastrointestinalen Mukosa mit einer Fläche von mehr als 300m² kommen eine ganze Reihe von Funktionen zu, die ganz unterschiedliche, um nicht zu sagen gegensätzliche Voraussetzungen erfordern. Zum einen müssen Nahrungsbestandteile aufgeschlüsselt und resorbiert werden. Dabei werden nicht nur Substanzen aus dem Lumen aufgenommen, sondern auch andere zur Verdauung benötigte oder zur Ausscheidung bestimmte sezerniert, d.h. eine selektive Permeabilität der Mukosa ist zwingend notwendig. Andererseits aber stellt der Magen-Darm-Trakt, ähnlich wie die Haut, eine Grenze zur Außenwelt dar, die gewahrt und verteidigt werden muss. Zur Aufrechterhaltung dieser Barriere tragen mechanische Strukturen des Zellverbandes wie die Tight Junctions bei. Außerdem ist die Mukosa mit einem komplexen, hochdifferenzierten Immunsystem ausgestattet. Dieses setzt sich aus nichtorganisierten Komponenten (z.B. Lymphozyten der Lamina Propria) und organisierten Strukturen (z.B. Peyer-Plaques im Dünndarm), bzw. aus zellulären Elementen (z.B. T-Zellen, antigenpräsentierende Zellen) und nichtzellulären Bestandteilen (z.B. Zytokine, Antikörper, Defensine) zusammen. Dieses mukosale Immunsystem ist permanent Millionen von Antigenen der physiologischen Darmflora und solchen aus der Nahrung ausgesetzt. Bei der Aufschlüsselung und Resorption von Nährstoffen muss zwischen harmlosen Antigenen aus Nahrungsbestandteilen, zu tolerierenden Antigenen der physiologischen Darmflora und infektiösen oder auch toxischen Antigenen unterschieden werden. Aufgrund der ständigen Stimulation findet auch beim Gesunden in der intestinalen Mukosa ununterbrochen eine kontrollierte, physiologische Immunantwort statt. Dabei wird ein fragiles, aber entscheidendes Gleichgewicht aufrechterhalten: Zum einen muss übermäßiges Wachstum der fakultativ pathogenen Keime verhindert werden, und jederzeit eine effektive Reaktion gegenüber pathogenen Keimen möglich sein. Zum anderen ist ebenso bedeutend, dass keine unnötige, selbstzerstörerische Immunreaktion gegenüber Nahrungsbestandteilen oder der physiologischen Darmflora stattfindet. Das Gleichgewicht zwischen ständiger Bereitschaft des Immunsystems, bzw. effektiver Immunantwort bei adäquater vorrausgehender Stimulation und Toleranz gegenüber den meisten Antigenen, bzw. selektiver Downregulation scheint im Rahmen der CED dauerhaft gestört zu sein, wodurch es zu der chronischen Schleimhautentzündung kommt. Derzeit geht man davon aus, dass auf dem Boden genetischer Prädisposition unter fortwährendem Kontakt mit bakteriellen Antigenen die Entstehung und Aufrechterhaltung der CED ermöglicht wird. Bezüglich des in der Mukosa lokalisierten Pathomechanismus grassieren hauptsächlich drei Thesen. Die gegenwärtig favorisierte Hypothese stellt eine überschießende Immunantwort gegenüber nicht-pathogenen luminalen Antigenen ins Zentrum. Eine zweite Überlegung geht von einer beeinträchtigten Barrierefunktion der Mukosa als Ausgangspunkt aus. Das dritte, älteste und immer wieder aufgegriffene Modell zur Pathogenese der CED postuliert, dass tatsächlich eine Infektion mit einem spezifischen Erreger Auslöser der Erkrankungen ist. In diesem Fall würden die CED eine angemessene Immunantwort gegenüber einem bislang nicht identifizierten Erreger oder aber die Folge einer überwundenen Infektion mit einem solchen darstellen. Auf diese Thesen soll nach einem knappen Überblick über das intestinale Immunsystem und die Charakteristika der entzündlichen Aktivität bei MC und CU kurz eingegangen werden {Übersicht in: Hanauer, 2006; Ince, 2007; Snapper, 2007}.

1.3.2.1 Das intestinale Immunsystem

Auch beim intestinalen Immunsystem lassen sich ein angeborener und ein erworbener Anteil unterscheiden. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen die Barrierefunktion der Mukosa, die Magensäure, Phagozyten, also Neutrophile und Makrophagen, und antibakterielle Proteine wie die Komplementfaktoren und Defensine. Dabei können die Zellen des angeborenen Immunsystems zwar ohne vorherigen Kontakt zum entsprechenden Pathogen reagieren, aber nur relativ unspezifisch hochkonservierte, mikrobielle Strukturen, sogenannte „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs) erkennen und bekämpfen. Die adaptive Immunität dient auch im Magen-Darm-Trakt speziell der Abwehr von Pathogenen, die das angeborene Immunsystem überfordern, setzt aber eine vorangegangene Exposition gegenüber einem Erreger voraus, um schnell einsetzen zu können. Zum intestinalen Immunsystem tragen außer dem Oberflächenepithel und den intraepithelialen Lymphozyten auch die Zellen der Lamina Propria, also B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und polymorphonukleäre Leukozyten bei. Außerdem organisieren sich an einigen Stellen des Gastrointestinaltraktes zelluläre Elemente in sogenanntem "gut-associated lymphoid tissue" (GALT) Strukturen. Dazu gehören die Appendix und die Peyer-Plaques im Dünndarm. Die Zellen in der Lamina Propria und in den Peyer-Plaques stehen in regem Kontakt und Austausch mit Zellen des Immunsystems in der Blutbahn und anderen Organen des Immunsystems wie Lymphknoten und Milz. Die T-Zellen der Lamina propria unterscheiden sich in verschiedenen Aspekten von denen des peripheren Blutes. So sind sie schlechter über den T-Zellrezeptor stimulierbar {Qiao, 1991}, jedoch sensitiver gegenüber Stimulation auf dem CD2/CD28-Weg {Targan, 1995}. Dies resultiert in der Produktion pro-, aber auch antiinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-10, die beim Gesunden für die physiologische Hyporeaktivität des mukosalen Immunsystems verantwortlich sein könnte {Braunstein, 1997}. Außerdem zeigen die T-Zellen der Lamina propria im Vergleich mit T-Zellen anderer Herkunft eine erhöhte Apoptoserate {Boirivant, 1996}. Diese Ergebnisse stützen die Annahme einer herabgesetzten Reaktivität des mukosalen Immunsystems beim Gesunden, das nur als Reaktion auf streng selektionierte Antigene eine Immunantwort generiert {Holtmann, 2002a}. Im physiologischen Zustand überwiegen also die antiinflammatorischen Zytokine in der Mukosa. Dazu tragen vermutlich unreife dendritische Zellen in der Darmwand bei, die tight junctions zwischen den Epithelzellen auflösen, bakterielle Antigene aus dem Lumen aufnehmen und sie den T-Zellen präsentieren. Dies scheint IL-10 produzierende regulatorische T-Zellen und TGF- β produzierende Th₃-Zellen zu induzieren. IL-10 und TGF- β hemmen die Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten der Lamina propria und werden als essentiell für die Aufrechterhaltung der physiologischen Hyporeaktivität des mukosalen Immunsystems betrachtet {Übersicht in: Werner, 2007}.

1.3.2.2 Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei MC vs CU

So wie auch die Schleimhautschädigung bei CU und MC Gemeinsamkeiten, aber auch ganz typische Unterschiede aufweist, kann man davon ausgehen, dass auch die stattfindende Immunantwort über verschiedene Wege abläuft. Diesbezüglich konnten verschiedene Hypothesen aufgestellt und teilweise auch bestätigt werden.

Unabhängig vom Auslöser der Entzündung kommt es im Rahmen der Immunantwort zur Rekrutierung von Neutrophilen. Diese Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion. Sie verlassen angelockt von Zytokinen, die durch Antigen-präsentierende-Zellen sezerniert werden und die Integrität des Endothels beeinträchtigen, die Blutgefäße und wandern in die Mukosa ein. Dort setzen sie antimikrobielle Peptide und reaktive Sauerstoffmoleküle frei, die nicht nur potentielle Krankheitserreger sondern auch das umgebende Gewebe schädigen. Außerdem aktivieren Neutrophile mittels Chemokinen und Cytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 weitere Makrophagen und andere Leukozyten. Die charakteristischen Schleimhautschädigungen bei CED und die Granulome des MC könnten Endergebnis dieser Kaskade sein. Es gibt Hinweise, dass bei MC und CU verschiedene Wege der Immunantwort beschränkt werden. Während beim MC die zellvermittelte, adaptive Immunantwort primär über eine exzessive T_H1-Antwort zu laufen scheint, kommt es bei der CU eher zu einer überschießenden atypischen T_H2 Antwort {Bouma, 2003; Fuss, 2004; Neurath, 2002; Podolsky, 2002}. Dies soll im folgenden näher erläutert werden.

Die Aktivierung und Reifung undifferenzierter T-Zellen wird über die Ausschüttung von Zytokinen durch Makrophagen und Dendritische Zellen gesteuert. Makrophagen können verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 und TNF sezernieren und damit eine unterschiedliche Differenzierung der T-Zellen induzieren. Bei MC und CU konnten erhöhte Konzentrationen an IL-1, IL-6 und IL-8 gemessen werden. Bemerkenswerterweise zeigte sich diese Veränderungen bei MC im gesamten Gastrointestinaltrakt, einschließlich der gesunden Areale, bei CU dagegen nur in befallenen Abschnitten {Übersicht in: Holtmann, 2002a}.

T-Zellen unterscheiden sich unter anderem durch ihr Zytokinprofil und können in verschiedene Gruppen unterteilt werden. Während beim Gesunden im Darm T_H3- und T_R1-Zellen überwiegen, die antiinflammatorische Zytokine sezernieren, dominieren bei Patienten mit CED T_H1- bzw. T_H2-Zellen, die in erster Linie proinflammatorische Zytokine ausschütten. Eine hohe IL-12-Produktion durch Makrophagen, wie sie beim MC beobachtet werden kann, begünstigt die Reifung von T_H1-Zellen. Diese produzieren die proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ und TNF- α , aber auch IL-1 β , IL-2 und IL-6, die zur Freisetzung und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen und damit zur Gewebsdestruktion beitragen {Hendrickson, 2002}. Die Zytokine IL-6 und IL-12 könnten auch für die beim MC erhöhte Apoptoseresistenz der Lamina-Propria-T-Zellen eine Rolle zukommen. Infolge der verminderten Apoptoserate kommt es zur T-Zell-Akkumulation im Darm und dadurch zur Aufrechterhaltung der Schleimhautentzündung {Baird, 1999; Ina, 1999}. Die Bedeutung von IL-12 wird durch T_H1-vermittelte Kolitismodelle bestätigt, in denen die Behandlung mit IL-12-neutralisierenden Antikörpern zur Reduktion, teilweise sogar zur Remission der Entzündung führte {Neurath, 1995}. Ebenfalls von großer Bedeutung in der Pathogenese des MC scheint TNF- α zu sein. Dies belegen nicht nur der erfolgreiche Einsatz von Anti-TNF-Antikörpern in der Therapie, sondern auch verschiedene experimentelle Beobachtungen. TNF- α -Stimulation scheint über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die TNF- α -Sekretion in CD4⁺-T-Zellen zu erhöhen und über den TNF-R₂ NF κ -B zu aktivieren, ohne apoptotische Wirkung zu haben, wie sie bei Signalvermittlung über TNF-R₁ zu beobachten ist {Grell, 1995}. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es auf Lamina propria Zellen von MC-Patienten im akuten Schub zur Hochregulation von TNF-R₂ kommt. Im experimentellen Mausmodell führte die Überexpression von TNF-R₂ zur

Verschlimmerung einer bestehenden Kolitis. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen wäre wiederum eine verminderte Apoptoserate, zu der es durch eine vermehrte Aktivierung von NF κ -B über TNF-R₂ kommen könnte {Holtmann, 2002b}. Außerdem werden durch TNF- α Matrixmetalloproteasen aktiviert {Übersicht in: Beutler, 1992; Holtmann, 2001}. Die typischen T_H2-Zytokine IL-4 und IL-5 werden beim MC vermindert produziert, IL-6, das auch als T_H2-Zytokin gilt, allerdings wie beschrieben vermehrt. Eine vorwiegend durch T_H2-Zellen gesteuerte Immunantwort, wie sie bei CU angenommen wird, resultiert in einer hohen Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, und induziert damit eher die humorale Komponente der Immunantwort. Bei CU sind die meisten T_H2-Zytokine erhöht, IL-4 jedoch nicht. Es handelt sich also um eine atypische T_H2-Antwort. Die Erhöhung der IL-5 und IL-6-Konzentrationen bei CU könnte außerdem zu übermäßiger B-Zell-Aktivierung führen und die beobachtete Autoantikörperproduktion begünstigen {Hendrickson, 2002}.

Auch die Epithelzellen sind in der Lage Zytokine zu produzieren und sezernieren bei aktiver CU große Mengen von IL-7, das zur Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen führt. Watanabe et al. konnten zeigen, dass durch IL-7 die mukosale Immunantwort über die Differenzierung und Regeneration von IECs beeinflusst wird, und die Hochregulation von IL-7 im Modell in chronischer Schleimhautentzündung resultiert {Watanabe, 2006}. Einige Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass Defekte in den reifen T-Zellen, also den T_H3- und T_R1-Zellen, ursächlich für die Schleimhautentzündung sind. Diese produzieren als sogenannte regulatorische Zellen primär inhibitorische Zytokine, u.a. TGF- β und IL-10. Fehlt diese Inhibition könnte die Toleranz gegenüber den luminalen Antigenen nicht induziert bzw. aufrecht erhalten werden, und es käme zur beschriebenen Einwanderung und Proliferation inflammatorischer Zellen und der ungehemmten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Untermauert wird diese These von Experimenten mit IL-10-defizienten Mäusen. Diese entwickelten eine Kolitis, die durch Gabe von IL-10 oder TGF- β erfolgreich gemildert werden konnte {Abreu, 2002}{Übersicht in: Hanauer, 2006; Ince, 2007}.

1.3.2.3 Autoimmunität bei CED

Physiologischerweise unterscheidet das Immunsystem zwischen körpereigenen und fremden Strukturen, eine Produktion von Autoantikörpern findet nur sehr begrenzt oder im Rahmen von Kreuzreaktionen statt. Das Vorhandensein verschiedener Autoantikörper ist nachweislich mit den CED korreliert, ihre pathogenetische Relevanz allerdings noch weitgehend ungeklärt. Ein großer Anteil von Patienten weisen pANCAs auf {Gordon, 1999; Gordon, 2000}. Für diese pANCAs wurden verschiedene kreuzreaktive Strukturen gefunden, wie z.B. Antigene aus der Kolonschleimhaut, aus dem Ziliarkörper des Auges und aus retinalen Ganglienzellen {Sandborn, 1995; Sandborn, 1996}. Daneben konnten bei der CU eine Reihe von weiteren Autoantikörpern nachgewiesen werden, von denen einige eine Kreuzreaktivität mit bakteriellen Antigenen aufweisen {Cohavy, 2000; Vashishtha, 1993}. Diese Ergebnisse haben zu der These geführt, dass bei der CU Kreuzreaktivität durch molekulares Mimikry von körperfremden und eigenen Antigenen pathophysiologisch von Bedeutung sein könnte. Für eine autoimmune Komponente spricht auch die in einigen Studien beobachtete Assoziation von CU mit bestimmten HLA (Histokompatibilitätskomplex) Klasse-II-Strukturen (siehe auch

1.3.3.4.1 MHC), sowie das gehäufte Auftreten von Autoimmunerkrankungen bei Patienten mit CED, wie z.B. PSC {Übersicht in: Holtmann, 2002a}.

1.3.2.4 CED als überschießende Immunantwort gegenüber nicht pathogenen luminalen Antigenen

Man geht davon aus, dass die fortwährende Exposition gegenüber den Darmbakterien im physiologischen Zustand zu einer Downregulation von proinflammatorischen Genen und zur Inhibition des NF- κ B-Pathways führt. Dadurch kann trotz fortwährender Konfrontation mit luminalen Antigenen eine übermäßige, die Mukosa schädigende entzündliche Reaktion verhindert werden. Beim Gesunden befindet sich das mukosale Immunsystem also in einer physiologischen Hyporeaktivität. Im Rahmen einer CED scheint die dafür notwendige Toleranz nicht induziert zu werden bzw. verloren zu gehen. Infolgedessen rufen die luminalen Mikroorganismen eine Immunantwort in der Mukosa hervor und führen zu einer chronischen, destruktiven Entzündung derselben {Donnenberg, 2000; Neish, 2000}. Einige Hypothesen zur Pathogenese der CED gehen davon aus, dass es durch verschiedene Defekte in der angeborenen Immunantwort zu einer vermehrten Aktivierung des adaptiven Immunsystems kommt, was die fortdauernde hohe Entzündungsaktivität hervorruft. Bei CU-Patienten scheinen außer epithelialen Bestandteilen primär veränderte Aerobier als Trigger zu fungieren, bei MC-Patienten dagegen stellen eher Anaerobier und bakterielle Zellwandbestandteile im Allgemeinen die auslösenden Antigene dar {Sartor, 1999}. Zusätzliche Faktoren, die zur Krankheitsaktivität beitragen, könnten die andauernde Präsenz der stimulierenden Antigene oder aber die Aufrechterhaltung der fehlgeleiteten Immunantwort auch nach Ende der Exposition gegenüber einem Antigen sein {Hendrickson, 2002}. Ebenfalls zur Entstehung dieser unangemessenen Immunantwort beitragen könnten auch eine veränderte Zusammensetzung oder Funktion der intestinalen Flora. Untersuchungen der Darmflora von CED-Patienten ergaben, dass deren Darmflora sich von derjenigen gesunder Individuen unterscheidet, wobei unter anderem die intestinale Bakterienkonzentration anstieg, und eine vermehrte Eindringtiefe in die Mukosa beobachtet wurde {Kleessen, 2002; Swidsinski, 2002}. Es gibt außerdem Hinweise, dass verschiedene genetische Veränderungen in unterschiedlichen Reaktionen gegenüber denselben Bakterien resultieren {Farrell, 2002; Rath, 1996}. Folglich kann man davon ausgehen, dass je nach genetischem Hintergrund des Patienten evt. andere Bakterien an der Entstehung der chronischen Entzündungsreaktion beteiligt sind {Übersicht in: Hanauer, 2006; Ince, 2007}.

1.3.2.5 CED als Barrierestörung

Die luminale, gastrointestinale Oberfläche besteht aus einschichtigem Säulenepithel, dessen Zellen über Tight Junctions verbunden sind und damit das Eindringen luminaler Antigene in tiefere Schichten der Mukosa verhindern sollen. Diese Zellschicht zeigt eine sehr hohe Turnover-Rate, wobei luminalen Faktoren die Epithelregeneration beeinflussen. Im menschlichen Gastrointestinaltrakt tummeln sich physiologischerweise bis zu 10^{14} Bakterien aus über 500 verschiedenen Spezies. Das gesunde Epithel stellt gegen diese luminalen Organismen eine effektive Barriere dar und limitiert unnötige Immunreaktionen. Dringen allerdings Bakterien oder ihre Produkte und Bestandteile in die Mukosa ein, kommen sie in direkten Kontakt zu Zellen des Immunsystems und lösen hier eine klassische adaptive Immunantwort aus. Im Rahmen dieser Reaktionskaskade ausgeschüttete Zytokine führen zur Einwanderung weiterer immunaktiver Zellen in die Mukosa. Unter anderem werden Neutrophile aus den intestinalen Blutgefäßen rekrutiert und setzen eine das Gewebe schädigende, zerstörerische Entzündung in Gang. Bei Patienten mit CED ist die epitheliale Integrität gestört, es lässt sich eine Barrierefunktionsstörung nachweisen {Hollander, 1999}. Diese führt zu einer andauernden Stimulation des intestinalen Immunsystems. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass in der Umgebung von Schleimhaut mit erhöhter Permeabilität eine Tendenz zu chronischer, schwerer Entzündung besteht. Desweiteren scheinen luminalen Bakterien bestehende entzündliche Barrieredefekte zu verstärken und so einen Circulus vitiosus aufrecht zu erhalten {Bouma, 2003}. Dabei resultiert die Barrierefunktionsstörung in bakterieller Translokation und reaktiver Schleimhautentzündung, diese wiederum verstärkt die Barrierefunktionsstörung, es kommt zum vermehrten Eindringen von Bakterien, die Entzündungsreaktion wird weiter getriggert, die Barrieredefekte noch eklatanter {Übersicht in: Hanauer, 2006; Snapper, 2007; Schreiber, 2005}.

1.3.2.6 CED als Infektionskrankheiten

Obwohl ein immer wieder verfolgter Ansatz, konnte die Einordnung von CED als klassische Infektionskrankheiten bis heute nicht bestätigt werden. Trotz zahlreicher Versuche, einen spezifischen Erreger für die Auslösung des Krankheitsgeschehens verantwortlich zu machen, wurde ein solcher bis heute nicht identifiziert. Potentielle Kandidaten waren u.a. das Mycobacterium tuberculosis, der M paramyxovirus, Listeria monocytogenes und Helicobacter hepaticus. Einige Berichte schlagen eine Assoziation zwischen früher Maserninfektion und MC vor, ein Zusammenhang der so allerdings nicht bewiesen werden konnte. Es gibt dennoch Argumente die für einen infektiösen Hintergrund, vermutlich mit mehr als einem potentiellen Erreger, sprechen. So zeigen sich deutliche statistische Unterschiede der Neuerkrankungsrate je nach Jahreszeit: am höchsten ist diese im Winter, was bei zahlreichen Infektionskrankheiten beobachtet werden kann. Auch die häufig im Rahmen systemischer Infektionen mit Bakterien, Viren und auch Parasiten auftretenden Erkrankungsschübe können als Hinweis auf die Bedeutung von Infektionen für das Krankheitsgeschehen verstanden werden {Übersicht in: Hanauer, 2006; Snapper, 2007}.

1.3.3 Der Einfluss genetischer Faktoren

Epidemiologische Studien zeigen ebenso wie auf einzelne Familien beschränkte Studien eindeutig, dass eine genetische Prädisposition die Suszeptibilität für CED erhöhen kann. Allerdings konnte inzwischen gezeigt werden, dass es sich keineswegs um eine monogenetische Erkrankung handelt, sondern zahlreiche Loci involviert sind. Dabei scheinen einzelne Genorte für MC und CU eine Rolle zu spielen, andere wiederum beeinflussen lediglich das Krankheitsgeschehen einer der beiden Entitäten. Man geht davon aus, dass der Phänotyp einzelner Patienten ebenso von Interaktionen der Varianten verschiedener Allele an zahlreichen Genorten bestimmt wird, wie von weiteren genetischen und umweltbedingten Faktoren {Hanauer, 2006}. Ziel der Suche nach pathogenitätsrelevanten Genen ist das Verständnis der Pathogenese der CED zu vertiefen und dadurch neue therapeutische Ansätze zu erschließen, sowie Merkmale zu finden, die bessere Vorhersagen über Verlauf und erfolgversprechende Therapien erlauben.

1.3.3.1 Genetische Epidemiologie

Noch ehe Kandidatengene für die CED gefunden worden waren, häuften sich die Hinweise auf eine starke genetische Komponente bei der Krankheitsentstehung. Dazu zählen zum einen die deutlich unterschiedlichen Inzidenzen in einzelnen ethnischen Gruppen. Während die Prävalenzen bei Asiaten am geringsten sind, sind Afrikaner häufiger, Kaukasier am häufigsten betroffen. Die beobachteten Unterschiede nehmen allerdings konstant ab {Hanauer, 2006}. In den USA erkranken Kaukasier jüdischer Abstammung öfter, nicht-jüdische Kaukasier dagegen seltener. Bei Ashkenazi-Juden sind Inzidenzen und Prävalenzen über längere Beobachtungszeiträume höher, als es die geographisch betrachteten Inzidenzen bei Juden anderer ethnischer Herkunft für die jeweilige Region erwarten lassen {Bonen, 2003; Roth, 1989; Yang, 1993; Yang, 2001}. Die dynamischen Veränderungen der Prävalenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen im Rahmen von Migration verweisen auf die Bedeutung der Umweltfaktoren, während das Beispiel der Ashkenazi-Juden illustriert, dass die genetische Komponente in verschiedenen Untergruppen unterschiedliche Relevanz hat. Speziell bei dieser ethnischen Gruppe scheint also den genetischen Faktoren eine besonders große Bedeutung zuzukommen. Auch das familiäre Auftreten der CED legt einen bedeutenden Einfluss genetischer Faktoren nahe. Zwischen 10% und 15% der Patienten mit CED weisen eine positive Familienanamnese auf. Diese gilt auch als der größte Risikofaktor, so beträgt das erhöhte Relative Risiko Verwandter ersten Grades eines CED-Patienten 14-15 beim Morbus Crohn und 10 bei Colitis ulcerosa. Für zweieiige Zwillinge ist es etwas höher und steigt für eineiige Zwillinge noch weiter an. Sowohl für MC als auch für CU findet sich eine höhere Konkordanzrate bei monozygoten gegenüber dizygoten Zwillingen. Dabei ist die Konkordanzrate je nach Studie für MC mit 37% - 67% gegenüber 3,9% - 20% deutlich höher als für CU mit 6% - 17% gegenüber 0% - 5%, was auf eine stärkere genetische Penetranz von MC deutet {Bonen, 2003; Orholm, 2000; Sands, 2002; Thompson, 1996; Tysk, 1988}. In Familien mit einer erhöhten Inzidenz sind 75% der Betroffenen konkordant bezüglich der Erkrankung, in 25% verteilen sich die Fälle auf CU und MC {Binder, 1998 Bonen, 2003}. Das weist darauf hin, dass multiple genetische Faktoren, die sich teilweise überlappen, eine Rolle in der Entstehung beider Krankheitsentitäten spielen. Weder bei MC noch bei

CU konnte jedoch ein Mendel'scher Erbgang nachgewiesen werden. Dies unterstützt die These, dass es sich bei den CED um polygenetische Erkrankungen handelt. In betroffenen Familien scheinen auch einzelne Krankheitscharakteristika wie das Befallsmuster, Alter bei Erstmanifestation und bestimmte Komplikationen unter den Betroffenen überzufällig häufig übereinzustimmen {Bayless, 1996; Folwaczny, 1998; Folwaczny, 1997; Schreiber, 2002}. Desweiteren wurde in einzelnen Studien bei Familien mit mehreren betroffenen Generationen ein abnehmendes Ersterkrankungsalter beobachtet {Colombel, 1999}. Dieses Phänomen, auch als genetische Antizipation bezeichnet, ist eigentlich charakteristisch für Trinukleotiderkrankungen und kommt durch eine von Generation zu Generation zunehmende Expansion einzelner Trinukleotidmotive zustande. Ob diese Beobachtungen durch systematische Fehler bei der Fallerfassung zustande gekommen sind, wie kritisiert wurde {Lee, 1999}, oder aber auf jüdische Populationen und paternale Vererbung beschränkt sind, wie von anderer Seite berichtet {Heresbach, 1998}, ist noch unklar. Auch die erhöhte Erkrankungsrate von Individuen mit anderen seltenen genetischen Erkrankungen, wie Wiskott-Aldrich-Syndrom, Hermansky-Pudlak-Syndrom, Turner-Syndrom, Pachydermoperiostosis, und der Glykogenspeichererkrankung Typ 1b liefert einen weiteren interessanten Verweis auf die genetische Komponente der CED. Zudem treten CED auch gehäuft in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen auf, bei denen eine genetische Suszeptibilität nachgewiesen ist, Beispiele dafür sind Spondylitis ankylosans und Psoriasis {Bonen, 2003}. Das Auftreten bestimmter Autoantikörper wurde sowohl bei CU als auch MC beschrieben. Die Relevanz dieser Autoantikörper ist noch weitgehend unklar, sie kommen jedoch auch vermehrt bei Angehörigen ersten Grades von Patienten vor. Es handelt sich dabei um ASCAs (Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies) und PAK (Antikörper gegen exokrines Pankreasgewebe) beim MC und um pANCAs bei der CU {Desplat-Jego, 2007; Folwaczny, 1998; Sands, 2002}. Um molekulare Erkenntnisse über die Pathogenese im Allgemeinen zu gewinnen, die aus genetischen Studien mit betroffenen Familien stammen, muss sichergestellt sein, dass sich diese überhaupt auf sporadische Fälle, die etwa 90% der Patientenpopulation darstellen, übertragen lassen. Es wird angenommen, dass dies möglich ist, da vergleichende Analysen von Kohorten familiärer und sporadischer Fälle eine weitgehende Übereinstimmung in klinischen und epidemiologischen Merkmalen zeigen konnten {Henriksen, 2007}{Übersicht in: Hanauer, 2006; Ince, 2007; Van Limbergen, 2007a}.

1.3.3.2 Ansätze zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene stehen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung, die Kopplungsanalyse und Assoziationsstudien zu potentiellen Kandidatengenen. In den letzten Jahren wurden jedoch die meisten Erkenntnisse aus genomweiten Assoziationsstudien gewonnen. Diese wurden durch die Vervollständigung des Human Genom Projects und des Hap Map Programms sowie durch die Vereinfachung der Genotypisierungsmethoden, welche die Bestimmung zahlreicher SNPs unter Verwendung wenigen Patientenmaterials ermöglichen, erst machbar. Bei der Kopplungsanalyse wird mittels Mikrosatellitenmarkern das gesamte Genom von Patienten und ihren Eltern, erkrankten Geschwisterpaaren oder Patienten und gesunden Kontrollpersonen

gescannt. Ziel ist, Allele zu finden, die statistisch signifikant häufiger bei erkrankten Personen sind. Hat man mit dieser Methode eine Kopplungsregion erkannt, muss innerhalb dieses meist mehrere Megabasen großen Abschnitts eine Feinkartierung mit weiteren polymorphen Markern vorgenommen werden, um das mit der Krankheit assoziierte Gen zu identifizieren. Bei diesem Ansatz ist keine a priori Hypothese bezüglich der krankheitsrelevanten Gene notwendig, und es ist mittels weniger Marker möglich sehr effizient krankheitsassoziierte Loci zu suchen. Anders geht man bei Assoziationsstudien vor: hier untersucht man gezielt Gene, die aufgrund der Funktion der kodierten Proteine als potentielle Kandidatengene in Frage kommen. Liegt ein Gen zusätzlich noch in einer Kopplungsregion, handelt es sich um ein positionelles und funktionelles Kandidatengen. Die Allelfrequenzen von in diesen Genen liegenden Polymorphismen werden in Patienten- und Kontrollkollektiven statistisch miteinander verglichen. Die gängigste Herangehensweise besteht darin, zunächst Kopplungsregionen mittels Genom-weiter Scans zu ermitteln, mittels Mikrosatellitenmarkern die positiv gekoppelte Region möglichst einzugrenzen, um dann Kandidatengene in dieser Region auf Assoziationen hin zu überprüfen.

Seit der definitiven Identifizierung des *NOD2*-Gens in der als Inflammatory Bowel Disease Susceptibility 1 (IBD1) bezeichneten Kopplungsregion für MC in der perizentromerischen Region auf Chromosom 16 (16q12) ist eine ganze Flut von Publikationen zu fraglichen Assoziationen genetischer Veränderungen mit den CED erschienen. Allerdings hielt nur ein Teil der Assoziationen der Überprüfung in Bestätigungsstudien überzeugend stand. Die Gründe, wieso sich in einer ersten Studie nachgewiesene Assoziationen häufig nicht bestätigen lassen, können vielfältig sein: Neben einer zu geringen Größe von Studienpopulationen, die schwache Effekte eines Genortes untergehen lassen, kann die genetische Heterogenität zwischen Studienpopulationen, wie auch eine aufgrund mangelhafter Typisierung übersehene phänotypische Heterogenität Unterschiede in den Ergebnissen bedingen. Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass der betrachtete Genort ein falsch positiver Kandidat war. Ebenso kann ein in einer identifizierten Kopplungsregion liegender SNP lediglich in einem partiellen Kopplungsungleichgewicht mit dem eigentlich, evtl noch unentdeckten, kausalen SNP stehen, weshalb sich eine Assoziation nicht konsistent nachweisen lässt. In einer erst kürzlich erschienenen Metaanalyse, in der die Daten aus drei Studien mit insgesamt 3230 MC-Patienten und 4829 Kontrollen kombiniert wurden, und zudem weitere 3664 Fälle mit verschiedenen Kontrollgruppen (Familienbasiert, Populationsbasiert) miteinbezogen wurden, konnten nicht nur 11 bereits bekannte MC-Loci bestätigt, sondern 21 weitere, signifikant korrelierte Genorte beschrieben werden. Gene in den neu entdeckten Kopplungsregionen sind u.a. *STAT3*, *JAK2*, *ICOSLG*, *CDKAL1* und *ITLN1* {Barrett, 2008}. Man kann also davon ausgehen, dass die Suche nach krankheitsrelevanten Genen weitere Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese und möglicher Therapieansätze liefern wird. Nach derzeitigem Stand der Forschung zur Vorstellung der Pathogenese der CED werden genetische Veränderungen speziell in Proteinen, denen eine Rolle in der Erkennung mikrobieller Strukturen zukommt, in Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, deren Rezeptoren oder anderweitig in Zytokin-Signal-Kaskaden involvierten Proteinen und in Transportermolekülen vermutet, und teilweise auch gefunden. Im folgenden soll ein knapper Überblick über die wichtigsten bislang näher untersuchten mit CED assoziierten genetischen Veränderungen gegeben werden. Die stärkste Evidenz liegt dabei für *NOD2* (MC), die HLA-Region (MC/CU), *IL23R* (MC/CU) und *ATG16L1* (MC) vor. Kontrovers diskutiert und hier deshalb nur am Rande erwähnt werden zwei Gene des IBD5

Lokus, *DLG5*, *MDR1* (CU), *TLR4*, *NOD1/CARD4*, *ICAM-1*, *MyosinIXBm* und verschiedene Loci in sogenannten "Gene deserts" {Übersicht in: Barrett, 2008; Ferguson, 2007}.

1.3.3.3 Gene der angeborenen Immunantwort

Verschiedenen Hypothesen zur Pathogenese der CED gehen davon aus, dass es durch Defekte in der angeborenen Immunantwort zu einer vermehrten Aktivierung des adaptiven Immunsystems kommt, was die fortdauernde hohe Entzündungsaktivität hervorruft. Spätestens seit der Entdeckung von *NOD2* und der Erkenntnis, dass verschiedene Zytokine bei Patienten mit CED in der Mukosa vermehrt oder vermindert vorkommen (siehe 1.3.2.2 Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei MC vs CU) rückten zahlreiche Gene in das Blickfeld der Forschung, die im Rahmen des angeborenen Immunsystems der Erkennung oder Abwehr mikrobieller Strukturen dienen. Dazu gehören Rezeptoren, ihre Kofaktoren, Zytokine und zahlreiche weitere Gene. Beispiele sind neben *NOD2* und den Defensinen, verschiedene PRRs (Pattern Recognition Receptors) wie die Toll-like-Rezeptoren.

1.3.3.3.1 *NOD2*

Das erste eindeutig mit MC assoziierte Gen liegt in der perizentromerischen Region von Chromosom 16 {Hugot, 1996}. Genauere Untersuchungen haben ergeben, dass es sich dabei um das "nucleotide-binding oligomerization domain 2" (*NOD2*) Gen handelt, auch als "caspase activation and recruitment domain 15" (CARD15) bezeichnet {Cavanaugh, 2001; Hugot, 2001; Ogura, 2001}. In diesem Gen sind über 60 SNPs bekannt, von denen mehrere mit MC eindeutig in Verbindung gebracht werden konnten, drei davon stellen jedoch die Hauptvarianten dar. Die häufigste ist die Leserastermutation 3020insC (Leu1007fsinsC), die zu einem vorzeitigen Stoppcodon und damit zu einem verkürzten Protein führt. Die anderen beiden Mutationen, C2104T (Arg702Trp) und G2722C (Gly908Arg), sind Punktmutationen, welche jeweils zum Austausch einer Aminosäure führen {Hugot, 2001; Torok, 2003}. Bei allen drei Mutationen scheint es sich um "loss-of-function"-Mutationen zu handeln. *NOD2* gehört zu einer weitverbreiteten Familie intrazellulärer Proteine. Seine Leuzin-reiche Region ist großteils homolog mit pflanzlichen Genen, die zur Abwehr Gram-negativer Bakterien benötigt werden {Various, 2008}.

Man nimmt an, dass Defekte im *NOD2*-Protein für bis zu 27% der MC Fälle verantwortlich sind. Heterozygote Träger haben ein 2,6-fach erhöhtes Risiko an MC zu erkranken, für homozygote oder compound-heterozygote erhöht sich das Relative Risiko um den Faktor 40. Mutationen an diesem Genort konnten in westlichen Populationen speziell mit ilealem und fibrosierend-stenotischem MC korreliert werden {Cuthbert, 2002; Hugot, 2001}. In einer japanischen Studie wurde keine Assoziation von *NOD2* mit MC gefunden. Mit CU scheinen die *NOD2*-Mutationen nicht assoziiert zu sein.

Der genaue Pathomechanismus, der von einem defekten *NOD2*-Gen zur Entwicklung von MC führt, ist bislang noch unklar. *NOD2* wird auf intestinalen Epithelzellen, vor allem auf Paneth-Zellen und auf Makrophagen/ Mononukleären Zellen exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunantwort gegenüber luminalen Bakterien. Die Veränderung der Immunantwort durch *NOD2*-Mutationen scheint speziell im Intestinaltrakt relevant zu sein. So sind z.B. *NOD2*-defiziente Mäuse anfälliger für bakterielle Infektionen nach oraler, nicht aber nach intravenöser oder peritonealer Exposition.

Die Signalkaskade über *NOD2* wird nach derzeitigem Wissensstand u.a. durch Muramyl Dipeptid (MDP), also ein Abbauprodukt bakterieller Zellwandbestandteile, ins Rollen gebracht. Einen Effekt stellt die Aktivierung von Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) dar, einem Transkriptionsfaktor, der sowohl in der zellulären Immunantwort als auch in die Apoptose von Makrophagen involviert ist. NF- κ B Aktivierung initiiert die Produktion von zahlreichen Entzündungsmediatoren, u.a. Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Arachidonsäuremetaboliten und reaktiven Sauerstoffmolekülen. Die Gesamtheit dieser Moleküle trägt dazu bei eine entzündliche Reaktion in Gang zu setzen, diese aufrecht zu erhalten, und schließlich das betroffenen Gewebes zu zerstören. Überraschenderweise reduzieren die mit MC in Verbindung gebrachten Varianten des Gens *in vitro* die Antwort auf MDP, es kommt zu einer verminderten Aktivierung von Makrophagen durch NF- κ B {Girardin, 2003; Inohara, 2003}. Es wird angenommen, dass die initial verminderte Immunantwort der unspezifischen Abwehr auf bisher unbekannt Weise zur Aufrechterhaltung oder Hochregulation adaptiver Immunreaktionen führt. Eine Hypothese besagt, dass es infolge der *NOD2*-Mutationen eher zu chronischen intrazellulären Infektionen komme, oder aber die Toleranzentwicklung gegenüber den "commensal bacteria" verhindert werde. Ebenfalls ein möglicher Pathomechanismus wäre, dass bei fehlender oder verminderter *NOD2*-Expression auf Epithelzellen die Chemokinsekretion als Reaktion auf mikrobielle Bestandteile ausbleibt. So konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, die Träger einer *NOD2*-Mutation sind, die Sekretion von α -Defensinen durch ileale Paneth-Zellen vermindert ist {Wehkamp, 2004}. Dies würde die ungehemmte Proliferation von Mikroorganismen begünstigen, die in einer mangelhaften Barrierefunktion der Mukosa resultieren könnte {Abreu, 2002}. Eine weitere These stellt das Gleichgewicht des mukosalen Immunsystems in den Vordergrund: die Abwesenheit oder veränderte Funktion von *NOD2* könnte dazu führen, dass Antigen-präsentierende Zellen nur noch eine nicht ausreichende T-Zell-Aktivierung induzieren können. Das Fehlen der davon unter anderem betroffenen regulatorischen T-Zellen würde zu einer chronischen Überaktivität des mukosalen Immunsystems führen {Bouma, 2003} {Übersicht in: Ferguson, 2007; Hanauer, 2006; Snapper, 2007}.

Im Kontext dieser Arbeit sind die beschriebenen *NOD2*-Mutationen nicht nur als Beispiel mehrerer eindeutig mit MC assoziierter SNPs von Interesse. Auch unter dem Aspekt einer möglichen Bedeutung von TLR9 für die Pathogenese der CED verdient *NOD2* aufgrund bekannter synergistischer Effekte besondere Aufmerksamkeit. Van Heel et al. konnten in Versuchen mit PBMCs von gesunden Kontrollen mit Wildtyp *NOD2* und MC-Patienten mit verschiedenen *NOD2*-Mutationen (17 von 19 Patienten in Remission) zeigen, dass die synchrone Stimulation mit Liganden beider Rezeptoren (*NOD2*: MDP, TLR9: CpG-DNA) eine signifikant höhere TNF- α - und Interleukin-8 Sekretion hervorrief, als die Stimulation mit MDP alleine. Dieser kostimulatorische Effekt war bei PBMCs mit einer der *NOD2*-Mutationen nicht nachweisbar. Die Autoren schließen daraus, dass die gleichzeitige Stimulation von

NOD2 und TLR9 zu einer Verstärkung der TLR9-Effekte führt {van Heel, 2005}. Möglicherweise stellt der Verlust dieser synergistischen Effekte einen Teil des entscheidenden Beitrags von *NOD2*-Mutationen zur Pathogenese von MC dar, wobei die für die Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts der Mukosa entscheidenden Folgen der TLR9-Aktivierung fehlen.

1.3.3.3.2 ATG16L1

Das *ATG16L1* (Autophagy related 16-like 1) Gen wurde durch genomweite Scans mit britischen, deutschen und nordamerikanischen Studienpopulationen von Hampe et al. und Rioux et al. als CED-Suszeptibilitätsgen identifiziert {Hampe, 2007; Rioux, 2007}. Bestätigt wurde die beschriebene Assoziation auch in einer weiteren unabhängigen britischen Studie {Cummings, 2007}. Das Genprodukt spielt eine Rolle bei der Autophagozytose, ein Vorgang, der unter anderem Bedeutung bei der Prozessierung von degradierten Zellproteinen, von Antigenen und vor allem von bakteriellen Bestandteilen, aber auch bei der Regulation von Signalkaskaden und entzündlichen Prozessen einnimmt. So ist die Autophagozytose bsw. essentiell zur Eliminierung von *Mycobacterium tuberculosis* in Makrophagen. Im Zellkulturmodell mit humanen HeLa-Zellen, bei denen *ATG16L1* mittels RNA-silencing herunterreguliert wurde, konnte am Beispiel von *Salmonella typhimurium* die Bedeutung von *ATG16L1* für die Autophagozytose gezeigt werden {Rioux, 2007}. *ATG16L1* wird unter anderem in intestinalen Epithelzellen und Leukozyten exprimiert. Allerdings konnten mittels Immunhistochemie keine Unterschiede in der Genexpression von MC-Patienten und Kontrollen gefunden werden {Glas, 2008; Hampe, 2007}. Hampe et al. konnten zeigen, dass der kodierende SNP rs2241880 der am stärksten mit MC assoziierte Genort im *ATG16L1*-Gen ist {Hampe, 2007}. Diese Ergebnisse konnten von Glas et al. bestätigt werden, in deren Studie zudem für den SNP rs 2241879 eine starke Assoziation, sowie signifikante Assoziationen mit MC für weitere sieben *ATG16L1*-Varianten mit MC vorlag. Diese Effekte waren allerdings nicht unabhängig von der Assoziation mit dem SNP rs2241880. Mit CU lag lediglich mit dem SNP rs 6431660 eine schwache Assoziation vor. Bei allen neun Polymorphismen im *ATG16L1*-Gen scheint das seltenere Allel einen protektiven Effekt gegenüber MC zu haben {Glas, 2008}.

1.3.3.3.3 TLR4

TLR4 wird von intestinalen Epithelzellen, wie auch von Zellen des intestinalen Immunsystems exprimiert. Bindet TLR4 in Kooperation mit seinen Korezeptoren CD14 und LBP das LPS, einen Bestandteil der Zellwand der meisten gram-negativen Bakterien, werden über verschiedene Adaptermoleküle Signalkaskaden in Gang gesetzt. An regulatorischen Effekten von TLR4 ist bekannt, dass es zur Aktivierung von NFκB und IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) kommt. Im Tiermodell ergaben sich Hinweise, dass TLR4 außerdem die Heilung von geschädigtem Gewebe im Intestinaltrakt stimuliert {Fukata, 2005}. Das Gen für TLR4 liegt in der chromosomalen Region 9q und befindet sich damit nicht in einer der CED-Kopplungsregionen. Franchimont et al. zeigten 2004 jedoch eine signifikante Assoziation des Polymorphismus Asp299Gly (896 C/T) in diesem funktionellen

Kandidatengen mit MC und CU {Franchimont, 2004}. Diese konnte zwar nicht in allen weiteren Studien bestätigt werden, es ist jedoch ein eindeutiger Trend sichtbar {Arnott, 2004; Braat, 2005; Brand, 2005; Franchimont, 2004; Gazouli, 2005; Lakatos, 2005; Oostenbrug, 2005; Torok, 2004}. In einer Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass die inkonsistenten Ergebnisse vermutlich mit zu geringen Fallzahlen in den einzelnen Studien zu erklären sind, da bei Kombination der Daten die statistische Signifikanz deutlich steigt {Browning, 2007b; Ferguson, 2007}.

1.3.3.3.4 HBD-2, HBD-3 und HBD-4

Patienten mit MC, die eine *NOD2*-Mutation aufweisen, exprimieren geringere Mengen an Defensinen, speziell die α -Defensine in ilealen Paneth-Zellen und die β -Defensine HBD-2, HBD-3 und HBD4 (human beta defensins B2, B3 und B4) im Kolon sind vermindert {Wehkamp, 2004; Wehkamp, 2005}. Defensine dienen dem Schutz vor bakterieller Invasion, dass ihr Verlust in einer CED-ähnlichen Entzündung resultieren könnte, erscheint logisch. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass in jedem der einzelnen Gene der verminderten Defensine Mutationen vorliegen. Es lag nahe, die Ursache für die unterschiedlichen Expressionslevel in dem bereits bekannten "extensive DNA copy number polymorphism" auf Chromosom 8 zu vermuten {Aldred, 2005}. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine geringere Anzahl von Kopien im *HBD-2*-Gen im β -Defensin-Lokus zur Entwicklung von MC, speziell des Kolon prädispositioniert {Fellermann, 2006}. Dieser intuitiv sehr überzeugende Ansatz - weniger Kopien, weniger Defensine - muss noch bezüglich seiner Richtigkeit und Relevanz, wie auch der Verbindung zu *NOD2*-Mutationen, weiter experimentell bestätigt werden .

1.3.3.3.5 TNFSF15

In einer japanisch-britischen Studie wurde eine Assoziation von *TNFSF15* (tumor necrosis factor superfamily, member 15 auf Chromosom 9q33.1, auch als TL1A oder VEGI bezeichnet) mit CED beschrieben {Yamazaki, 2005}. Bei dem Genprodukt handelt es sich um einen TNF-ähnlichen Faktor, der nachweislich in Lamina Propria Zellen von CED-Patienten sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene höher exprimiert wird, als bei gesunden Kontrollen {Bamias, 2003}. Ausgehend von der Pilotstudie konnten in weiteren Fall-Kontroll-Studien mit japanischen und britischen Studienpopulationen low- und high-risk *TNFSF15*-Haplotypen identifiziert werden {Kakuta, 2006; Tremelling, 2008}.

1.3.3.4 Gene der adaptiven Immunantwort

In der Pathogenese der CED scheinen, wie bereits beschrieben, sowohl Funktionsstörungen der angeborenen Immunantwort, wie auch der adaptiven Immunität eine Rolle zu spielen. Genen, die für beide Wege relevant sind, wird dementsprechend spezielles Interesse entgegengebracht.

1.3.3.4.1 MHC

Speziell für CU konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass der IBD3 Locus auf Chromosom 6p, der die MHC (major histocompatibility complex) Region enthält, die konsistentesten Ergebnisse bzgl. einer Kopplung mit CED überhaupt zeigt. Allerdings konnte auch für MC eine Assoziation mit IBD3 nachgewiesen werden. Die MHC-Region stellt den Gen-reichsten Bereich des Säugergenoms dar und spielt eine Schlüsselrolle für Immunität und Autoimmunität {van Heel, 2004}. Besonders gut untersuchte Gene dieses Komplexes sind die *HLA* (human leukocyte antigen) Gene, die für Oberflächenproteine zur Antigen-Präsentation kodieren. Basierend auf einigen frühen Studien zum genetischen Hintergrund der CED wurde eine Assoziation mit *HLA*-Varianten postuliert, allerdings mit sehr geringen Fallzahlen und inkonsistenten Ergebnissen {Mallas, 1976; van den Berg-Loonen, 1977}. Beispiele dafür sind der von Cariappa et al. untersuchte DRB3*0301/DRB1*1302-Haplotyp, der in einer kleinen Studie die stärkste Assoziation aller bisher untersuchten Genorte mit MC aufwies {Cariappa, 1998}. In einer größeren Metanalyse von Stokkers et al. bzgl. der Assoziation von *HLA-DR* und *HLA-DQ* Typen fand sich für den DRB1*0103-Haplotyp eine deutliche Assoziation mit CED, speziell für CU {Stokkers, 1999}. Diese konnte in Studien mit verschiedenen Populationen, u.a. Ashkenazi Juden und nicht-jüdischen Kaukasiern bestätigt werden, wobei auch eine Assoziation mit MC mit Kolonbeteiligung zutage trat {Trachtenberg, 2000; Yang, 2001}. Auch verschiedene Polymorphismen im *MICA* (MHC class I chain gene A) Gen waren in einzelnen Studien statistisch relevant assoziiert, in anderen ließen sich diese Ergebnisse nicht bestätigen {Ding, 2005; Glas, 2001}. Die MHC III Region des MHC befindet sich ebenfalls im IBD3 Locus und enthält u.a. die Gene für verschiedene Komplementfaktoren (C2, C4, Faktor B) und andere Zytokine, wie z.B. TNF- α . Speziell die Promoterregion für TNF- α wurde hinsichtlich krankheitsrelevanter SNPs untersucht, aber auch zu diesem Genort ist die Datenlage unbefriedigend, da sich die teilweise positiven Ergebnisse für einzelne SNPs (-857 C/T assoziiert mit CU und MC, -863 C/A assoziiert mit Kolitis und familiärer Häufung, u.a.) nicht konsistent bestätigen ließen {Levine, 2005; van Heel, 2002}.

1.3.3.4.2 IL-23R

Das Gen für den IL-23R (Interleukin-23 Rezeptor) befindet sich auf Chromosom 1p31 und kodiert für eine Untereinheit des IL-23R. In einer genomweiten Assoziationsstudie konnten Duerr et al. zeigen, dass ein kodierender SNP (rs11209026; Arg381Gln) einen protektiven Effekt gegenüber ilealem MC hat. Dieser Effekt wurde sowohl in einer jüdischen, als auch in einer nicht-jüdischen Studienpopulation im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien bestätigt. In der nicht-jüdischen Gruppe konnte ein protektiver Effekt auch gegenüber CU beobachtet werden {Duerr, 2006}. Zusätzlich wurden weitere, unabhängige nicht kodierende SNPs, die mit MC und CU in Verbindung gebracht {Van Limbergen, 2007b}. IL-23 spielt eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von T-Helferzellen und interagiert mit IL-12. IL-23 bewirkt u.a. die Differenzierung naiver T-Zellen in T_H17-T-Zellen {Steinman, 2007}. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass T_H17-T-Zellen bei der Aufrechterhaltung chronisch-entzündlicher Prozesse autoimmuner Genese, wie auch für die Entstehung intestinaler Entzündung eine zentrale Rolle zukommt {Hue, 2006}. Eine These von Neurath zur Rolle von IL-23 in der Pathogenese der CED geht davon

aus, dass IL-23 sowohl bei der Auslösung der angeborenen, als auch der T-Zell-vermittelten Immunantwort entscheidend sei. Ein defizienter IL-23 Rezeptor könnte zu einer ineffizienten angeborenen Immunantwort führen, was stattdessen die verstärkte T-Zell-Aktivierung nötig machen würde {Neurath, 2007}. Die Erkenntnisse über die Bedeutung von IL23 und IL12 in der Pathogenese der CED hat bereits einen neuen therapeutischen Ansatz hervorgebracht. So hat eine placebokontrollierte klinische Studie mit Antikörpern gegen eine Untereinheit von IL12/IL23 einen erfolgreichem Symptomrückgang bei MC gezeigt {Mannon, 2007}.

1.3.3.5 Weitere Gene

1.3.3.5.1 IBD5 Lokus

Der IBD5 Lokus wurde mit MC in Verbindung gebracht, wobei zahlreiche Gene in dieser Region als ursächlich in Frage kamen. In nächster Nähe zur IBD5 Region befinden sich Gene, die für zahlreiche Zytokine kodieren, wie IL3, IL4, IL5 und IL13 {Ince, 2007}. Mittels Feinkartierung konnte ermittelt werden, dass die Kandidaten in einem 250 kb langem Abschnitt auf Chromosom 5q31 zu suchen sind. Hier liegen u.a. die Gene für SLC22A4 und SLC22A5 (sodium dependent organic cation transporter, auch als OCTN1 und OCTN2 bezeichnet) {Rioux, 2001}. Dabei handelt es sich um Transmembrantransporter vornehmlich für L-Carnitin und organische Kationen. In diesen Genen konnte je ein SNP, dem funktionelle Auswirkungen zugeschrieben wurden, gefunden werden, nämlich 1672 C/T und -207G/C, wobei das homozygote Vorliegen des Haplotyps TC das Relative Risiko für Morbus Crohn erhöht {Peltekova, 2004}. Da die Ergebnisse bezüglich beider aber nur inkonsistente Daten erbrachten, kann noch nicht eindeutig gesagt werden, ob es sich dabei tatsächlich um die verantwortlichen Kandidaten im IBD5 Lokus handelt, oder ob ganz andere SNPs in der Region entscheidend sind. Auch eine Verbindung zwischen dem *NOD2*-Status und *SLC22A4* und *SLC22A5* wurde kontrovers diskutiert {Mirza, 2003; Torok, 2005}.

1.3.3.5.2 DLG5

Das *DLG5* (*Drosophila discs large homologue 5*) Gen liegt auf dem Chromosomenabschnitt 10q23 und wurde durch Feinkartierung der entsprechenden Kopplungsregion entdeckt. DLG5 gehört zur MAGUK-Familie (membran associated guanylate kinase homologues), die in zahlreichen Geweben, u.a. in Herz, Plazenta und den Epithelien des Gastrointestinaltrakts exprimiert werden. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 202kDa und verfügt als typisches MAGUK-Mitglied über zahlreiche funktionelle Bereiche, davon vier PDZ (protein interaction motif) Domänen, eine SH3 (Scr homology 3) und eine inaktive GUK (guanylate kinase) Domäne. Man nimmt an, dass die MAGUK-Proteine als Stützstrukturen im Bereich von Zell-Zell-Kontakten fungieren und sowohl mit dem Zytoskelett als auch mit Adhäsionsmolekülen interagieren. Dabei sollen sie der Übertragung von Signalen an das Zytoskelett und der Erhaltung der epithelialen Integrität und Polarität dienen. Aufgrund seiner zahlreichen funktionellen Bereiche kann man davon ausgehen, dass

DLG5 auch mit unterschiedlichen Proteinen interagiert. Nakamura et al. gelang es zu zeigen, dass DLG5 mit p55, einem Membranprotein einen Komplex bildet. Dieser soll zahlreiche intrazelluläre Moleküle ansammeln, die die epitheliale Integrität und Polarität erhalten und außerdem der Signaltransduktion dienen {Nakamura, 1998}. Dass CED auch als typische Barrierefunktionsstörungen interpretiert werden können, machte *DLG5* zu einem vielversprechenden Suszeptibilitätsgen-Kandidaten. Stoll und Mitarbeiter haben eine Assoziation von verschiedenen SNPs im *DLG5*-Gen mit CED beschrieben {Stoll, 2004}. Diese Assoziation konnte jedoch nicht bestätigt werden, so dass die Bedeutung von *DLG5* als CED-Suszeptibilitätsgen fraglich bleibt {Browning, 2007}.

1.3.3.5.3 ABCB1

Das Gen *ABCB1* (ATP-binding cassette subfamily B member 1, auch als MDR1 bezeichnet) liegt auf Chromosom 7q21.1 und kodiert für einen ATP-abhängiges Transporterprotein, P-glykoprotein 170. Dieses wird in zahlreichen Geweben exprimiert, unter anderem auf der apikalen Oberfläche intestinaler Epithelzellen, wo es dem Schutz vor Xenobiotika dient. Auch eine Funktion für die Abgabe zellulärer Toxine, deren Anhäufung die Zelle schädigen könnte, wird diskutiert {Ince, 2007}. Die P-gp 170 Expression ist interindividuell sehr unterschiedlich, was sich nicht nur auf die Metabolisierung zahlreicher Pharmaka, sondern auch auf die Suszeptibilität gegenüber zahlreichen Erkrankungen, u.a. CED auswirkt {Ferguson, 2005}. Interessanterweise entwickelten *ABCB1*-defiziente Mäuse spontan Entzündungen des Gastrointestinaltraktes {Panwala, 1998}. Die Datenlage ist für eine Assoziation von SNPs im *MDR1*-Gen mit CU etwas stabiler als für MC. Der Polymorphismus mit der bislang stärksten Evidenz ist C3435T, gefolgt von G2677 A/T. Beide konnten mit einer verringerten P-gp 170 Expression in Verbindung gebracht werden. Ob jedoch tatsächlich diese beiden von entscheidender Bedeutung in der Entstehung von CED sind, oder die Suche fortgesetzt werden muss, ist noch nicht abschließend geklärt {Onnie, 2006}.

1.4 TLR9

1.4.1 Toll-like-Rezeptoren

Da verschiedene SNPs im *TLR9* Thema dieser Arbeit sind, soll auf die Familie der TLRs und ihre Funktion im Allgemeinen und *TLR9* im Speziellen näher eingegangen werden. Die Familie der Toll-like Rezeptoren (tlr) besteht aus phylogenetisch stark konservierten Transmembranproteinen, die als sogenannte "Pattern Recognition Receptors" (PRR) im Rahmen des angeborenen Immunsystems der Erkennung von "pathogen associated molecular patterns" (PAMP) dienen. Als PAMP werden ebenfalls stark konservierte, weitverbreitete, jedoch vom PRR-tragenden Individuum nicht exprimierte Moleküle bezeichnet, die die Erkennung von potentiell pathogenen Mikroorganismen ermöglichen. Die Bezeichnung "Toll-like" bezieht sich auf die Ähnlichkeit zu dem 1985 von Nüsslein-Volhard identifizierten *Drosophila* Toll-Gen. TLRs werden auf Zell- und Kompartment-Oberflächen von Phagozyten, also von

Granulozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen, teilweise auch vom intestinalen Epithel, exprimiert. Überwinden vom Immunsystem als pathogen eingestufte Erreger die physikalischen Grenzen wie Haut oder Schleimhaut, werden ihre Bestandteile als Liganden direkt oder über Korezeptoren und weitere an der Ligandenbindung beteiligte Moleküle gebunden. So sind bsw. an der Aktivierung von TLR4 durch LPS der Korezeptor MD-2 (auch als "Lymphocyte Antigen 96" bezeichnet) zusammen mit LBP (LPS binding protein) und CD14 beteiligt. Über intrazelluläre Signalkaskaden induzieren TLRs dann zunächst eine unspezifische Immunantwort über die Aktivierung zahlreicher Gene, u.a. für Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide. Außerdem kommt ihnen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Maturation dendritischer Zellen zu {Schnare, 2001}. Zu den bereits bekannten Liganden der TLRs gehören u.a. LPS, Flagellin, dsRNA, Lipopeptide, verschiedene synthetische Moleküle und CpG DNA. Auch einige endogene Moleküle, darunter Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Hyaluronsäure oder Heparansulfat, aber auch intrazelluläre Proteine wie diverse Hitzeschockproteine können an verschiedene TLRs binden (siehe Tabelle 1). Die TLRs bilden mit den IL1-Rezeptoren eine Super-Familie, da diese Rezeptoren die TIR (Toll-IL-1 Rezeptor) Domäne gemeinsam haben. Während IL-1 Rezeptoren die TIR, Typ 1 enthalten und die TIR, Typ 3 Bestandteil zahlreicher TLR- Adaptermoleküle ist, tragen TLRs die TIR, Typ 2. Sie werden sowohl von Vertebraten, als auch von Invertebraten exprimiert, in Teilen auch von Pflanzen und Bakterien, weshalb man davon ausgeht, dass sie einen der ältesten und am stärksten konservierten Teil des Immunsystems darstellen. Während die Entdeckung von PAMPs wie Lipopolysaccharid (LPS) (zunächst als Endotoxin bezeichnet), bakteriellen Lipopeptiden oder auch Flagellin schon längst erfolgt war, und man auch deren immunaktivierende Wirkung kannte, konnte erst 1996 von Jules A. Hoffmann gezeigt werden, dass Toll bei Drosophila eine Rolle in der Bekämpfung von Pilzinfektionen einnimmt. Nach dieser Erkenntnis, der die Charakterisierung von TLR4 ebenso wie die Aufklärung der teilweise mit Toll homologen Struktur und Funktion des IL-1 Rezeptors vorausgegangen waren, gelang es Beutler et al. 1998 endgültig die Funktion von TLR4 im Mausmodell aufzuklären {Poltorak, 1998}. Stück für Stück erfolgte daraufhin die Aufdeckung der weiteren TLRs und die Zuordnung ihrer Liganden. Derzeit sind 10 vom Menschen exprimierte TLRs bekannt (siehe Tabelle 1).

Man nimmt an, dass TLRs in Form von Dimeren vorliegen, zumeist in Homodimeren, im Falle von TLR2 als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6. Wie schon beschrieben benötigen manche TLRs Korezeptoren. Desweiteren spielen die bereits erwähnten Adaptermoleküle eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Von fast allen TLRs wird Myd88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) benötigt {Fitzgerald, 2001}. Außerdem bekannt sind Tirap (TIR domain containing adaptor protein) {Shigeoka, 2007}, Trif (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) {Yamamoto, 2002} und Tram {Yamamoto, 2003}. Über den Adapter werden weitere Moleküle aktiviert, darunter zahlreiche Proteinkinasen, u.a. IRAK1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1), IRAK4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4) und TBK1 (TANK-binding kinase 1) die zu einer Amplifizierung des Signals führen. Am Ende der Signalkaskade erfolgt die Induktion oder Suppression zahlreicher Gene der Immunantwort. Über die TLRs wird insgesamt die Expression von tausenden von Genen moduliert, sie nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem ein {Übersicht in: Various, 2008}.

Tabelle 1 TLR-Familie {Übersicht in: Various, 2008}

Rezeptor	Liganden	Ort der Expression	Herkunft des/der Liganden	Exprimierende Zellen
TLR1	verschiedene Triacyl-Lipopeptide	Zelloberfläche	Bakterien	Monozyten/ Makrophagen Dendritische Zellen B-Lymphozyten
TLR2	bakterielle Glykopeptide, Lipopeptide, Lipoproteine, Lipoteichon-säure	Zelloberfläche	Bakterien Pilze Wirtszellen	Monozyten/ Makrophagen Myeloische dendritische Zellen Mastzellen
TLR3	dsRNA	Kompartment-oberfläche	Viren	Dendritische Zellen B-Lymphozyteng
TLR4	LPS, diverse Hitzeschockproteine, Fibrinogen, Heparansulfate, Hyaluronsäure, u.a.	Zelloberfläche	Bakterien Wirtszellen	Monozyten/ Makrophagen Myeloische dendritische Zellen Mastzellen Intestinale Epithelzellen
TLR5	Flagellin	Zelloberfläche	Bakterien	Monozyten/ Makrophagen Dendritische Zellen Intestinale Epithelzellen
TLR6	verschiedene Diacyl-Lipopeptide	Zelloberfläche	Mykoplasmen	Monozyten/ Makrophagen Mastzellen B-Lymphozyten
TLR7	Imidazolquinolin, Loxoribin, Bropirimin, single-stranded RNA	Kompartimentoberfläche	synthetisch	Monozyten/ Makrophagen Plasmazytoide dendritische Zellen B-Lymphozyten
TLR8	small synthetic compounds; single-stranded RNA	Kompartimentoberfläche	synthetisch	Monozyten/ Makrophagen Dendritische Zellen Mastzellen
TLR9	nicht-methylierte CpG-DNA	Kompartimentoberfläche	Bakterien Viren	Monozyten/ Makrophagen Plasmazytoide dendritische Zellen B-Lymphozyten
TLR10	unbekannt	Zelloberfläche	unbekannt	Monozyten/ Makrophagen B-Lymphozyten

In Bezug auf CED sind im Hinblick auf die postulierten Pathomechanismen speziell TLRs die eine Rolle bei der Erkennung von bakteriellen Strukturen einnehmen von Interesse, darunter TLR4 und TLR9. Auch TLR 1, 2, 5 und 6 könnten in der Pathogenese von CED eine Bedeutung haben {Gewirtz, 2006; Pierik, 2006a}

1.4.2 TLR9

TLR9 wurde im Jahr 2000 zum ersten Mal geklont, und seine Rolle als Rezeptor für CpG-ODNs, für virale und für bakterielle DNA aufgeklärt {Hemmi, 2000}.

TLR9-Expression, Lokalisation und Struktur

TLR9 wird intrazellulär auf Membranen des Endoplasmatischen Retikulums exprimiert, auch eine Expression auf Zelloberflächen konnte nachgewiesen werden. Nach entsprechender Stimulation der Zelle kommt es zur Translokation auf endosomale und lysosomale Oberflächen. Zahlreiche Zellen der Immunabwehr exprimieren den Rezeptor, u.a. conventional dendritic cells (cDCs) und plasmacytoid dendritic cells (PDCs), IFN-producing natural killer dendritic cells (IKDCs), humane tonsilläre Zellen und B-Lymphozyten {Eaton-Bassiri, 2004; Kumagai, 2008; Latz, 2004}. Außerdem findet sich TLR9 in intestinalen Epithelzellen, speziell in Paneth-Zellen {van Heel, 2005} und in sehr geringen Mengen in T-Zellen und NK-Zellen {Hornung, 2002}. TLR9 ist ein Typ I membranständiges Protein, das sich aus fünfzehn LRR, die sich auf der Membranninnenseite des Kompartments befinden, einer innerhalb der Membran lokalisierten Domäne und der für die Toll/IL-1R Familie spezifischen TIR auf der zytosolischen Seite zusammensetzt. Man geht davon aus, dass die von 32 Aminosäuren geformte C-terminale helikale Struktur entscheidend für die Signalübertragung durch TLR9 ist (siehe Abbildung 1){Kumagai, 2008}. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die TLR9-Expression durch Stimulation mit LPS, Interferon- γ , CpG ODN (also einem eigenen Liganden) und durch Aktivierung von B-Zell-Rezeptoren hochreguliert wird {Eaton-Bassiri, 2004}.

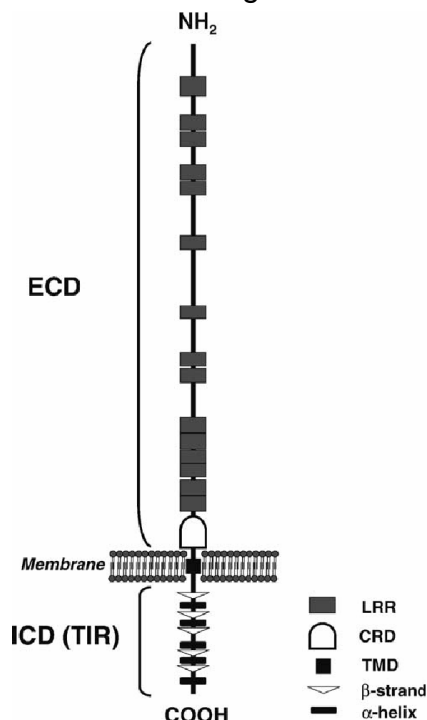


Abbildung 1 TLR9 Proteinstruktur {aus: Takeshita, 2004}

TLR9-Liganden

Als Ligand fungiert nach derzeitigem Verständnis in erster Linie nicht-methylierte CpG-DNA bakterieller oder viraler Herkunft. Dabei steht das "p" in der Bezeichnung

für das Phosphatrückgrat der DNA und soll eine Verwechslung mit einem CG-Paar verhindern. Bei sogenannter "CpG-DNA" handelt es sich um DNA-Abschnitte, die einen erhöhten Gehalt (>60%) an Cytosin und Guanin im Vergleich zum restlichen Genom (<40%) enthalten. Während beim Menschen 70% -80% des Cytosin in CpG-Inseln zu 5-Methylcytosin methyliert vorliegen, findet sich bei Bakterien ein hoher Anteil unmethylierter CpG-DNA, weshalb sie sich hervorragend als PAMP eignen würden, und bislang auch als solches betrachtet wurde {Jabbari, 2004; Various, 2008}. Die Effektivität der TLR9 Aktivierung durch synthetische CpGs ist Spezies- und Sequenz-abhängig, so unterscheidet sich im Modell die optimale Sequenz für den murinen und den humanen TLR9 {Bauer, 2001}. Es ist bekannt, dass bei Verwendung synthetischer DNA je nach Sequenz unterschiedliche Effekte dominieren. Drei unterschiedliche Typen solcher CpG-Motive sind bekannt. Während Typ A (ODN 2216) vor allem Interferon- α in PDCs induziert, fördert Stimulation mit Typ B (ODN 2006) Überleben, Aktivierung und Maturation von DCs und die B-Zell-Proliferation {Krug, 2001}. Typ A wird durch eine palindromische CpG-Sequenz mit Phosphodiester-Rückgrat und durch poly-G-Motive mit Phosphotriphosphate-Rückgrat am 5'- und 3'-Ende charakterisiert. Das potenteste Typ B CpG-Motiv trägt am 5'-Ende das TCGTCG-Motiv und enthält ein GTCGTT-Motiv, es ist durchgehend mit einem Phosphotriphosphate-Rückgrat versehen. Typ C vereint einige spezifische strukturelle Elemente der beiden anderen Typen und induziert die Aktivierung beider TLR9-exprimierender Zelllinien des Immunsystems, also sowohl der B-Zellen als auch der PDCs {Hartmann, 2000; Kumagai, 2008}. Zu beachten ist, dass bei den verwendeten ODNs das Phosphatrückgrat modifiziert ist, um eine erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen zu gewährleisten. Die beschriebenen ODNs sind teilweise an PS (Phosphotriphosphat 2'-Desoxyribose) gebunden, während in vivo vorkommende CpG-Motive das natürliche PD (Phosphodiester 2'-Desoxyribose) Rückgrat aufweisen. Wagner et al. folgern aus ihren neuesten Ergebnissen, dass die Sequenz-abhängige TLR-9 induzierte Antwort auf an PS gebundene, synthetische ODNs beschränkt sei. In vivo dagegen käme die entscheidende Bedeutung der Erkennung des PD-Gerüsts zu. Damit würde sich TLR9 in die Reihe der anderen Nukleinsäuren-detektierenden, ebenfalls endosomal lokalisierten Rezeptoren TLR3, 7 und 8, die Sequenz-unabhängig aktiviert werden, einfügen. Die Aufnahme und endosomale Reifung von CpG-DNA scheint zwingend notwendig, um die Signalkaskade in Gang zu setzen. So konnten Häcker et al. zeigen, dass Chloroquin und andere Substanzen, die die Ansäuerung von Endosomen inhibieren, die TLR9-Signaltransduktion unterbrechen {Hacker, 1998}. Die unentbehrliche Unterscheidung zwischen self- und non-self schreibt Wagner nicht der für Bakterien typischen CpG-Dichte oder der fehlenden Methylierung zu, sondern sieht sie allein durch die endosomale Lokalisation gewährleistet {Wagner, 2008}. Barton et al. gelang es, die Intermembrandomäne von TLR9 mit der von TLR4 zu ersetzen, und dadurch seine Expression auf der Plasmamembran zu erreichen. Self-DNA wurde daraufhin von TLR9 als Ligand erkannt und löste eine Immunantwort aus {Barton, 2006}. Dies scheint Wagners These von der Lokalisation als entscheidendem Faktor zum Schutz vor Fehlaktivierung zu bestätigen. Weitere Liganden sind bakterielle DNA, im Experiment gezeigt an den Beispielen von Infektionen mit *M.tuberculosis* {Bafica, 2005}, *Streptococcus pneumoniae* {Lee, 2007} und *Brucella melitensis* {Copin, 2007}. Im Mausmodell konnte auch durch virale DNA von MCMV {Krug, 2004a}, HSV, Typ 1 {Krug, 2004b} und Typ 2 {Lund, 2003} und Adenoviren {Zhu, 2007} eine TLR9 Aktivierung beobachtet werden. Außer DNA scheint auch Haemozoin aus dem Malariaerreger *Plasmodium* als TLR9 Ligand zu fungieren. Das als Endprodukt des Haemoglobin-Abbaus durch Plasmodien anfallende Polymer Haemozoin wirkte in

in vitro auch bei gleichzeitiger Zerstörung der Plasmodien-DNA durch DNAsen als Agonist von TLR9 {Coban, 2005; Kumagai, 2008}. Desweiteren scheint, wie schon beschrieben, auch das basenfreie Phosphodiester-Rückgrat zur TLR9 Aktivierung ausreichend zu sein {Wagner, 2008}.

TLR9-Signalkaskaden und Effekte

In vivo wird über TLR9 primär die T_H1-gesteuerte humorale und zelluläre Abwehr aktiviert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es nach TLR9-Aktivierung zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und zur Induktion der T_H1-vermittelten Immunantwort und Proliferation von B-Zellen kommt {Hartmann, 2003}. Ähnlich wie TLR4 setzt TLR9 ebenfalls über MyD88 die IRAK1-TRAF6-TAK1-Signalkaskade zur Aktivierung von NFκ-B in Gang. Außerdem induziert TLR9 in PDCs die Interferon-α-Produktion, ebenfalls über einen IRAK4/IRAK1-Pathway, der zwar MyD88, nicht jedoch TRAF6 abhängig ist {O'Neill, 2007}. Teil der Signalkaskaden sind diverse MAPKs (mitogen-activated protein kinases), wie z.B. p38, JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), ERK (extracellular receptor kinase) und NIK (NFκ-B-inducing kinase)-IKK-IκB-Pathways {Hacker, 1999; Hartmann, 2000; Yi, 2002}. Den Endpunkt der Reaktionswege stellt die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren dar, u.a. NFκ-B, AP-1 (Activating Protein 1), IRF-5 (IFN-regulatory factor 5), C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) und CREB (c-AMP-responsive element-binding protein). Diese regulieren ihrerseits direkt die Expression zahlreicher Zytokin- und Chemokin-Gene, u.a. TNF-α, IL-6 und IL-12 {Kumagai, 2008}.

Ein bereits im Detail gut erforschter Reaktionsweg, die Aktivierung von NFκ-B, soll hier exemplarisch etwas detaillierter dargelegt werden. Nach MyD88-Aktivierung durch TLR9 interagiert dieses mit IRAK-1 (Interleukin-1 receptor associated kinase-1) und IRAK-4 (Interleukin-1 receptor associated kinase-4) über seine DD (Death domain). Dabei stellt IRAK-1 das Substrat von IRAK-4 dar und bewirkt im phosphorylierten Zustand die Rekrutierung von TRAF6 (Tumor necrosis factor associated factor 6) {Kawagoe, 2007}. TRAF6 ist eine E3 Ubiquitin Ligase und katalysiert Polyubiquitinierungen vom Typ K63 zusammen mit UBC13 und Uev1A {Deng, 2000}. Downstream von TRAF6 kommt es zur Aktivierung von TAK1 (Transforming growth factor-β associated kinase 1) und damit zur Bildung des IKK (IκB kinase complex). Die Phosphorylierung von IκB induziert dann die Translokation von NFκ-B in den Nukleus, der als Transkriptionsfaktor direkt die Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Genprodukte reguliert {Kumagai, 2008}. Weitere wichtige Komponenten für die Funktion von TLR9 sind Kinasen, die den Transport von DNA-Fragmenten in Endosomen gewährleisten, wie bsw. PI3 K (Phosphoinositide 3 kinase){Ahmad-Nejad, 2002; Kuo, 2006}.

TLR9-Genetik

Das Gen für TLR9 befindet sich in der Chromosomenregion 3p21.3, einer Region, die bis dato noch nicht als Kopplungsregionen identifiziert worden war. Allerdings konnten solche in nächster Nähe, nämlich in den Abschnitten 3p21.1 und 3p21.2 gefunden werden {Satsangi, 1996}. Lazarus et al. sequenzierten 2003 die beiden Exons im *TLR9*-Gen mit jeweils 1500 BP in 5'- und 3'-Richtung und beschrieben zwanzig verschiedene SNPs (siehe Abbildung 2).



Abbildung 2 *TLR9*-Gen mit einer Auswahl von SNPs (gekennzeichnet sind der Transkriptionsstart (TS), der Translationsstart (0) und die Lage der Polymorphismen relativ zum Startcodon) {aus: Hamprecht, 2005}

Es fanden sich vier SNPs mit einer Frequenz des selteneren Allels von über 10% in mindestens zwei der betrachteten Populationen, nämlich -1486 C/T mit 41%, -1237 C/T mit 16%, 1174 A/G mit 44% und 2848 A/G mit 49%. Ein weiterer Polymorphismus konnte bei Afro-Amerikanern nicht, in der europäischen und hispanischen Gruppe aber mit einer Frequenz des seltenen Allels von 3% bzw 4% nachgewiesen werden. Die Autoren fanden sieben Haplotypen, von denen die vier häufigsten durch die Polymorphismen -1237 C/T und 2848 A/G unterschieden werden können. Zieht man zusätzlich die SNPs -1486 C/T und 1174 A/G heran, können alle sieben Haplotypen unterschieden werden (siehe Tabelle 2) {Lazarus, 2003}.

Tabelle 2 Die sieben häufigsten *TLR9*-Haplotypen in verschiedenen ethnischen Gruppen {aus: Lazarus, 2003}

TLR9 haplotypes inferred using 10% or greater SNPs

Haplotype ^a				All		African American		European American		Hispanic American	
-1486	-1237 ^b	1174	2848 ^b	N	Percentage	N ^c	Percentage	N ^c	Percentage	N ^c	Percentage
T	T	A	G	60	42.3	21	43.8	20	43.5	19	39.6
C	T	G	A	57	40.1	12	25.0	18	39.1	27	56.2
T	C	G	A	13	9.2	04	8.3	07	15.2	02	4.2
T	C	G	G	05	3.5	05	10.4	00	0.0	00	0.0
C	T	G	G	03	2.1	03	6.2	00	0.0	00	0.0
C	C	G	G	03	2.1	03	6.2	00	0.0	00	0.0
T	T	G	A	01	0.7	00	0.0	01	2.2	00	0.0
Total				142		48		46		48	

^a Haplotypes inferred using Phase for the 4 SNPs >10% in the order shown in Table 1.

^b These two SNPs allow unambiguous distinction between the four most common haplotypes.

^c $P < 0.0000001$ using Fisher's Exact test.

Berghöfer et al. beobachteten 2005 in einer Population von 527 gesunden Individuen deutscher Herkunft elf Haplotypen, die sich durch die fünf häufigsten Polymorphismen im *TLR9*-Gen differenzieren lassen (siehe Tabelle 3) {Berghofer, 2005}.

Tabelle 3 Die elf *TLR9*-Haplotypen nach Berghöfer et al. {Berghofer, 2005}

Frequenz (%)	Haplotyp				
	-1923 A/C	-1486 T/C	-1237 T/C	1174 G/A	2848 G/A
43,61	A	T	T	A	G
36,81	A	C	T	G	A
13,15	A	T	C	G	A
4,58	C	C	T	G	A
0,50	A	T	T	G	A
0,32	A	C	T	A	A
0,30	A	T	C	G	G
0,20	A	C	T	A	G
0,19	A	T	T	G	G
0,19	A	C	C	G	G
0,17	A	C	C	G	A

1.4.3 Die Bedeutung von *TLR9*-Polymorphismen für verschiedene Erkrankungen

Aufgrund seiner Schlüsselposition bei der Vermittlung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort wurde und wird eine mögliche Rolle von *TLR9* für zahlreiche Erkrankungen, die entweder das Immunsystem beeinträchtigen, oder auf einer Überaktivität des Immunsystems zu basieren scheinen, diskutiert und erforscht. Da unter Umständen auch körpereigene DNA nach neueren Erkenntnissen zu einer *TLR9*-Aktivierung führen kann (siehe 1.4.2 *TLR9* - *TLR9*-Liganden), rückten auch Krankheiten autoimmuner Genese zunehmend ins Blickfeld der Forschung. Ein relativ einfacher, möglicher Ansatz besteht dabei in genetischen Assoziationsstudien, die ein überzufällig gehäuftes Auftreten genetischer Veränderungen bei Individuen mit bestimmten Erkrankungen nachzuweisen versuchen. Für verschiedene Polymorphismen im *TLR9*-Gen wurden solche Assoziationsstudien mit SLE-, Asthma- und RA-Patienten, für ein erhöhtes Atopie-Risiko und für HIV-Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf durchgeführt. Dabei konnte keine Assoziation mit Rheumatoider Arthritis oder einem erhöhten Atopie-Risiko nachgewiesen werden {Berghofer, 2005; Hamprecht, 2005}. Eine einzige japanische Studie berichtet von einer Assoziation des G-Allels des 1174 A/G SNP mit SLE, die sich in zahlreichen anderen Studien nicht bestätigte, und folglich entweder als falsch positiv, oder aber als Populations-spezifisch betrachtet werden muss {Hur, 2005; Tao, 2007}. In dieser Studie wird außerdem eine verminderte Expression von *TLR9* mit diesem Allel in Verbindung gebracht {Tao, 2007}. Lazarus et al. konnten eine schwache Assoziation des C-Allels des -1237 C/T Polymorphismus mit Asthma in einer europäischen Studienpopulation zeigen {Lazarus, 2003}. In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob SNPs im *TLR9*-Rezeptor bei HIV1-positiven Individuen mit dem Krankheitsverlauf korreliert sind. Es zeigte sich, dass das G-Allel des 2848 A/G und das A-Allel des 1174 A/G Polymorphismus mit einem rasch fortschreitenden Verlauf der Erkrankung assoziierten. Bislang wurden zwei Polymorphismen im *TLR9*-Gen, nämlich die SNPs -1273 C/T und 2848 A/G auf eine mögliche Assoziation mit CED überprüft. In unserer Arbeitsgruppe konnte in einem deutschen Kollektiv die Frequenz dieser beiden Polymorphismen bei 174 Patienten mit MC, 138 Patienten mit CU und 265 gesunden Kontrollpersonen untersuchen und eine Assoziation des -1273 C/T Polymorphismus

mit MC, allerdings nicht mit CU zeigen {Torok, 2004a}. In einer weiteren Veröffentlichung der Arbeitsgruppe ließ sich die ursprünglich beobachtete Assoziation in einem größeren Patientenkollektiv zwar nicht reproduzieren, es konnten jedoch signifikante Interaktionen zwischen dem *TLR9* -1237C/T Polymorphismus und den mit MC assoziierten *NOD2*-Mutationen ermittelt werden. Zusätzliche signifikante Interaktionen lagen mit verschiedenen Varianten im *IL23R*-Gen und mit dem SNP *DLG2* 113G/A vor {Torok, 2009}. Lammers et al. beschrieben eine erhöhte Frequenz der Kombination der Allele *TLR9* -1237 C und *CD14* -260C bei CU Patienten mit chronisch rezidivierender Pouchitis im Vergleich mit CU Patienten mit seltener Pouchitis {Lammers, 2005}.

1.4.4 Mögliche Bedeutung von TLR9 in der Pathogenese der CED

Verschiedene Rollen von TLR9 in der Pathogenese der CED sind denkbar und teilweise schon untersucht worden. Im Folgenden soll ein Überblick über diese gegeben werden.

1.4.4.1 Gestörte Barrierefunktion

Eine häufig vertretene These zur Pathogenese der CED geht von einer gestörten Barrierefunktion der Epithelzellen aus, die in vermehrtem Eindringen von Bakterien in die Mukosa und der damit verbundenen Rekrutierung immunaktiver Zellen resultiert. Im Zellkulturversuch mit polarisierten Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen von basolateral mit Interferon α zu verminderter Apoptose und verminderter Auflösung von Tight Junctions führt {Katakura, 2005}. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von TLR9 auf den in der Mukosa präsenten DCs und die damit verbundene Ausschüttung von Interferon- α zur Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt beiträgt.

1.4.4.2 Verminderte Sekretion von Defensinen

Defensine, kleine, kationische, cystinreiche Peptide mit mehreren Disulfidbrücken und zahlreichen hydrophoben Aminosäuren, dienen der unspezifischen Abwehr von Bakterien, Pilzen und behüllten Viren. Im Gastrointestinaltrakt werden von Paneth-Zellen α -Defensine sezerniert, die dazu beitragen, übermäßiges Bakterienwachstum zu vermindern. β -Defensine werden von verschiedenen Leukozyten und Epithelzellen exprimiert. Dass bei Patienten mit MC, speziell wenn *NOD2*-Mutationen vorliegen, vermindert α -Defensine exprimiert werden, ist bekannt, und wird als einer der pathogenetischen Effekte der *NOD2*-Mutationen betrachtet {Kobayashi, 2005; Wehkamp, 2004}. Auch ein Copy-Number Polymorphismus im *HBD2*-Gen zeigt eine Assoziation mit MC mit Befall des Kolon, wobei mit einer Kopienzahl kleiner 4 das Risiko an einer CED zu erkranken steigt. Bei dieser genetischen Veränderung wird ebenfalls angenommen, dass die verminderte Expression von Defensinen (infolge einer geringeren Kopienzahl des Gens) den entscheidenden, pathogenen Faktor

darstellt {Fellermann, 2006}. TLR9 konnte auf sekretorischen Granula von Paneth-Zellen nachgewiesen werden. Die Aktivierung dieser TLR9-Rezeptoren führt zur Degranulation der Defensin-enthaltenden Granula {Rumio, 2004}. Eine beeinträchtigte Stimulation der Degranulation von Defensin-enthaltenden Granula in Paneth-Zellen durch TLR9-Veränderungen könnte ebenfalls zu einem Mangel an Defensinen führen oder aber diesen in Kombination mit anderen Defekten verstärken. Dies würde sich in das Modell der beeinträchtigten unspezifischen Immunantwort als eine ursächliche Komponente bei der Pathogenese der CED einfügen. Gemäß dieser Vorstellung führt die nicht ausreichende Eliminierung von Mikroorganismen durch das angeborene Immunsystem zu einer fortwährenden, pathologischen Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

1.4.4.3 Fehlende anti-inflammatorische Effekte

Es gibt eine Reihe von Hinweisen auf anti-inflammatorische, protektive Effekte von TLRs, einige davon spezifisch von TLR9 aus Tiermodellen. So erwiesen sich TLR/MyD88-defiziente Mäuse als deutlich anfälliger für Kolitis, im Modell ausgelöst mit DSS {Rakoff-Nahoum, 2004}. Katakura et al. konnten im Mausmodell einen protektiven Effekt von TLR9, der nachweislich über Typ I-Interferone vermittelt wurde, zeigen. In *TLR9* -/-Mäusen konnten die Autoren mit deutlich geringeren Dosen von DSS eine Kolitis induzieren als in Wildtyp-Versuchstieren. Kolonzeptelzellen der *TLR9* -/-Mäuse zeigten eine erhöhte Aktivität von NFκ-B {Katakura, 2005}. Auch die antiinflammatorischen Effekte von Probiotika scheinen TLR9-vermittelt zu sein, da sie zwar in TLR2 und TLR4-defizienten Mäusen zu beobachten sind, in *TLR9*- oder *MyD88*-defizienten Mäusen jedoch wegfallen. Auf TLR9 als entscheidenden Rezeptor für die Wirkung von Probiotika weist zudem hin, dass isolierte CpG-DNA von Probiotika dieselben Effekte wie lebende, vermehrungsfähige Organismen hat, und TLR9 bislang den einzigen bekannten Rezeptor für CpG-DNA darstellt. {Rachmilewitz, 2004}. Dieser Ansatz, der davon ausgeht, dass eine beeinträchtigte Funktion von TLR9 in Form von fehlenden, anti-inflammatorischen Signalen zur Pathogenese der CED beiträgt, passt in die Vorstellung von einer überschießenden Immunantwort aufgrund mangelnder Downregulation als ursächlichem Problem.

1.4.4.4 Verlust der Polarität

Anders als in B-Lymphozyten oder DCs wird TLR9 von IEC auf der Zelloberfläche exprimiert, und zwar sowohl apikal, als auch basolateral {Lee, 2008}. TLR9 scheint dabei je nach Ausrichtung des Rezeptors auf IECs unterschiedliche Effekte zu haben. Apikale Stimulation der IECs mit TLR9-Liganden führt über die Blockade der Degradation von ubiquitiniliertem IκBα zur Inhibition von NFκ-B. Basolaterale Stimulation hat einen gegenteiligen Effekt, es kommt zur IκBα-Degradation und zur Aktivierung von NFκ-B. Zudem konnten Lee et al. zeigen, dass bei apikaler Stimulation Gene aktiviert wurden, die nicht dem NFκ-B-pathway zugeordnet sind. So bewirkt die apikale Stimulation von Paneth-Zellen über den Wnt-Pathway unter anderem die Aktivierung von Genen für verschiedene Defensine. Die vorrausgehende apikale Stimulation von IECs mit TLR9-Liganden führte in vitro zur

verminderten Sensitivität auch gegenüber basolateraler Stimulation von TLR9. Es wurde eine Toleranz gegenüber luminalen Liganden, nicht nur für TLR9 sondern auch für TLR2, TLR3 und TLR5 ausgelöst. Nach vorhergehender apikaler TLR9-Stimulation konnte weder durch apikale, noch durch basolaterale Stimulation von TLR2, TLR3 und TLR5 eine Interleukin-8 Expression induziert werden. Außerdem belegten die Autoren im in-vivo-Versuch, dass *TLR9* -/-Mäuse eine deutlich niedrigere Reizschwelle für die NFκ-B-Aktivierung aufweisen und dadurch empfänglicher für experimentell ausgelöste Kolitis werden {Lee, 2006; Lee, 2008}. Damit gelang es Lee et al. nicht nur, ein einzigartiges Beispiel organspezifischer Funktion des angeborenen Immunsystems zu demonstrieren, sie bewiesen auch die Wichtigkeit der Polarität der IECs und die herausragende Bedeutung von TLR9 für die Aufrechterhaltung des mukosalen Gleichgewichts zwischen Toleranz und Abwehr. Somit könnte sowohl ein Verlust der Polarität der IECs, wie auch eine veränderte TLR9-Funktion u.a. über NFκ-B zur Entstehung und Aufrechterhaltung der überschießenden Immunantwort beitragen. Auch bei dieser Vorstellung steht somit ein Zuviel an proinflammatorischen Signalen infolge einer mangelnden Downregulation im Zentrum.

2. Zielsetzung der Arbeit

Bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen handelt es sich um Krankheitsbilder mit multifaktorieller Ätiologie. Dabei nehmen umweltbedingte wie auch genetische Faktoren eine bedeutende Rolle ein. Die Bakterien der intestinalen Flora scheinen im Krankheitsgeschehen einen wichtigen Faktor darzustellen. Die Assoziation von Mutationen im *NOD2*-Gen mit Morbus Crohn lieferte nicht nur das erste wiederholt bestätigte Suszeptibilitätsgen sondern auch einen Hinweis auf die Rolle des angeborenen Immunsystems für die Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Die beobachteten Assoziationen von SNPs im *IL-23* Rezeptor mit Morbus Crohn und teilweise auch Colitis ulcerosa bringen den ersten genetischen Beweis für die Bedeutung der adaptiven Immunität für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. Für einen Beitrag von TLR9, als Rezeptor für bakterielle CpG-DNA und zugleich als Vermittler zwischen adaptiver und angeborener Immunantwort, zu der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen gibt es bereits verschiedene Anhaltspunkte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob sich aus der Sicht möglicher genetischer Assoziationen weitere Hinweise auf eine Rolle von TLR9 in der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ergeben.

Es sollte untersucht werden, ob sich Assoziationen für verschiedene im *TLR9*-Gen beschriebene Polymorphismen mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa nachweisen lassen. Dafür wurden die beiden Promotorpolymorphismen -1923 A/C und -1486 C/T, sowie der SNP 1174 A/G im Intron 1 des *TLR9*-Gens ausgewählt. Diese Polymorphismen sind nach den SNPs -1237 T/C und 2848 G/A bei Kaukasiern die häufigsten im *TLR9*-Gen. Mit den genannten drei Polymorphismen lassen sich in Kombination mit den SNPs -1237 C/T und 2848 A/G, für die die untersuchte Studienpopulation bereits im Rahmen einer anderen Studie typisiert wurde, die elf häufigsten Haplotypen für das *TLR9*-Gen unterscheiden {Berghofer, 2005; Lazarus, 2003}.

Für die erste Fragestellung sollte zunächst ein Kollektiv aus Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen für die erwähnten *TLR9*-Polymorphismen genotypisiert werden. Die Ergebnisse sollten statistisch ausgewertet werden, wobei durch Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen in den Patientengruppen mit der Kontrollgruppe ermittelt werden sollte, ob eine signifikante Assoziation der einzelnen *TLR9*-SNPs mit Morbus Crohn und/oder Colitis ulcerosa vorliegt.

Ein weiteres Ziel bestand darin zu überprüfen, ob Interaktionen zwischen den SNPs im *TLR9*-Gen und weiteren CED-relevanten Genen bestehen. Hierfür sollte nach genetischen Interaktionen im Sinne von Epistasie zwischen den *TLR9*-Polymorphismen und Varianten im *NOD2*-, *IL-23R*-, *ATG16L*-, im IBD5 Locus und im *DLG5*-Gen gesucht werden.

Da es sich bei den Chronisch entzündlichen Darmerkrankungen um heterogene Krankheitsbilder handelt, und die klinischen Charakteristika auch genetisch bedingt sind, sollte in einem weiteren Schritt auf Assoziationen der getesteten Polymorphismen mit verschiedenen klinischen Subgruppen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa getestet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Studienpopulation

Die Basisdaten der Studienpopulation können der Tabelle 4 entnommen werden.

3.1.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 855 Patienten mit MC und 481 Patienten mit CU. Die Patienten wurden aus der Medizinischen Klinik und Medizinischen Poliklinik Innenstadt, aus der II. Medizinischen Klinik, Universitätsklinikum München-Großhadern und der Ruhr-Universität, Bochum rekrutiert. Alle Studienpatienten waren kaukasischer Herkunft und deutscher Abstammung. Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie war eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien gesicherte Diagnose einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung mit eindeutiger Zuordnung zu einem der Krankheitsbilder (MC oder UC). Die klinische Charakterisierung erfolgte retrospektiv anhand der Patientenakten. Zur Beschreibung des MC-Phänotyp wurden Alter bei Erstmanifestation, maximale Ausdehnung der Erkrankung und Krankheitsverhalten nach der Montreal Klassifikation einbezogen {Satsangi, 2006}. Die Notwendigkeit einer chirurgischen Therapie wurde ebenfalls getrennt ausgewertet. Auch die Klassifikation der Krankheitsausdehnung bei CU erfolgte anhand der Montreal Klassifikation {Satsangi, 2006}. Alle Patienten wurden über Inhalt und Ziele der Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis für die Teilnahme an der Studie. Als Material wurde venös entnommenes Vollblut verwendet.

3.1.1.2 Kontrollkollektiv

Die 1029 DNA-Proben der Kontrollgruppe stammten von gesunden, unverwandten Blutspendern kaukasischer Herkunft der Blutspendedienste des Roten Kreuzes und der Stadt München.

Tabelle 4 Basisdaten der Studienpopulation und phänotypische Einteilung der Patientengruppen (MC: n=855, CU: n=481)

	Anzahl/% der analysierten Fäll
Kontrollen (n=1029)	
Männlich/weiblich (%)	343 / 414 (62,1 / 37,9)
Altersdurchschnitt ± SD (Altersverteilung)	45,0 ± 10,71 (18-68)
Morbus Crohn (n=855)	
Männlich/weiblich (%)	343 / 414 (45,3 / 54,7)
Altersdurchschnitt ± SD (Altersverteilung)	38,0 ± 13,13 (10-80)
Durchschnittliches Alter bei Erstdiagnose ± SD (Altersverteilung)	25,0 ± 11,7 (7-71)
n=475	

Colitis ulcerosa (n=481)	
Männlich/weiblich (%) n=387	197 / 190 (50,9 / 49,1)
Altersdurchschnitt ± SD (Altersverteilung) n=418	40,0 ± 14,40 (7-85)
Durchschnittliches Alter bei Erstdiagnose ± SD (Altersverteilung) n=251	29,0 ± 13,38 (9-81)
Alter bei Erstdiagnose MC (Montreal A)	
A1 (unter 16 Jahre)	53 / 475 (11.2)
A2 (zwischen 17 und 40 Jahre)	359 / 475 (75.6)
A3 (über 40 Jahre)	63 / 475 (13.3)
Krankheitsausbreitung MC (Montreal L)	
L1 (Ileum isoliert)	60 / 483 (12,4)
L2 (Colon isoliert)	82 / 483 (17,0)
L3 (Ileocolon)	338 / 483 (70,0)
L4 (isoliert oberer GI)	3 / 483 (0,6)
Krankheitsverhalten MC (Montreal B)	
B1 (inflammatorisch)	103 / 480 (21.5)
B2 (stenosierend)	121 / 480 (25.2)
B3 (fistulierend)	256 / 480 (53.3)
Operationen MC	240 / 472 (50,8)
Krankheitsausbreitung CU (Montreal E)	
E1 (ulcerative Proktitis)	39 / 292 (13,4)
E2 (linksseitige Colitis (distale CU))	99 / 292 (33,9)
E3 (Pancolitis)	154 / 292 (52,7)

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien im höchsten Reinheitsgrad bezogen. Standardchemikalien wie z.B. Ethanol werden nicht aufgeführt.

Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien

Aqua ad iniectiones Delta Select	Fa. Delta Select, Pfullingen, D
DNA-Auftragspuffer	Apotheke Innenstadt, Klinikum der LMU, München, D
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EDTA	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D
LE Agarose	Fa. Biozym, Oldendorf, D
Simply Load100bp DNA Ladder	Fa. Cambrex, USA

Tabelle 6 Enzyme

Hot Star Taq DNA Polymerase	Fa. Qiagen, Hilden, D
LightCycler 480 Genotyping Master	Fa. Roche, Mannheim, D

Tabelle 7 Synthetische Oligonukleotide

Deoxynukleotid-Mix, (dNTP, je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, D
------------------------------------------------------------	---------------------------------

Alle Primer und Sonden wurden von TIBMOLBIOL/Berlin synthetisiert, HPSF- oder HPLC- gereinigt und als Lyophilisat geliefert. Die Primer für die Standard-PCR wurden anhand der im National Center for Biotechnology Informations (NCBI) veröffentlichten Nukleotidsequenzen ausgesucht (siehe Tabelle 8). Die Qualität der Primer und deren Kompatibilität wurden mit Hilfe des Programms Fast-PCR© (1999-2003) überprüft. Das Lyophilisat wurde in Aqua dest. gelöst und Aliquots in der jeweiligen Gebrauchskonzentration hergestellt.

Tabelle 8 Verwendete Nukleotidsequenzen

Polymorphismus	Absolute Position	NCBI SNP Cluster ID	Sequenz (5'→3' Richtung)
- 1923 A/C	chr3: 52117444	rs352144	GTGGGCACTGCTCTCCTTCCTGGCTC[A/C]GGGCAA CATTCTATCCCTGGCGCCT
- 1486 C/T	chr3: 52117007	rs187084	GGATGCAGATAAAAGATCACTGCCCT[C/T]AAGAAGC TGACATTCCAGCAGGGGA
1174 A/G	chr3: 52114348	rs352139	GCCCATGAAGTGGAGTGGGTGGAGGT[A/G]GAGCTG GGGGCCGGCCACTCACACA

Tabelle 9 Primer für Standard-PCR (Sequenzierung)

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)
TLR 9 1174 F	5'-gAAgAACTTCTgCAggTAggTAgggCTTgg-3'
TLR 9 1174 R	5'-AgCATgATggCCTgCACCAggAg-3'
TLR 9 1486 F	5'-ACCCCAgATCTggCACTCCTgAgC-3'
TLR 9 1486 R	5'-gCCCAgAgCTcACTgCTgggTgTAC-3'
TLR 9 1923 F	5'-CTCCACAggAgCCCGAgCTTTgg-3'
TLR 9 1923 R	5'-ggACAAGCCTCCTCTgggTCTTAgC-3'

Tabelle 10 Primer für RT-PCR

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)
TLR 9 1174 F	5'-AggAAggCAggCAAggTAC-3'
TLR 9 1174 R	5'-ggggTTggAAgATgCTAgAAgAT-3'
TLR 9 1486 F	5'-ACCCCAgATCTggCATCCTgAgC-3'
TLR 9 1486 R	5'-gCCCAgAgCTgACTgCTgggTgTAC-3'
TLR 9 1923 F (144se)	5'-TggAgggAATgAATgCAggT-3'
TLR 9 1923 R (144tum- rev)(Anchor und Reward-Primer)	5'-CTCAgAAAggCgCCAgAgAXTAg-3' (X = LCRed 640)

Tabelle 11 Sonden für Genotypisierung

Name	Sequenz (5'→3' Richtung)
TLR 9 1174 (Sensor)	5'-ggTggAggTAgAgCTggg--FL-3' (FL= Fluoreszein)
TLR 9 1174 (Anchor)	5'-X-CCggCCAAGTACACAgCCCT--PH-3' (X = LCRed 640; PH= Phosphatrest)
TLR 9 1486 (Sensor)	5'-gAATgTCAgCTTCTTAAgggCA--FL-3' (FL= Fluoreszein)
TLR 9 1486 (Anchor)	5'-X-TgATCTTTTATCTgCATCCCCAggATC--PH-3' (X = LCRed 640; PH= Phosphatrest)
TLR 9 1923 (144Sens[C]) (Sensor)	5'-CTTCCTggCTCCgggCAACAT--FL-3' (FL= Fluoreszein)
TLR 9 1923 R (144tum- rev)(Anchor und Reward-Primer)	5'-CTCAgAAAggCgCCAgAgAXTAg-3' (X = LCRed 640)

Tabelle 12 Kitsysteme

QIAamp DNA Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden, D
QIAquick® PCR Purification Kit	Fa. Qiagen, Hilden, D
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden, D

Tabelle 13 Einwegmaterialien

Reaktionsgefäße	Fa.Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen	Fa.Eppendorf, Hamburg, D
LightCycler® Reaktionsplatten	Fa. Roche, Mannheim, D

3.1.3 Geräte

Tabelle 14 Geräte

Tischzentrifuge	Microfuge 18 Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Kühlzentrifuge	Allegra X-15R Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Kühlzentrifuge	Allegra 25R Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Spektrophotometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer	Nano Drop ND-1000 Spectrometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Thermocycler	Light Cycler 480	Roche, Mannheim
Steril-Arbeitsbank	Lamin Air Model 1,8	Heto-Holten, Allerød, Dänemark
Gelelektrophoreseanlage	Power Pac 3000	Biorad, Hercules, USA
	Sub-Cell GT	Biorad, Hercules, USA
Thermocycler	Dyad DNA Engine, Peltier Thermal Cycler	Biorad, Hercules, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Vorgehensweise

Insgesamt wurden drei Polymorphismen im *TLR9*-Gen untersucht, und zwar *TLR9* -1923 A/C (rs352144), -1486 C/T (rs187084) und *TLR9* 1174 A/G (rs352139). Zusätzlich wurde bei einem kleinen Teil der Patienten, die für den SNP *TLR9* -1237 A/C oder die drei häufigsten Mutationen im *NOD2*-Gen (C2104T (Arg702Trp), G2722C (Gly908Arg) und 3020insC (Leu1007fsinsC)) noch nicht genotypisiert waren, die Genotypen bestimmt, um Interaktionen zwischen diesen SNPs und denen im *TLR9*-Gen analysieren zu können. Zur Untersuchung der Polymorphismen wurde zunächst Leukozyten-DNA aus Vollblut isoliert (siehe 3.2.2.1 Isolation von DNA). Mittels RT-PCR, einem Verfahren, bei dem über Fluoreszenz-markierte Sonden durch Schmelzkurvenanalyse die möglichen Genotypen unterschieden werden können, erfolgte die Genotypisierung der Proben (siehe 3.2.3 RT-PCR zur Genotypisierung). Die FRET-Sonden für die Genotypisierung der *TLR9*-Polymorphismen wurden mit Ausnahme des Locus -1237 A/C für diese Arbeit neu entwickelt und etabliert (siehe). Um die Ergebnisse der Genotypisierungen zu validieren, wurden Stichproben für alle möglichen Genotypen mittels Sequenzierung durch ein kommerzielles Sequenzierunternehmen überprüft und konnten bestätigt werden. Dazu wurden ausreichend lange PCR-Produkte (größer als 200 bp) hergestellt (siehe 3.2.2.2 PCR), welche den betreffenden Polymorphismus beinhalten, und mittels eines kommerziellen Reinigungskits für PCR-Produkte gereinigt (siehe 3.2.2.3 Purifizierung von DNA). Die Frequenzen der Allel- und Genotypen wurden berechnet und mithilfe verschiedener statistischer Verfahren verglichen (siehe 3.2.4 Statistische Auswertung). Außerdem wurden die Ergebnisse auf mögliche Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Polymorphismen und auf Assoziationen mit klinischen Charakteristika statistisch überprüft.

3.2.2 Arbeiten mit DNA

3.2.2.1 Isolation von DNA

Die Blutproben wurden in 9 ml EDTA-Röhrchen (S-Monovette® 9ml EDTA, Sarstedt) abgenommen. Die Röhrchen wurden am selben Tag bei 2000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert (Rotixa/P, Hettich) und das überstehende Plasma abpipettiert. Dieses wurde für eventuelle spätere Untersuchungen bei -20°C eingefroren und gelagert. Die Isolierung der genomischen DNA aus Blut erfolgte gemäß Standardverfahren mit dem QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.2.2.2 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein in vitro Verfahren zur selektiven Amplifikation von definierten DNA-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Das Prinzip beruht auf der zyklischen Abfolge von

Hitzedenaturierung doppelsträngiger DNA, der Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide (Primer) für das 5' und das 3' Ende der gewünschten Sequenz an die einzelsträngige DNA und der anschließenden Synthese des jeweiligen komplementären DNA-Strangs durch Verlängerung der Primer mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Diese drei Schritte werden über mehrere Zyklen wiederholt und führen so zu einer spezifischen Anreicherung der gewünschten DNA-Sequenz.

Für diese Arbeit wurde die Standard-PCR primär zur Anreicherung von DNA für die Sequenzierung einzelner Kontrollproben zur Überprüfung der Genotypisierung verwendet, desweiteren als Reaktionsschritt im Rahmen der RT-PCR/Genotypisierung und der Relativen Quantifizierung.

3.2.2.2.1 Reaktionsansätze der PCR

Der PCR-Ansatz bestand jeweils aus einem PCR-Puffer, einem aus den vier Deoxukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) zusammengestellten Mix, den beiden für die Zielsequenz spezifischen Oligonukleotid-Primern, Magnesiumchlorid_Lösung, der Taq-DNA-Polymerase, speziell gereinigtem Wasser zur Einstellung des Gesamtvolumens sowie der als Matrize dienenden Ausgangs-DNA. Bei jedem PCR-Ansatz wurde eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt der Ausgangs-DNA mitgeführt. Für die PCR wurde eine Heissstart DNA-Polymerase (HotStarTaq™ DNA-Polymerase, Qiagen) verwendet, welche hitzelabile Schutzgruppen trägt und erst durch eine Inkubation bei 95 °C für 15 Minuten aktiviert wird. Der PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 × PCR-Puffer 0,2 mM dNTP 0,25 µM der beiden Primern 0,025 U/µl HotStarTaq DNA-Polymerase 1,5–5 mM MgCl ₂

Zu diesem Mix wurde genomische DNA mit einer Endkonzentration von 5 ng/µl zugegeben. Die passende MgCl₂-Konzentration wurde durch Austestung ermittelt (siehe). Die erwartete Anlagerungstemperatur der Primer („Primer-Annealing“) wurde anhand der Schmelztemperaturen (T_m) der beiden Oligonukleotide berechnet (in der Regel 5 °C unter der Schmelztemperatur). Die optimale Annealingtemperatur wurde durch Austestung der PCR bei mindestens fünf verschiedenen Temperaturen mithilfe eines Temperaturgradienten im Thermocycler ermittelt.

3.2.2.2.2 Bedingungen der PCR

Das Standard-Protokoll für die PCR beginnt mit einer einmaligen Denaturierung über 5-15 Minuten, je nach verwendeter Taq-DNA-Polymerase. Darauf folgen 40 Zyklen Amplifikation, bestehend aus den drei Schritten Denaturierung (94°C, 30 Sekunden), Primeranlagerung bei der für das betreffende Primerpaar optimalen Temperatur für 30 Sekunden und Elongation bei 72 °C für eine von der Länge des Amplifikats abhängigen Dauer, mindestens jedoch 30 Sekunden. Der letzte Programmschritt ist

die Endextension bei 72 °C für 10 Minuten, bei der alle noch nicht komplett amplifizierten PCR-Produkte vervollständigt werden sollen. Die Annealing Temperaturen für die einzelnen Primerpaare können Tabelle 15 entnommen werden.

Tabelle 15 Bedingungen und Reaktionsansätze der Standard-PCR

Name	Annealing Temperature	[MgCl]
TLR 9 1174 F	61,0°C	2,0 mM
TLR 9 1174 R		
TLR 9 1486 F	61,0°C	3,0 mM
TLR 9 1486 R		
TLR 9 1923 F	50,0°C	3,0 mM
TLR 9 1923 R		

3.2.2.3 Purifizierung von DNA

Zur Purifizierung der DNA für die Sequenzierung wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (Quiagen) nach Protokoll des Herstellers verwendet.

3.2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Messung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Optische Dichte (OD) der Probe mittels eines Photometers bestimmt, und die DNA-Konzentration gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Nach Verdünnung der Probe in einer Einmalküvette mit 10 mm Schichtdicke wurde dazu die OD bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus der OD_{260} lässt sich die Konzentration von doppelsträngiger DNA berechnen:

$$C = OD_{260} \times f / (\epsilon \times d)$$

C	= Konzentration (ng/µl)		
OD_{260}	= gemessener Extinktionswert bei 260 nm		
f	= Verdünnungsfaktor		
d	= Schichtdicke (1 cm)		
ϵ	= Extinktionskoeffizient:	ds DNA	= 50^{-1} µl/ng
		RNA	= 40^{-1} µl/ng
		Oligonukleotide	= 30^{-1} µl/ng

Je nach verwendeter DNA-Isolierungsmethode können Nukleinsäure-Lösungen mit RNA, Proteinen oder auch Resten von Phenol kontaminiert sein. Während sich eine Kontamination mit RNA oder Phenol (Absorptionsmaximum bei 270-275 nm) spektrometrisch nicht nachweisen lässt, gibt das Verhältnis der Nukleinsäure-Absorption zur Protein-Absorption Auskunft über die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280nm. Das Verhältnis der OD_{260} zur OD_{280}

zeigt an, wie stark eine DNA-Lösung noch durch Alkohol und Reste von Proteinen verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäure-Lösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner.

Die DNA-Konzentration wurde für die PCR mittels Verdünnung mit TE-Puffer auf 100 ng/µl, für die Sequenzierung auf 20 ng/µl eingestellt.

3.2.2.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung einzelner Kontrollproben zur Validierung der Genotypisierung wurde nach Amplifizierung des zu sequenzierenden Abschnittes mittels PCR und anschließender Purifizierung der DNA unter Verwendung von ca 100ng DNA durch die Firma Sequiserve GmbH (Vaterstetten, D) vorgenommen.

3.2.3 RT-PCR zur Genotypisierung

Durch die Real-Time PCR mit anschließender Schmerzkurvenanalyse im Light Cycler 480 (Roche) wird die Genotypisierung in einer einzigen Reaktion ohne weitere Nachbearbeitung der Proben ermöglicht. Der Light Cycler 480 (Roche) ist ein Thermocycler mit integriertem Fluorimeter. Zur Genotypisierung werden neben den PCR-Primern sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden, die aus zwei Oligonukleotiden bestehen und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Anker- und Sensorsonde), eingesetzt, die mit den gebildeten PCR-Produkten hybridisieren. Die Sensorsonde ist mit Fluoreszein am 3'-Ende markiert, die Ankersonde mit LightCyclerRed640 oder Light-CyclerRed705 am 5'-Ende. Nach jeder Denaturierung im PCR-Zyklus binden die Sonden an den komplementären Strang des sich bildenden PCR-Produkts zwischen den Primern. Binden Anker- und Sensorsonde nah genug nebeneinander (≤ 5 Basenpaare), und werden sie durch einen Lichtimpuls angeregt, emittiert die Sensorsonde ein Lichtsignal von 530 nm, das den Farbstoff der Ankersonde anregt und zur Emission eines zweiten Signals führt (640 oder 705 nm), das vom LC-Gerät gemessen wird. Die Sensorsonde wird daher als Donor-Fluorophor, die Ankersonde als Akzeptor-Fluorophor bezeichnet. Die Anregung des Akzeptor-Fluorophors durch den Donor-Fluorophor („Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET)) kann nur bei Bindung der Sonden unmittelbar nebeneinander erfolgen. Dies verhindert die Anregung freier Sonden und damit eine Fehlbestimmung. Mit zunehmender Zyklenzahl wird mehr Amplifikat gebildet, mehr Sonden können binden, und die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes. Dies ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit („quantitative real time PCR“). Im Rahmen der Schmerzkurvenanalyse, welche im Anschluss an die RT-PCR erfolgt, ermittelt der LightCycler während einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung (ausgehend von 40°C bis zu einer Zieltemperatur von 80°C) anhand des begleitenden Fluoreszenzabfalls die Temperatur, bei welcher sich der Amplicon-Sonden-Komplex aufteilt, oder die Sonde denaturiert. Diese sogenannte Schmelztemperatur ist abhängig von der Sequenz, der Länge und dem GC-Gehalt des amplifizierten

Segments, sowie von Fehlpaarungen zwischen Amplicon und Sonde. Besteht eine Mismatch-Paarung zwischen Sonde und Amplicon, resultiert daraus eine signifikant niedrigere Schmelztemperatur im Vergleich mit einem Amplicon, das ohne Mismatch Paarung mit der Sonde hybridisiert. Bei heterozygoten Proben liegen zwei verschiedene Allele vor, und entsprechend werden zwei Schmelzpunkte gemessen. Zur einfacheren Ablesung der Schmelzpunkte wird die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Anhand der Schmelzwerte und des Kurvenverlaufs kann dann die Genotypisierung erfolgen.

3.2.3.1 Reaktionsansätze der RT-PCR

Für alle untersuchten Polymorphismen wurde ein Reaktionsvolumen von 5µl je Probe gewählt, das sich je nach Verhalten der Primer und Sonden verschieden zusammensetzte. Die genauen Reaktionsansätze für die einzelnen Polymorphismen können Tabelle 16 entnommen werden. Für den Polymorphismus *TLR 9 -1923 A/C* wurde ein intern markierter Reward-Primer verwendet. Um sicherzustellen, dass ausreichend Target für die Hybridisierungssonde (Sensor) aus der PCR hervorgeht, wurde gemäß dem Prinzip der Primer-Asymmetrie dieser Primer im Überschuss zur Verfügung gestellt.

Tabelle 16 Reaktionsansätze der RT-PCR

Polymorphismus	Master Mix	Aqua dest.	Foward Primer	Reward Primer	Anchor	Sensor
<i>TLR9 1174</i>	1,0 µl	3,0 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
<i>TLR9 1237</i>	1,0 µl	3,0 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
<i>TLR9 1486</i>	1,0 µl	3,0 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
<i>TLR9 1923</i>	1,0 µl	3,43 µl	0,1 µl	0,26 µl		0,30 µl
<i>NOD2 Exon 4</i>	1,0 µl	3,0 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
<i>NOD2 Exon 8</i>	1,0 µl	3,0 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
<i>NOD2 Exon 11</i>	1,0 µl	3,0 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl

3.2.3.2 Bedingungen der RT-PCR

Für alle untersuchten Polymorphismen wurde ein Standard-RunProtocol, bestehend aus 4 Programmschritten, verwendet. Dabei wurde die Reaktionsplatte zunächst 10 Minuten bei 95°C vorinkubiert ("incubation"). Im nächsten Programmschritt wurde über 45 Zyklen die PCR durchgeführt, wobei auf 10 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 10 Sekunden mit der jeweiligen Annealing-Temperatur der Primer und 15 Sekunden bei 72° C zur Amplifikation folgten. Hierbei wurde als Analysemodus "Quantification" gewählt, was den Anstieg der PCR-Produkte durch Fluoreszenzmessung sichtbar und damit kontrollierbar machte ("amplification"). Anschließend erfolgte die Schmelzkurve, die sich aus 30 Sekunden Vorinkubation bei 95°C, 120 Sekunden bei 40°C und der anschließenden kontinuierlichen Temperaturerhöhung auf 80°C zusammensetzt. Die Schmelzkurve findet im Analysemodus "melting curve" statt, wobei die Fluoreszenzänderung bei Dehybridisierung der Sonden gemessen wird ("melting curve"). Im letzten

Programmschritt wird die Reaktionsplatte über 30 Sekunden auf 40°C heruntergekühlt ("cooling"). Einen Überblick über das Standard-RunProtocol sowie die einzelnen Annealing-Temperaturen der Primer geben Tabelle 17 und Tabelle 18.

Tabelle 17 Standard-RunProtocol der RT-PCR

Name des Programmschrittes	Anzahl der Zyklen	Analysemodus	Aquisitionsmodus
incubation	1 Cycle	no analysis	-
	Temperatur	Dauer	Temperaturveränderung
	95°C	10 Min.	4,6°C/ Sek.
amplification	45 Cycles	quantification	single acquisition
	Temperatur	Dauer	Temperaturveränderung
	95°C	10 Sek.	4,6°C/ Sek.
	variabel	10 Sek.	2,4°C/ Sek.
	72°C	15 Sek.	4,6°C/ Sek.
melting curve	1 Cycle	melting curve	3 acquisitions/°C
	Temperatur	Dauer	Temperaturveränderung
	95°C	30 Sek.	4,6°C/ Sek.
	40°C	2 Min.	2,0°C/ Sek.
	80°C	-	continuous
cooling	1 Cycle	no analysis	-
	Temperatur	Dauer	Temperaturveränderung
	40°C	30 Sek.	2,5°C/ Sek.

Tabelle 18 Annealing Temperature für die RT-PCR

Polymorphismus	Annealing Temperature
<i>TLR9</i> 1174	66,0 °C
<i>TLR9</i> 1237	66,0 °C
<i>TLR9</i> 1486	66,0 °C
<i>TLR9</i> 1923	62,0 °C
<i>NOD2</i> Exon 4	66,0 °C
<i>NOD2</i> Exon 8	58,0 °C
<i>NOD2</i> Exon 11	58,0 °C

3.2.4 Statistische Auswertung

3.2.4.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine populationsbasierte genetische Assoziationsstudie. Damit soll der Zusammenhang zwischen einer Erkrankung und bestimmten genetischen Merkmalen, in der vorliegenden Arbeit Einzelnukleotid Polymorphismen untersucht werden. Das Standarddesign für Assoziationsstudien stellt die Fall-Kontroll-Studie mit unabhängigen, unverwandten Kontrollen dar. Dabei ist es wichtig, dass sich Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv in ethnischen, geographischen und sozialem Hintergrund nicht unterscheiden, um keine falsch positiven Assoziationsbefunde zu erhalten. Außerdem sollte das Kontrollkollektiv zwischen ein- und zweimal so viele Individuen wie das Fallkollektiv umfassen. Nach Genotypisierung der Kollektive werden die Genotyp-, Allel- und Haplotypfrequenzen

mithilfe des Chi-Quadrat (χ^2)-Tests oder des Fisher's-Exact-Tests verglichen, und so Assoziationen und ihre Signifikanz ermittelt. Die Verteilung der Genotypfrequenzen für die einzelnen Kollektive wird mit den nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu erwartenden Frequenzen verglichen.

3.2.4.2 Chi-Quadrat (χ^2)-Test

Mit dem χ^2 -Test untersucht man Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit. Dabei kann man mit dem sogenannten Unabhängigkeitstest überprüfen, ob zwei Merkmale stochastisch unabhängig sind. Ausgegangen wird von der Nullhypothese, man setzt also voraus, dass keinerlei Assoziationen zwischen untersuchten Variablen bestehen. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel (Korrektur nach Yates):

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

$N = a + b + c + d$

Für den χ^2 -Test wurde folgende 2 x 2-Tabelle verwendet:

	Patienten	Kontrollen	Summe
Positiv	a	c	a + c
Negativ	b	d	b + d
Summe	a + b	c + d	a + b + c + d (= N)

Dabei besitzt der Test für eine 2 x 2-Tabelle einen Freiheitsgrad (df). Die Randsummen sollten über fünf und die Summe aller Häufigkeiten über 40 liegen. Bei Randsummen kleiner fünf wird der Fisher's-Exact-Test verwendet. In der Medizin wird ein Ergebnis meistens dann als signifikant anerkannt, wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Zufallsbefund kleiner oder gleich 5% ist (das sog. Signifikanzniveau α des Tests). Errechnet sich eine Prüfsumme die kleiner als 3,841 ist, dann konnte der Test nicht nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied besteht, errechnet sich dagegen eine Prüfsumme, die gleich oder größer 3,841 ist, so besteht zwischen den Stichproben ein signifikanter Unterschied. Das Signifikanzniveau kann man in Stufen angeben:

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

3.2.4.3 Fisher-Exakt-Test

Der Fisher-Exact-Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit, der auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Im Anwendungsgebiet entspricht er dem Chi-Quadrat-Test. Er geht auf den britischen Statistiker Ronald Aylmer Fisher (1890-1962) zurück. Die Formel für den Fisher-Exact-Test lautet:

$$\varphi(a) = \frac{\binom{a+c}{a} \binom{b+d}{b}}{\binom{n}{a+b}}$$

3.2.4.4 Berechnung der Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen lassen sich wie folgt berechnen:

$$f = \frac{n}{N}$$

n = Anzahl eines Allels
N = Anzahl aller Allele

Es wird vorausgesetzt, dass alle Allele bekannt sind und Individuen mit nur einem Allel homozygot bezüglich dessen sind. Werden die betrachteten Polymorphismen kodominant vererbt, so gilt zudem: $N = 2 \times$ die Anzahl der Individuen.

3.2.4.5 Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die ermittelten Genotypfrequenzen wurden mit den beim Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts erwarteten Frequenzen verglichen. Dabei werden die erwarteten Häufigkeiten nach folgender Formel ermittelt:

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

$$F_{AB} = 2 \times f_A \times f_B$$

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

F_{AA} = erwartete Frequenz für den Genotyp AA

F_{BB} = erwartete Frequenz für den Genotyp BB

F_{AB} = erwartete Frequenz für den Genotyp AB

f_A = beobachtete Frequenz für das Allel A

f_B = beobachtete Frequenz für das Allel B

Mit dieser Formel kann fann die Signifikanz der Abweichung bestimmt werden:

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

Dabei werden wiederum die oben aufgeführten Signifikanzniveaus unterschieden.

3.2.4.6 Berechnung von genetischen Interaktionen und Assoziationen mit klinischen Charakteristika

Für die Berechnung möglicher Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Polymorphismen wurde der χ^2 -Test eingesetzt. Für multiple Testungen wurde die Bonferroni-Korrektur eingesetzt. p-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bewertet.

3.2.4.7 Software

Zum Design von Oligonukleotiden wurde das Programm Primer3 des Whitehead Institute, Cambridge/USA eingesetzt (Rozen und Skaletsky, 2000). Für nichtparametrische Tests und Häufigkeitsberechnungen wurde das Programm SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Genotypisierung

4.1.1 Polymorphismen im Promotor des *TLR9*-Gens

4.1.1.1 Der Polymorphismus *TLR9*-1923 A/C

Um die Proben auf das Vorliegen des *TLR9* -1923 A/C Polymorphismus zu untersuchen, wurde ein Real-time-PCR-basiertes Verfahren verwendet (siehe 3.2.3 RT-PCR zur Genotypisierung). Bei der Reaktion hybridisierte die Sonde optimal mit dem C-Allel des Polymorphismus. Bei Vorliegen des A-Allels kam es zu einer Basenfehlpaarung, die Sonde löste sich früher und der Schmelzpunkt war niedriger. Für den Polymorphismus *TLR9* -1923 A/C wurde ein intern markierter Reward-Primer verwendet. Die für die einzelnen Allele gemessenen Schmelzpunkte sind in Tabelle 19 aufgeführt. Anhand der Schmelzkurven können somit die verschiedenen Genotypen bestimmt werden. Heterozygote Proben (AC) zeigen zwei Schmelzpunkte und eine zweigipfelige Kurve, bei homozygotem Vorliegen des A- oder C-Allels ist nur ein Schmelzpunkt vorhanden (Abbildung 3). Zur Überprüfung der Validität der Methode wurden Proben mit repräsentativen Kurven ausgewählt und sequenziert, wodurch die Zuordnung der Genotypen zu den entsprechenden Schmelzkurven bestätigt werden konnte.

Tabelle 19 Schmelzpunkte der Sonden für den -1923 A/C Polymorphismus

Allel	Schmelzpunkt
A- Allel	62,5°C
C- Allel	71,0°C

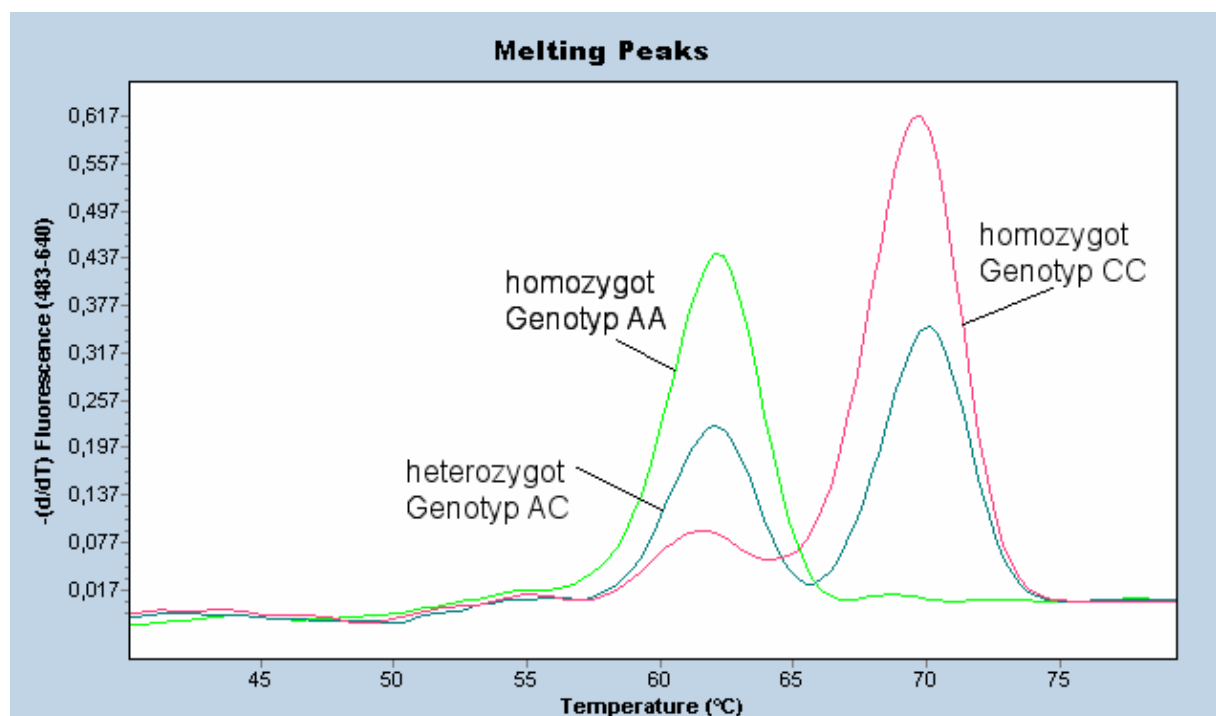


Abbildung 3 Schmelzkurve -1923 A/C

Die Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus -1923 A/C in den einzelnen Gruppen der Studienpopulation sowie die Signifikanzwerte (jeweils Patientengruppe vs. Kontrollgruppe) sind der Tabelle 20 bzw. Abbildung 4 zu entnehmen. Die Frequenzen der Genotypen CC, AC und CA waren in allen drei Gruppen der Studienpopulation vergleichbar und keine statistisch signifikanten Unterschiede auszumachen.

Tabelle 20 Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus *TLR9* -1923 A/C

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	A	C	AA	AC	CC
Morbus Crohn (N = 820)	1574 (96,0%)	66 (4,02%) p= 0,53	754 (92%) p= 0,26	66 (8,0%)	0 (0,0%) p= 0,07
Colitis ulcerosa (N = 473)	901 (95,24%)	45 (4,76%) p= 0,16	430 (90,9%) p= 0,10	41 (8,7%)	2 (0,4%) p= 0,96
Kontrollpersonen (N = 817)	1576 (96,45%)	58 (3,55%)	764 (93,5%)	48 (5,9%)	5 (0,6%)

Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus - 1923 A/C im Promotor des *TLR9*-Gens bei Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur bzw. mithilfe Fisher's Exact Test. Zusätzlich sind die p-Werte aufgeführt (jeweils Vergleich Patientengruppe vs. Kontrollgruppe). Für die p-Werte der Genotypen wurde die Bonferroni-Korrektur für multiple Testungen vorgenommen.

N = Anzahl der jeweils untersuchten Individuen.

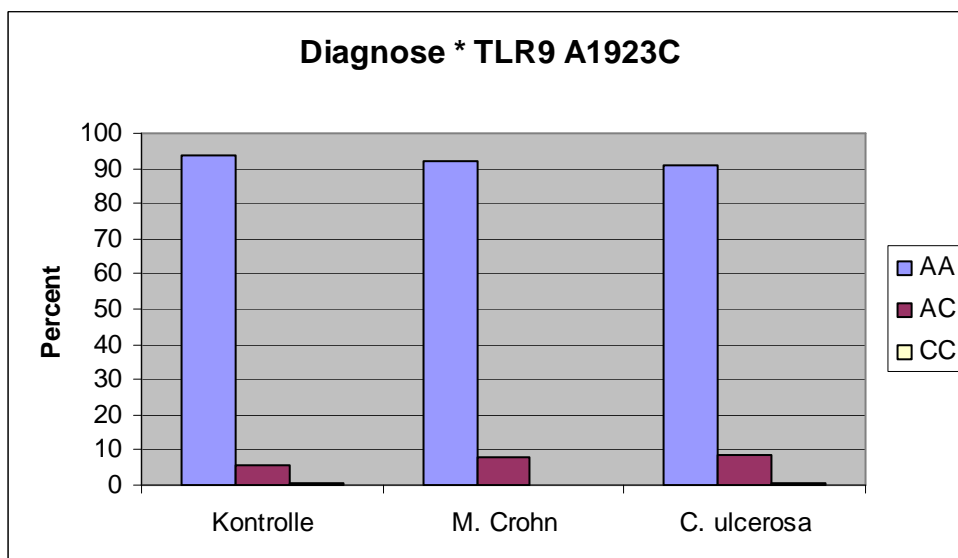


Abbildung 4 Verteilung der TLR9-1923 A/C Genotypen

4.1.1.2 Der Polymorphismus *TLR9* -1486 C/T

Um die Proben auf das Vorliegen des *TLR9* -1486 C/T Polymorphismus zu untersuchen, wurde ebenfalls das beschriebene Real-time-PCR-basierte Verfahren verwendet (siehe 3.2.3 RT-PCR zur Genotypisierung). Die verwendete Sonde hybridisierte perfekt mit dem T-Allel des Polymorphismus, während es bei dem C-Allels zu einer Mismatch-Paarung kam, und der Schmelzpunkt somit niedriger war. Die für die einzelnen Allele gemessenen Schmelzpunkte sind in Tabelle 21 aufgeführt. Anhand der Schmelzkurven können wiederum die verschiedenen Genotypen bestimmt werden. Heterozygote Proben (CT) zeigen zwei Schmelzpunkte und eine zweigipfelige Kurve, bei homozygotem Vorliegen des T- oder C-Allels ist nur ein Schmelzpunkt vorhanden (Abbildung 5). Auch für den *TLR9* -1486C/T Polymorphismus wurde zur Überprüfung die Sequenzierung einiger Proben vorgenommen, die die eindeutige Zuordnung der Genotypen zu den einzelnen Schmelzkurven bestätigten.

Tabelle 21 Schmelzpunkte der Sonden für den -1486 C/T Polymorphismus

Allel	Schmelzpunkt
T- Allel	62,5°C
C- Allel	56,5°C

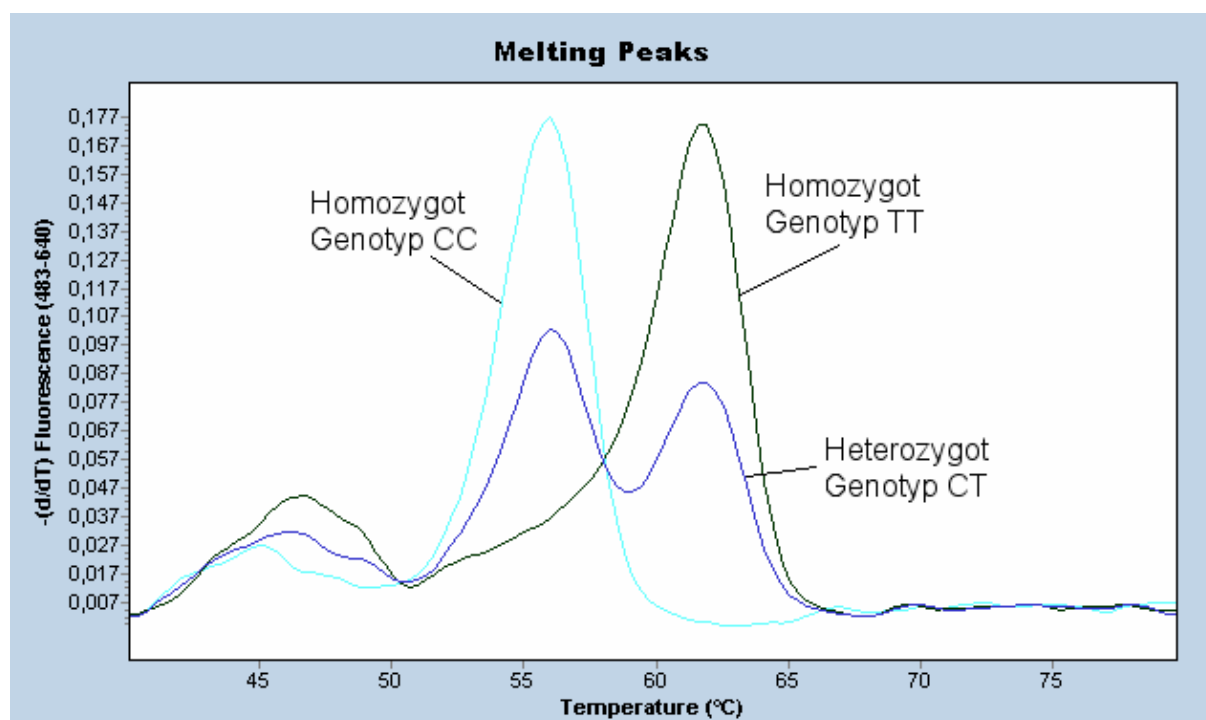


Abbildung 5 Schmelzkurve -1486 C/T

Die Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus -1486 C/T in den einzelnen Gruppen der Studienpopulation sowie die Signifikanzwerte (jeweils Patientengruppe vs. Kontrollgruppe) sind der Tabelle 22 bzw. Abbildung 6 zu entnehmen. Die Frequenzen des Genotyps CT waren in allen drei Gruppen der Studienpopulation vergleichbar. Genotyp TT hingegen kam in der Gruppe der Patienten mit Morbus

Crohn sowie der Gruppe der Patienten mit Colitis ulcerosa tendenziell häufiger vor als in der Kontrollgruppe, und Genotyp CC war in der Kontrollgruppe etwas häufiger vertreten als in den Patientengruppen. Die Differenzen erwiesen sich allerdings als statistisch nicht signifikant.

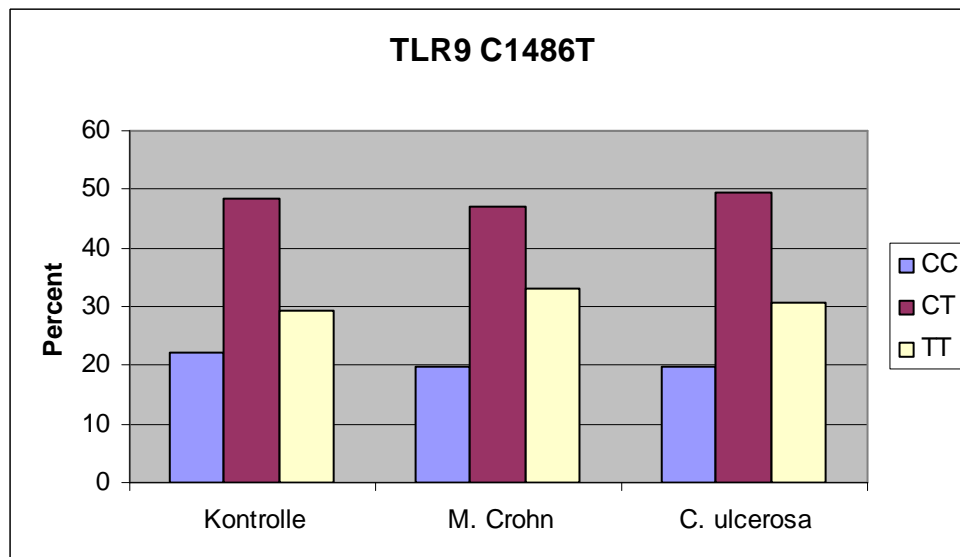


Abbildung 6 Verteilung der TLR9 - 1486 C/T Genotypen

Tabelle 22 Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus - 1486 C/T

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	T	C	TT	CT	CC
Morbus Crohn (N = 844)	954 (56,52%)	734 (43,48%) p= 0,09	278 (32,9%) p= 0,24	398 (47,2%)	168 (19,9%) p= 0,58
Colitis ulcerosa (N = 480)	533 (55,52%)	427 (44,48%) p= 0,37	148 (30,8%) p= 0,94	237 (49,4%)	95 (19,8%) p= 0,72
Kontrollpersonen (N = 999)	1073 (53,71%)	925 (46,29%)	294 (29,4%)	485 (48,5%)	220 (22,0%)

Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus - 1923 A/C im Promotor des *TLR9*-Gens bei Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur bzw. mithilfe Fisher's Exact Test. Zusätzlich sind die p-Werte aufgeführt (jeweils Vergleich Patientengruppe vs. Kontrollgruppe). Für die p-Werte der Genotypen wurde die Bonferroni-Korrektur für multiple Testungen vorgenommen.

N = Anzahl der jeweils untersuchten Individuen..

4.1.2 Der Polymorphismus 1174 A/G im Intron 1 des *TLR9*-Gens

Auch zur Genotypisierung für den Polymorphismus 1174 A/G im Intron 1 des *TLR9*-Gens wurde das RT-PCR Verfahren von Roche verwendet. Bei Vorliegen des G-Allels kam es zur Hybridierung der Sonde mit einer Basenfehlpaarung, beim A-Allel

war die optimale Hybridisierung möglich. Dementsprechend lag der Schmelzpunkt für Proben mit dem G-Allel niedriger als für Proben mit dem A-Allel (siehe Tabelle 23). Heterozygote Proben zeigten wiederum eine zweigipflige Schmelzkurve (siehe Abbildung 7). Auch für diesen Polymorphismus erfolgte die Überprüfung der Methode mittels Sequenzierung ausgewählter Proben.

Tabelle 23 Schmelzpunkte der Sonden für den 1174 A/G Polymorphismus

Allel	Schmelzpunkt
A- Allel	64,0°C
G- Allel	55,0°C

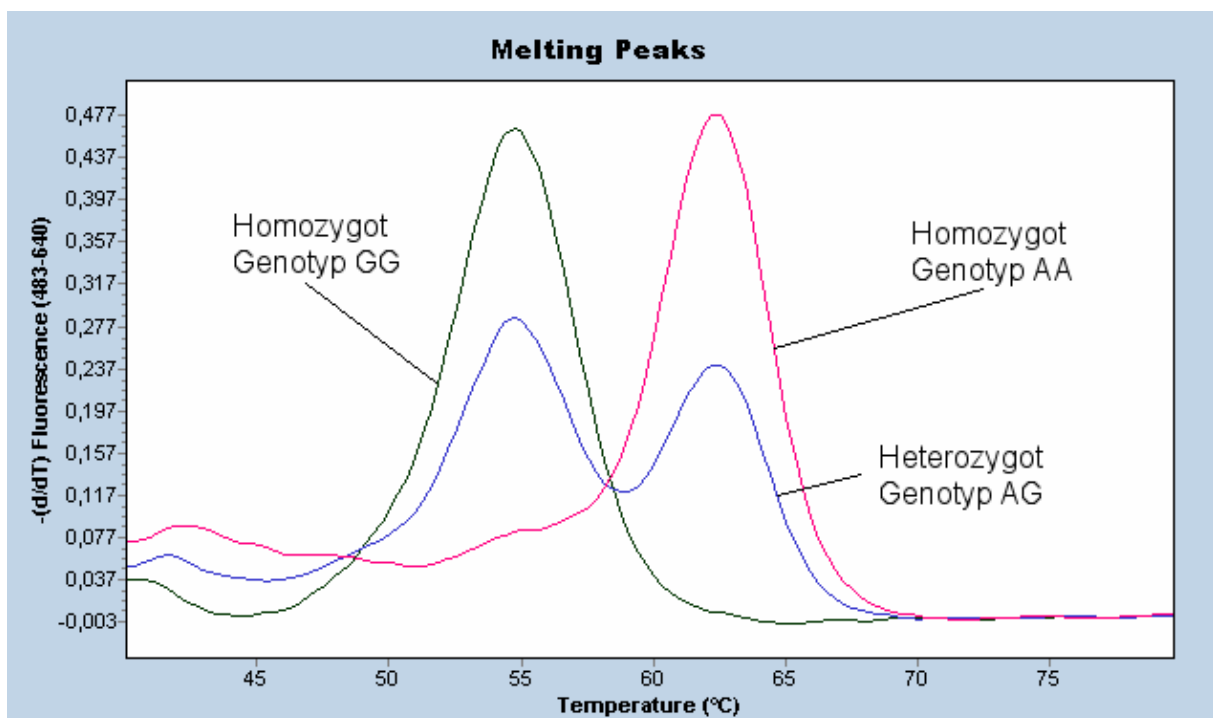


Abbildung 7 Schmelzkurve 1174 A/G

Die Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus 1174 A/G in den einzelnen Gruppen der Studienpopulation sowie die Signifikanzwerte (jeweils Patientengruppe vs. Kontrollgruppe) sind der Tabelle 24 bzw. Abbildung 8 zu entnehmen. Das seltenere Allels A war in der Patientengruppe "Colitis ulcerosa" mit 41,99% deutlich seltener zu finden als beim Morbus Crohn mit 48,07% und in der Kontrollgruppe mit 46,17%. Damit war der Genotyp AA in der Colitis ulcerosa Gruppe bei weitem weniger vertreten als in den anderen beiden Gruppen, der Genotyp AG dagegen etwas häufiger. Genotyp GG konnte in allen drei Gruppen mit vergleichbaren Frequenzen beobachtet werden. Das seltenere Auftreten des A-Allels bzw des Genotyps AA in der Patientengruppe CU erwies sich als statistisch signifikant (CU-Gruppe vs Kontrollgruppe: $p= 0,035$; OR 0,84 [95% CI 0,72-0,99] bzw. 0,012; OR 0,68 [95% CI 0,51-0,90]).

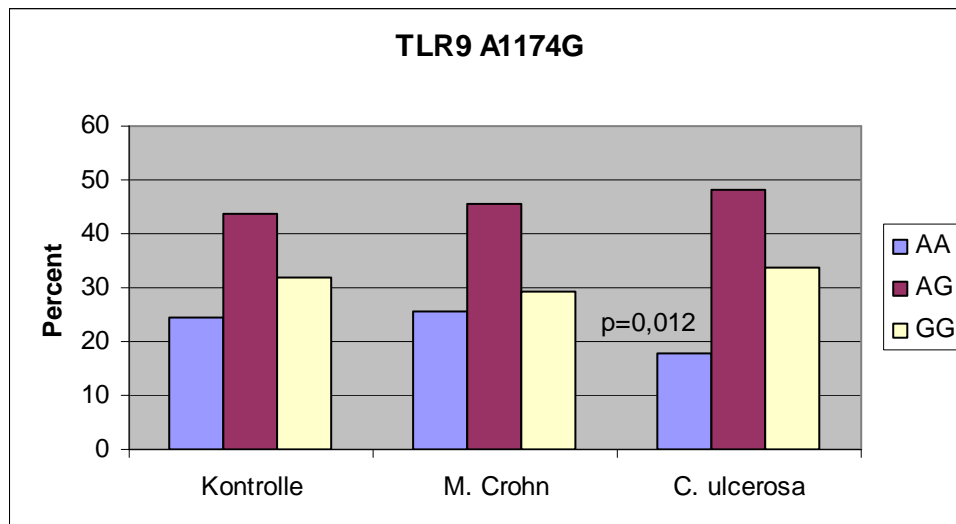


Abbildung 8 Verteilung der TLR9 1174 A/G Genotypen

Tabelle 24 Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus 1174 A/G

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	A	G	AA	AG	GG
Morbus Crohn (N = 855)	822 (48,07%) p= 0,26	888 (51,93%)	217 (25,4%) p= 0,88	388 (45,4%)	250 (29,2%) p= 0,44
Colitis ulcerosa (N = 481)	404 (41,99%) p= 0,035	558 (58,01%)	86 (17,9%) p= 0,012	232 (48,2%)	163 (33,9%) p= 0,98
Kontrollpersonen (N = 1029)	950 (46,17%)	1108 (53,83%)	250 (29,2%)	450 (43,7%)	329 (32,0%)

Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus - 1923 A/C im Promotor des *TLR9*-Gens bei Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Test mit Yates-Korrektur bzw. mithilfe Fisher's Exact Test. Zusätzlich sind die p-Werte aufgeführt (jeweils Vergleich Patientengruppe vs. Kontrollgruppe). Für die p-Werte der Genotypen wurde die Bonferroni-Korrektur für multiple Testungen vorgenommen.

N = Anzahl der jeweils untersuchten Individuen.

4.2 Verteilung der *TLR9*-Genotypen in den klinischen Subgruppen beim Morbus Crohn

Eine ausführliche klinische Charakterisierung war für 461 Patienten mit MC und 283 Patienten mit CU vorhanden.

Es wurde überprüft, ob Assoziationen der *TLR9*-Polymorphismen mit verschiedenen klinischen Subgruppen (Vienna A, Montreal L, Fisteln / Stenosen / Abszesse / Operationen ja/nein) bestehen. Die Verteilung der Genotypen bzw die Häufigkeit des seltenen Genotyps (mit Ausnahme des SNPs *TLR9* 1923, wo CC und AC zusammen angegeben ist) in den jeweiligen klinischen Subgruppen ist in der Tabelle 25

gegeben. Wie man der Tabelle entnehmen kann, konnten dabei keinerlei signifikante Assoziationen mit klinischen Subgruppen des Morbus Crohn gefunden werden. Ein leichter Trend war bei dem Polymorphismus TLR9 -1486 C/T zu beobachten: während der inflammatorische Krankheitstyp (Vienna B) eher bei homozygoten T-Allelträgern auftrat, war in den Subgruppen "stenosierender Typ" und "fistulierender Typ" der Anteil der C-Allelträger höher ($p=0,7$, $p_2=0,14$ (nach Bonferroni-Korrektur), OR 1,56 [95%CI 0,97-2,51]) (siehe Tabelle 25). Dieser Trend spiegelt sich auch in einer verminderten Häufigkeit von Operationen bei homozygoten T-Allelträgern ($p=0,7$, $p_2=0,14$ (nach Bonferroni-Korrektur), OR 1,46 [95%CI 0,97-2,20]).

Tabelle 25 Genotyp-Phänotyp Korrelationen MC

	TLR9 -1923 CC+AC (%)	p	TLR9 - 1486 TT (%)	p	TLR9 1174 AA (%)	p
Träger gesamt	67/821(7,3)		278/844 (30,3)		217/855 (23,6)	
Alter bei Erstdiagnose MC						
A1 (unter 16 Jahre)	6/51 (11,7)	n.s.	19/52 (36,5)	n.s.	14/53 (26,4)	n.s.
A2 (zwischen 17 und 40 Jahre)	27/336 (8,0)	n.s.	114/344 (33,1)	n.s.	88/350 (25,1)	n.s.
A3 (über 40 Jahre)	6/60 (10,0)	n.s.	17/60 (28,3)	n.s.	15/61 (25,0)	n.s.
Krankheitslokalisation MC						
L1 (Ileum isoliert)	7/58 (0,1)	n.s.	24/59 (40,7)	n.s.	20/60 (33,3)	n.s.
L2 (Colon isoliert)	9/79 (11,3)	n.s.	26/81 (32,1)	n.s.	16/82 (20,0)	n.s.
L3 (Ileocolon)	23/313 (20,4)	n.s.	108/321 (33,6)	n.s.	93/331 (28,1)	n.s.
L4 (isoliert oberer GI)	0/3 (0)	n.s.	3/3 (100)	n.s.	2/3 (66,7)	n.s.
jegliche Ileumbeteiligung	30/371 (8,1)	n.s.	132/380 (34,7)	n.s.	113/391 (29,0)	n.s.
jegliche Kolonbeteiligung	22/392 (5,6)	n.s.	134/402 (33,3)	n.s.	109/413 (27,4)	n.s.
jegliche Beteiligung oberer GI-Trakt	0/28 (0)	n.s.	9/29 (31,0)	n.s.	9/29 (31,0)	n.s.
Krankheitsverhalten CD						
B1 (inflammatorisch)	11/98 (11,2)	n.s.	43/101 (42,6)	$p=0,14$	33/101 (32,7)	n.s.
B2 (stenosierend)	10/114 (8,8)	n.s.	34/114 (29,8)	n.s.	32/119 (26,9)	n.s.
B3 (fistulierend)	18/239 (7,5)	n.s.	82/246 (33,3)	n.s.	64/254 (25,2)	n.s.
Any fibrostenotic	28/353 (7,9)	n.s.	116/360 (32,2)	$p=0,14$	96/373 (25,7)	n.s.
Operationen MC	19/225 (8,4)	n.s.	70/229 (30,6)	$p=0,14$	63/236 (26,7)	n.s.

4.3 Verteilung der TLR9-Genotypen in den klinischen Subgruppen bei der Colitis ulcerosa

Die Verteilung der TLR9-Genotypen in den klinischen Subgruppen anhand der Montreal-Klassifikation ist in der Tabelle 26 gegeben. Die Häufigkeit des AA-

Genotyps war bei Patienten mit ausgedehntem Befallsmuster (linksseitige Colitis oder Pancolitis E2 oder E3) höher als bei Patienten mit Proktitis (siehe Abbildung 9 und Tabelle 27). Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,08$; korrigiert nach Bonferroni $p=0,16$).

Tabelle 26 Genotyp-Phänotyp Korrelationen UC

	<i>TLR9</i> -1923 CC+AC (%)	p	<i>TLR9</i> - 1486 TT (%)	p	<i>TLR9</i> 1174 AA (%)	p
Träger gesamt	26/276 (9,4)		87/234 (30,6)		46/283 (16,3)	
Krankheitslokalisation UC						
E1 (ulcerative Proktitis)	6/38 (15,8)	n.s.	10/35 (28,6)	n.s.	2/35 (5,7)	n.s.
E2 (linksseitige Colitis (distale CU))	10/94 (10,6)	n.s.	28/98 (28,6)	n.s.	14/98 (14,3)	n.s.
E3 (Pancolitis)	10/144 (6,9)	n.s.	49/151 (32,5)	n.s.	30/150 (20,0)	n.s.

Tabelle 27 Patientengruppe CU *TLR9* 1174 A/G*Montreal Klassifikation

		<i>TLR9</i> 1174 A/G	
CU Montreal Klassifikation		AA	AG
Proktitis (E1)	N=	2	33
	% von E1	5,7 $p=0,16$	94,3
linksseitige Kolitis (E2)	N=	14	84
	% von E2	14,3	85,7
Pankolitis (E3)	N=	30	120
	% von E3	20,0	80,0

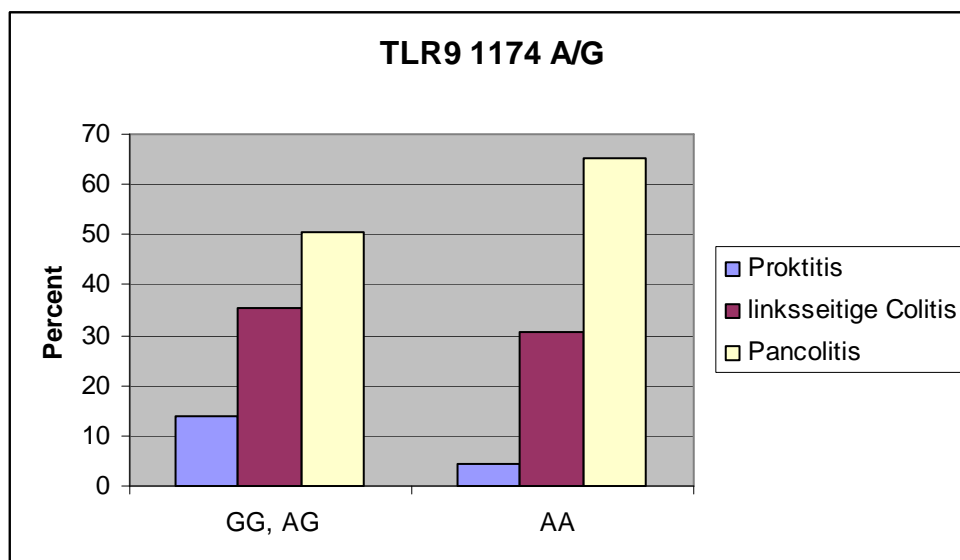


Abbildung 9 Patientengruppe CU *TLR9* 1174 A/G*Montreal Klassifikation

4.4 Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Markern

Bei den an der Studie beteiligten Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa war im Rahmen früherer Studien unserer Arbeitsgruppe mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse eine Genotypisierung für das *NOD2*-Gen vorgenommen worden {Folwaczny, 2004; Torok, 2003}. Untersucht worden waren hierbei die drei Mutationen C2104T (Arg702Trp), G2722C (Gly980Arg) und 3020insC (Leu1007fsinsC), welche bei Kaukasiern signifikant mit dem Morbus Crohn assoziiert sind {Hugot, 2001; Ogura, 2001}. Patienten mit mindestens einem mutierten *NOD2*-Allel wurden als NOD2+, diejenigen mit zwei *NOD2*-Mutationen als NOD2++ und diejenigen ohne Mutation als NOD2- klassifiziert. Die Ergebnisse der Genotypisierung der Studienpopulation für die zehn beschriebenen *IL23R* SNPs (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026=p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965), die neun *ATG16L1* Varianten (rs13412102, rs12471449, rs6431660, rs1441090, rs2289472, rs2241880=T300A, rs2241879, rs3792106, rs4663396), die SNPs im *IBD5-Lokus* (*SLC22A4* 1672C/T=rs1050152, *SLC22A5* -207G/C=rs2631367, IGR2078a_1=rs4705950), und drei Polymorphismen im *DLG5-Gen* (113G/A=rs1248696=p.Arg30Gln, 4136C/A=rs2289310=p.Pro1371Gln, DLG5_e26) sowie für zwei weitere *TLR9*-SNPs (-1237T/C=rs5743836, 2848A/G=rs352140=p.Pro545Pro) lagen ebenfalls großteils bereits aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe vor und können Tabelle 28 entnommen werden {Glas, 2008; Glas, 2007; Seiderer, 2006; Torok, 2005; Torok, 2004b}. Die Genotypisierung dieser Polymorphismen war mittels Schmelzkurvenanalyse oder Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse erfolgt. Um zu überprüfen, ob genetische Interaktionen zwischen SNPs in *TLR9* und Polymorphismen in anderen mit MC oder CU assoziierten Genen vorliegen, wurde die Verteilung der Genotypfrequenzen der getesteten *TLR9*-Polymorphismen in Abhängigkeit des jeweiligen anderen SNPs in der Kontrollgruppe und den Patientengruppen analysiert und verglichen.

Tabelle 28 Genotypen für alle SNPs für die eine Analyse auf genetische Interaktionen mit dem *TLR9*-Polymorphismen vorgenommen wurde: MAF=minor allele frequency; die OR [95% CI] gilt für den Vergleich zwischen MC bzw. CU und den Kontrollen

Gen	Polymorphismus	Minor allele	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa		Kontrollen MAF
			MAF	OR [95% CI]	MAF	OR [95% CI]	
<i>TLR9</i>	rs5743836, -1237 T/C	C	0.150	1.16 [0.90-1.51]	0.141	1.08 [0.83-1.41]	0.132
<i>NOD2</i>	rs2066847, p.Leu1007fs	insC	0.120	4.91 [3.15-7.71]	0.021	0.77 [0.42-1.43]	0.027
<i>NOD2</i>	rs2066844, p.Arg702Trp	T	0.092	1.93 [1.33-2.79]	0.053	1.06 [0.70-1.61]	0.050
<i>NOD2</i>	rs2066847, p.Gly908Arg	C	0.041	1.74 [1.01-2.99]	0.020	0.83 [0.44-1.57]	0.024
<i>IL23R</i>	rs1004819	T	0.360	1.58 [1.30-1.93]	0.316	1.58 [1.30-1.92]	0.262
<i>IL23R</i>	rs7517847	G	0.356	0.67 [0.56-0.81]	0.381	0.75 [0.62-0.90]	0.451
<i>IL23R</i>	rs10489629	G	0.390	0.72 [0.60-0.86]	0.413	0.79 [0.66-0.95]	0.470
<i>IL23R</i>	rs2201841	C	0.348	1.49 [1.22-1.81]	0.303	1.21 [0.99-1.48]	0.264
<i>IL23R</i>	rs11465804	G	0.032	0.50 [0.32-0.79]	0.049	0.78 [0.52-1.17]	0.062
<i>IL23R</i>	rs11209026, p.Arg381Gln	A	0.030	0.42 [0.27-0.67]	0.049	0.71 [0.48-1.04]	0.068
<i>IL23R</i>	rs1343151	T	0.288	0.75 [0.62-0.92]	0.311	0.84 [0.70-1.02]	0.349
<i>IL23R</i>	rs10889677	A	0.346	1.50 [1.22-1.82]	0.310	1.26 [1.04-1.54]	0.262
<i>IL23R</i>	rs11209032	A	0.368	1.46 [1.20-1.77]	0.318	1.17 [0.97-1.42]	0.285
<i>IL23R</i>	rs1495965	G	0.500	1.36 [1.14-1.63]	0.470	1.21 [1.00-1.45]	0.423
<i>ATG16L1</i>	rs13412102	T	0.343	0.74 [0.62-0.90]	0.380	0.87 [0.73-1.05]	0.412
<i>ATG16L1</i>	rs12471449	G	0.111	0.80 [0.60-1.05]	0.121	0.88 [0.67-1.16]	0.135
<i>ATG16L1</i>	rs6431660	A	0.416	0.75 [0.62-0.90]	0.446	0.85 [0.71-1.02]	0.486
<i>ATG16L1</i>	rs1441090	T	0.046	0.73 [0.48-1.10]	0.056	0.89 [0.60-1.32]	0.062
<i>ATG16L1</i>	rs2289472	G	0.415	0.75 [0.63-0.90]	0.451	0.87 [0.73-1.04]	0.485
<i>ATG16L1</i>	rs2241880, p.Thr300Ala	A	0.413	0.76 [0.63-0.91]	0.453	0.89 [0.74-1.07]	0.482
<i>ATG16L1</i>	rs2241879	C	0.426	0.79 [0.66-0.95]	0.451	0.86 [0.73-1.05]	0.484
<i>ATG16L1</i>	rs3792106	A	0.365	0.77 [0.65-0.93]	0.390	0.87 [0.72-1.04]	0.425
<i>ATG16L1</i>	rs4663396	T	0.164	0.80 [0.63-1.01]	0.180	0.89 [0.71-1.13]	0.197
<i>SLC22A4</i>	rs1050152 p.Leu503Phe	T	0.470	1.19 [1.00-1.43]	0.417	0.96 [0.80-1.15]	0.427
<i>SLC22A5</i>	rs2631367 -207G/C	C	0.490	1.07 [0.90-1.29]	0.470	1.00 [0.83-1.19]	0.472

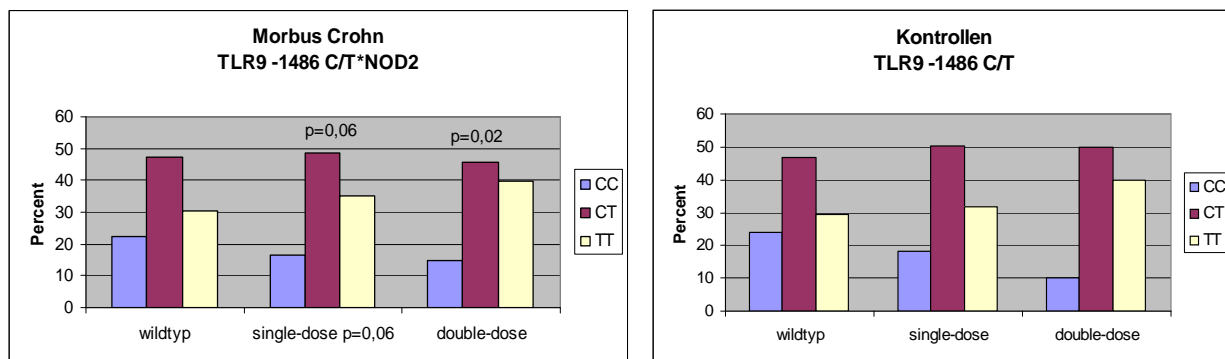
<i>DLG5</i>	rs1248696, p.Arg30Gln	A	0.100	0.91 [0.68- 1.24]	0.102	0.94 [0.70- 1.26]	0.108
<i>DLG5</i>	rs2289310, p.Pro1371Gln	A	0.039	0.88 [0.56- 1.40]	0.044	1.00 [0.64- 1.57]	0.044
<i>DLG5</i>	DLG5_e26	delA	0.343	0.99 [0.81- 1.19]	0.354	1.04 [0.86- 1.25]	0.346

4.4.1 Interaktionen zwischen den untersuchten Polymorphismen und Mutationen im *NOD2*-Gen bei Patienten mit Morbus Crohn

In der Patientengruppe mit MC fand sich unter den T-Allelträgern des Polymorphismus -1486 C/T ein höherer Anteil an *NOD2*+-Individuen. Dieser Unterschied erwies sich zunächst als statistisch signifikant ($p=0,03$; OR 1,51 [95%CI 1,04-2,21]), verlor jedoch nach Bonferroni-Korrektur die statistische Signifikanz ($p=0,06$). Bei Unterteilung der *NOD2*+-Individuen in Träger einer Mutation (single-dose) vs. Träger von zwei Mutationen (double-dose) zeigte sich, dass unter den Individuen mit zwei *NOD2*-Mutationen der Anteil an homozygoten -1486-T-Allelträgern am höchsten ist (*NOD2*- 30,5% TT, *NOD2*+ 35,1%TT, *NOD2*++39,8%TT). Ein höherer Anteil an *NOD2*+-Individuen unter den T-Allelträgern des Polymorphismus -1486 C/T fand sich auch in der Patientengruppe mit CU und der Kontrollgruppe, wo auch derselbe Gen-dosage Effekt zu beobachten war (siehe Abbildung 10). Das RR für *NOD2*-Mutationen stieg bei zusätzlichem Vorhandensein des -1486-T-Allels nicht ($p<10^{-5}$; RR 1,55 [95%CI 1,42-1,68] im Vergleich zu $p<10^{-5}$; RR 1,51 [95%CI 1,40-1,64]).

Tabelle 29 Patientengruppe Morbus Crohn und Kontrollen *TLR9* C1486T * *NOD2*

		<i>TLR9</i> - 1486C/T	CC N (%)		CT % (N)		TT % (N)		Total
Morbus Crohn	<i>NOD2</i>	wildtyp	111	(22,2)	236	(47,3)	152 (30,5)		100,0%
		single-dose	40	(16,3)	119	(48,6)	86	p=0,06 (35,1)	100,0%
		double-dose	13	(14,8)	40	(45,5)	35	(39,8)	100,0%
Kon- trollen	<i>NOD2</i>	wildtyp	145	(23,9)	284	(46,8)	178 (29,3)		100,0%
		single-dose	24	(18,0)	67	(50,4)	42	p=0,20 (31,6)	100,0%
		double-dose	1	(10,0)	5	(50,0)	4	(40,0)	100,0%



*NOD2*TLR9 -1486 C/T MC*

*NOD2*TLR9 -1486 C/T Kontrollen*

Abbildung 10 *NOD2*TLR9 -1486 C/T*

Für die beiden anderen *TLR9*-Polymorphismen wurde keine signifikante Interaktion mit den *NOD2*-Mutationen festgestellt.

4.4.2 Interaktionen zwischen den untersuchten Polymorphismen und Polymorphismen im *IL23R*-Gen

Als nächstes wurden Interaktionen mit *IL23R* getestet Grundsätzlich zeigten sich für den Polymorphismus -1486 C/T Interaktionen mit Varianten im *IL23R*-Gen. Dabei traten die mit MC assoziierten Polymorphismen häufiger bei Patienten mit dem *TLR9* -1486 C/T-Genotyp TT auf. Dieser Trend war auch in der Kontrollgruppe und in der Patientengruppe mit CU zu beobachten, allerdings deutlich abgeschwächt. Bezüglich der protektiven Varianten dagegen war ein umgekehrter Trend zu beobachten, der wiederum in allen drei Gruppen sichtbar war, in der Patientengruppe MC jedoch bei weitem am deutlichsten (siehe Tabelle 30, aufgeführt sind nur SNPs mit statistisch signifikanten Interaktionen). Diese Assoziationen waren statistisch signifikant nach Bonferroni-Korrektur nur für die risikoassoziierte Variante rs 11209032 ($p=0,02$, OR 1,50 [95% CI 1,09-2,07]) sowie die protektiven Varianten rs 11464804 ($p=0,04$; OR 3,69 [95% CI 1,48-9,78]) und rs 11209026 ($p=0,04$, OR 2,74 [95% CI 1,15-6,81]). Die Verteilung der Genotypen sowie die p-Werte nach Bonferroni-Korrektur können Tabelle 31 entnommen werden. Weder für die risikoassoziierte *IL23R*-Variante rs 11209032 noch für die protektiven *IL23R*-Varianten rs 11464804 und rs 11209026 konnte in Kombination mit dem -1486 C/T Genotyp TT eine signifikante Veränderung der Odds Ratio bzw. des Relativen Risikos beobachtet werden.

Tabelle 30 Interaktionen *IL23R*TLR9 -1486 C/T MC und Kontrollen*

Gruppe		Morbus Crohn			Kontrollen		
<i>TLR9</i> -1486 C/T		TT	TC	CC	TT	TC	CC
<i>IL23 R</i>		N (% aller Fälle mit <i>IL23R</i> -Genotyp)					
rs 11209032 (A Risikoallel)	AA	45 (41,3)	39 (35,8)	25 (22,9)	29 (39,2)	31 (41,9)	14 (18,9)
	AG	128 (34,7)	181 (49,1)	60 (16,3)	108 (29,6)	188 (51,5)	69 (18,9)

	GG	89 (27,4)	162 (49,8)	74 (22,8)	132 (29,6)	224 (50,2)	90 (20,2)
rs 11464804 (G protektiv)	TT	260 (34,0)	350 (45,8)	154 (20,2)	233 (30,2)	386 (49,9)	154 (19,9)
	TG GG	6 (12,2) p=0,04	34 (69,3)	9 (18,5)	37 (32,7)	57 (51,8)	19 (15,4)
rs 11209026 (A protektiv)	GG	253 (33,5)	348 (46,1)	154 (20,4)	224 (29,9)	377 (50,3)	148 (19,8)
	AG	7 (15,6)	31 (68,9)	7 (15,6)	42 (34,1)	61 (49,6)	20 (16,3)
	AA	p=0,04					

4.4.3 Interaktionen zwischen den untersuchten Polymorphismen und Polymorphismen im *IBD5*-Lokus

Im *IBD5*-Lokus wurden die Gene *SLC22A4* 1672 C/T und *SLC22A5* -207G/C als krankheitsassoziiert beschrieben, wobei das homozygote Vorliegen des Haplotyp TC das RR für Morbus Crohn erhöht. Zwischen diesem Risiko-Haplotyp und dem *TLR9* Polymorphismus -1486 C/T scheint eine statistisch signifikante genetische Interaktion vorzuliegen. Bei *TLR9* -1486 C/T-T-Allelträgern ist ein signifikant höherer Anteil an homozygoten TC-Haplotypträgern zu beobachten (p=0,04 (nach Bonferroni-Korrektur); OR 1,67 [95% CI 1,05-2,67]) (siehe Tabelle 31). Während sich für Morbus Crohn allein durch den Risiko-Haplotyp TC eine OR von 1,44 [95% CI 1,14-1,81] und ein RR von 1,21 [95% CI 1,07-1,35] ergibt, beträgt die OR für die Kombination mit dem -1486 C/T-T-Allel 1,62 [95% CI 1,26-2,10] und das RR 1,27 [95% CI 1,13-1,43]. In der Kontrollgruppe und in der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa war der hier beschriebene Trend deutlich schwächer.

Tabelle 31 Interaktionen OCTN-HaplotypTLR9* -1486 C/T MC und Kontrollen**

Gruppe		Morbus Crohn			Kontrollen		
<i>TLR9</i> -1486 C/T		TT N (%)	TC	CC	TT	TC	CC
Haplotyp <i>SLC22A4</i> 1672 C/T <i>SLC22A5</i> - 207 G/C	TC- Haplotyp	70 (35,5) p=0,04	99 (50,3)	28 (14,2)	52 (29,2)	84 (47,2)	42 (23,6)
	nicht TC- Haplotyp	202 (32,0)	292 (46,3)	137 (21,7)	242 (29,5)	400 (48,8)	178 (21,7)

Gruppe		Morbus Crohn			Kontrollen		
<i>TLR9</i> -1486 C/T		TT N (%)	TC	CC	TT	TC	CC
Haplotyp <i>SLC22A4</i> 1672 C/T <i>SLC22A5</i> - 207 G/C	TC- Haplotyp	70 (25,7) p=0,04	99 (25,3)	28 (17)	52 (17,7)	84 (17,4)	42 (19,1)
	nicht TC- Haplotyp	202 (74,3)	292 (74,7)	137 (83)	242 (82,3)	400 (82,6)	178 (81,9)

5. Diskussion

5.1 Studiendesign und Methoden

5.1.1 Studiendesign bei genetischen Assoziationsstudien

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine genetische Fallkontroll-Assoziationsstudie. Dieser Ansatz dient der Identifizierung krankheitsrelevanter Gene bei Erkrankungen mit multifaktorieller Ätiologie und komplexem genetischen Hintergrund. Bei dieser Form der Studie werden mittels statistischer Analysen die in einer Patientengruppe beobachteten Allel- und Genotypfrequenzen für die untersuchten Polymorphismen mit denen in einer gesunden Kontrollpopulation verglichen. Dabei soll ermittelt werden, ob einzelne SNPs oder Mikrosatelliten-Polymorphismen in einem signifikanten Zusammenhang mit einer Erkrankung stehen. Bei den SNPs handelt es sich um Nukleotidpositionen, an denen mehr als eine mögliche Base auftritt. Das seltenere Allel muss per Definitionem mit einer Frequenz von mehr als einem Prozent in der untersuchten Population auftreten {Tsalenko, 2003}. Neben den häufigeren biallelischen Polymorphismen, gibt es auch tri- und tetraallelische SNPs. In Abhängigkeit von der untersuchten genomischen Region und der betrachteten Population findet sich durchschnittlich ein SNP pro 200-600 Basenpaare. In der 2001 von der International SNP Map Working Group erstellten Karte des humanen Genoms sind 1,42 Millionen SNPs eingetragen, was ungefähr einem SNP pro 1,91kb entspricht {Chakravarti, 2001}. SNPs können in kodierenden, regulatorischen und in Bereichen ohne bekannte Funktion lokalisiert sein. Innerhalb von kodierenden Regionen unterscheidet man synonyme SNPs, die die Aminosäuresequenz des Proteins nicht verändern, und nicht-synonyme SNPs. In regulatorischen Bereichen liegende SNPs können bsw. die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen und somit die Expression verändern. Nicht-synonyme SNPs können durch Austausch von Aminosäuren oder vorzeitigen Abbruch der Translation die Funktion des Proteins beeinträchtigen. Synonyme SNPs, sogenannte "silent mutations" können, ebenso wie in Introns gelegene SNPs, Einfluss auf Splice Varianten des Gens nehmen. Nicht alle SNPs eignen sich gleichermaßen für Assoziationsstudien. SNPs in regulatorischen Abschnitten, wie die in dieser Arbeit untersuchten *TLR9*-Polymorphismen -1923 A/C und -1486 C/T aus der Promotorregion des *TLR9*-Gens bieten sich für genetische Assoziationsstudien ebenso an, wie nicht-synonyme SNPs in kodierenden Regionen {Chakravarti, 2001}. Der dritte im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus, 1174 A/G liegt zwar im *TLR9*-Gen, jedoch in einem Intron, 826 Basen vor Exon 2. Für diesen Polymorphismus wurden jedoch schon funktionelle Effekte beschrieben {Tao, 2007}.

Verschiedene Faktoren können die Aussagekraft von genetischen Assoziationsstudien beeinträchtigen und führen zu mangelnder Reproduzierbarkeit und oft widersprüchlichen Ergebnissen. Diese häufig kritisierte Inkonsistenz ist unter anderem auf die genetische Variabilität zwischen Populationen, die vor allem gegenüber schwachen genetischen Einflussfaktoren stark ins Gewicht fällt, zurückzuführen. Auch die Auswahl von nicht pathogenitätsrelevanten Genorten, die lediglich mit tatsächlich relevanten Loci im Kopplungsungleichgewicht sind, kann täuschende Ergebnisse bedingen. Einen dritten Stolperstein stellen zu kleine oder unzureichend charakterisierte Patientenpopulationen und zu kleine oder ungeeignete Kontrollpopulationen dar {Schreiber, 2002}. Um diese Fehlerquellen soweit möglich

zu umgehen sollten einige Prinzipien bei der Planung und Durchführung genetischer Assoziationsstudien berücksichtigt werden. Die Studienpopulation muss dabei eine ausreichende Anzahl an Individuen einschließen, wobei die Anzahl der Kontrollpersonen ein- bis zweimal so groß wie die der Patienten sein sollte. Eine zu kleine Kontrollgruppe fördert falsch negative, eine zu große Kontrollgruppe dagegen falsch positive statistische Signifikanz von möglichen Assoziationen. Bezüglich der ethnischen Zusammensetzung, der Altersverteilung und des Geschlechterverhältnisses sollten Patienten- und Kontrollgruppe einander entsprechen. Die Diagnosestellung und klinische Charakterisierung der Patientengruppe sollte anhand standardisierter Kriterien erfolgen. Dabei muss unter anderem sorgfältig zwischen sporadisch und familiär auftretenden Fällen unterschieden werden. Um unterschiedliche Fehltypisierungsraten zu vermeiden, empfiehlt es sich die gleiche oder eine vergleichbar zuverlässige Methode zur Genotypisierung beider Kollektive zu verwenden. Die ermittelte Verteilung der Genotypen in den einzelnen Gruppen muss mit den nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu erwartenden Häufigkeiten verglichen werden. Tests mit mehr als zwei Variablen, bsw. bei triallelischen SNPs oder bei Einbeziehung mehrerer Polymorphismen oder klinischer Charakteristika, müssen als Mehrfachtestungen betrachtet werden, was entsprechende mathematische Korrekturen notwendig macht. Gleiches gilt für die Berechnung der Genotyp-, Phänotyp- und Haplotypfrequenzen. Falls in einer Studie eine signifikante Assoziation beobachtet werden kann, muss diese in mindestens einer zweiten, von der ersten unabhängigen Studie überprüft werden. Diese zweite Studie sollte mindestens den Umfang der ersten haben, und eine möglichst ähnliche Patientengruppe miteinbeziehen {Übersicht in: Colhoun, 2003}.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Prinzipien wurden in der vorliegenden Studie insgesamt 1029 Kontrollindividuen, 855 Patienten mit MC und 481 Patienten mit CU eingeschlossen. Alle Individuen waren kaukasischer Herkunft und stammten aus Deutschland. Die Diagnosestellung der Patientengruppe erfolgte nach standardisierten Kriterien. Kontroll- und Patientengruppe entsprachen einander weitgehend in der Alters- und Geschlechterverteilung. Eine Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts wurde für alle untersuchten Polymorphismen vorgenommen, und es konnten keine signifikanten Abweichungen gefunden werden. Daraus kann gefolgert werden, dass systematische Fehler bei der Zusammensetzung der Studienpopulation oder der Genotypisierung unwahrscheinlich sind.

5.1.2 Validität der verwendeten Genotypisierungsmethoden

Bis vor einigen Jahren erfolgte die Detektion von SNPs zumeist durch Sequenzierung oder Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse, beides sehr zeitaufwändige Verfahren. Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit ein Real-time-PCR-basiertes Verfahren zur Genotypisierung gewählt. Dieses erfordert einen deutlich geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand. Die Bestimmung der Genotypen konnte in fast allen Fällen anhand der Schmelzpunktanalyse erfolgen. Waren einzelne Schmelzkurven uneindeutig, was bei einigen Proben mit zu geringer DNA-Konzentration der Fall war, wurden für die jeweilige Probe zwei weitere Typisierungen vorgenommen. Ergab sich trotzdem kein eindeutiges Ergebnis,

mussten diese Proben ausgeschlossen werden. Zur Validierung der Real-time-PCR wurden zufällig ausgewählte Proben aller Genotypen der drei untersuchten Polymorphismen sequenziert. Es konnten hierbei keine Abweichungen von den Ergebnissen der RT-PCR festgestellt werden. Im Vergleich zum RFLP-basierten Verfahren erlaubt die Real-time-PCR-basierte Methode eine bedeutend schnellere und einfachere Genotypisierung der Proben, da zeit- und arbeitsaufwendige Bearbeitungsschritte nach der PCR entfallen (Restriktionsverdau, Gelelektrophorese). Die Interpretation der Ergebnisse der Schmelzkurven ist zudem einfacher und weniger fehlerträchtig, da zusätzliche Fehlermöglichkeiten während der Post-PCR-Bearbeitung wegfallen (unvollständiger Verdau, Elektrophoresefehler etc.).

5.2 Bewertung der Ergebnisse

5.2.1 Vergleich der Frequenzen der untersuchten *TLR9*-Polymorphismen in der Kontrollpopulation mit Daten aus der Literatur

Um zu überprüfen, ob eine geeignete Studienpopulation und eine valide Genotypisierungsmethode ausgewählt wurden, ist nicht nur die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts von Bedeutung. Auch der Vergleich der ermittelten Genotypfrequenzen mit Daten aus der Literatur gibt Hinweise auf mögliche systematische Fehler. Optimalerweise werden hierfür Studien aus ethnisch ähnlichen Populationen herangezogen. Im folgenden sollen die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Allelfrequenzen für die drei betrachteten *TLR9*-SNPs mit Ergebnissen anderer Studien aus der Literatur verglichen werden. Da für diese Polymorphismen nur wenige Publikationen vorliegen, wurden auch solche mit einer geringen Anzahl von untersuchten Individuen und geographisch bzw. ethnisch von unserer Kontrollpopulation abweichenden Teilnehmern miteinbezogen. Insgesamt sprechen diese Vergleiche für eine geeignete Auswahl der Studienpopulation und eine valide Genotypisierung. Die geringgradigen Unterschiede bei den Allelfrequenzen in der eigenen Kontrollpopulation im Vergleich zu Kontrollpopulationen anderer Studien gleicher ethnischer Abstammung sollten jedoch bei der Interpretation von schwachen Assoziationen berücksichtigt werden. Im folgenden sollen die verfügbaren Vergleichsdaten für die einzelnen Polymorphismen detaillierter beleuchtet werden.

5.2.1.1 Der Polymorphismus -1923 A/C

Die Frequenz des seltenen C-Allels des Polymorphismus -1923 A/C liegt in der kaukasischen Bevölkerung zwischen 3,0% und 4,6%. Mit 3,55% ist somit die Frequenz in der hier verwendeten Studienpopulation vergleichbar mit bislang publizierten Ergebnissen (siehe Tabelle 32). Angesichts der sehr geringen Frequenzen dieses Allels kann man davon ausgehen, dass es sich um eine relativ neue Mutation handelt.

Tabelle 32 Vergleich des SNP -1923 A/C mit Daten aus der Literatur

Polymorphismus	Frequenz des selteneren Allels in der eigenen Kontrollpopulation N= 817	Daten aus der Literatur			
		Allelfrequenzen für das seltene Allel und Herkunft der getesteten Personen		Anzahl der getesteten Individuen	Referenz
- 1923 A/C	C-Allel : 3,55%	4,6%	Deutschland	527	{Berghofer, 2005}
		4,0%	Europa	23	{Lazarus, 2003}
		3,0%	USA	93	{Innate Immunity PGA, 2008}

5.2.1.2 Der Polymorphismus -1486 C/T

Zum Polymorphismus -1486 C/T wurden in zahlreichen Studien Daten publiziert. Dabei finden sich durchweg etwas niedrigere Frequenzen für das C-Allel. Während in unserer Studienpopulation die Frequenz bei 46,29% lag, schwanken die Angaben in Publikationen zwischen 28,0% (China) und 46,5% (Japan). Geht man von einer korrekten Genotypisierung aus, lässt sich ein tendenziell selteneres Auftreten des C-Allels in China und in einer Studie mit Individuen nordafrikanischer Herkunft gegenüber den Frequenzen in kaukasischen Populationen, Korea und Japan erkennen. Diese Befunde sind mit ethnischen Unterschieden zwischen kaukasischen, nordafrikanischen und verschiedenen asiatischen Populationen erklärbar. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich wahrscheinlich um eine ältere Variante, da der Polymorphismus in Populationen verschiedenster ethnischer Herkunft mit relativ hohen Frequenzen vorkommt. Die beiden in Deutschland durchgeführten Studien ergaben Frequenzen von 41,1% und 42,1% und liegen damit etwas niedriger als unsere eigenen Ergebnisse (siehe Tabelle 33).

Tabelle 33 Vergleich des SNP -1486 C/T mit Daten aus der Literatur

Polymorphismus	Frequenz des selteneren Allels in der eigenen Kontrollpopulation N= 999	Daten aus der Literatur			
		Allelfrequenzen für das seltenere Allel und Herkunft der getesteten Personen		Anzahl der getesteten Individuen	Referenz
- 1486 C/T	C-Allel : 46,29%	41,1%	Deutschland	118	{Hamprecht, 2005}
		42,1%	Deutschland	527	{Berghofer, 2005}
		39,0%	Europa	23	{Lazarus, 2003}
		41,0%	USA	93	{Innate Immunity PGA, 2008}
		46,5%	Japan	198	{Tao, 2007}
		41,7%	Korea	314	{Hur, 2005}
		30,0%	Tunesien	224	{Lachheb, 2008}
		28,0%	China	250	{Cheng, 2007}
		33,6%	China	769	{Ng, 2005}

5.2.1.3 Der Polymorphismus 1174 A/G

Die Häufigkeit des A-Allels des Polymorphismus 1174 A/G beträgt in unserer Kontrollpopulation 46,17%. Die verfügbaren Daten aus vergleichbaren Populationen kaukasischer Herkunft in der Literatur liegen mit zweimal 44,0% und einmal 44,2% im gleichen Bereich. Interessanterweise konnte in drei Studien mit asiatischen Populationen jeweils eine höhere Frequenz des A-Allels gegenüber dem T-Allel nachgewiesen werden, und zwar mit 55,9% (Japan), 56,9% (Korea) und 66,3% (China). Eine weitere japanische Studie allerdings ermittelte mit 43,0% eine eher dem kaukasischen Raum entsprechende Häufigkeit. Geht man von einer korrekten Typisierung aus und betrachtet die letzte Studie als Ausreißer, kann man daraus schließen, dass es sich ebenfalls um eine relativ alte Mutation handelt, die nach räumlicher Trennung der Populationen mit einer ab diesem Zeitpunkt voneinander unabhängigen Evolution unterschiedlichen Selektionsdrücken unterworfen war (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34 Vergleich des SNP 1174 A/G mit Daten aus der Literatur

Polymorphismus	Frequenz des selteneren Allels in der eigenen Kontrollpopulation N=1029	Daten aus der Literatur			
		Allelfrequenzen für das seltene Allel und Herkunft der getesteten Personen		Anzahl der getesteten Individuen	Referenz
1174 A/G	A-Allel : 46,17%	44,2%	Deutschland	527	{Berghofer, 2005}
		44,0%	Europa	23	{Lazarus, 2003}
		44,0%	USA	93	{Innate Immunity PGA, 2008}
		43,0%	Japan	71	{Noguchi, 2004}
		55,9%	Japan	203	{Tao, 2007}
		56,9%	Korea	310	{Hur, 2005}
		66,3%	China	781	{Ng, 2005}

5.2.2 Bewertung der Frequenzen der untersuchten *TLR9*-Polymorphismen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die drei *TLR9*-Polymorphismen -1923 A/C, -1486 C/T und 1174 A/G wurden zum ersten Mal bei CED untersucht.

5.2.2.1 Der Polymorphismus -1923 A/C

Für den Promotorpolymorphismus *TLR9* -1923 A/C konnten keine signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der verschiedenen Genotypen zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Patientengruppen nachgewiesen werden. Die Allel- und Genotypfrequenzen in den drei Gruppen waren vergleichbar und zeigten auch keine unterschiedlichen Tendenzen in der Verteilung. Es kann also angenommen werden, dass für den *TLR9*-Polymorphismus -1923 A/C keine Assoziation mit CED besteht.

5.2.2.2 Der Polymorphismus -1486 C/T

Auch für den Polymorphismus -1486 C/T ergab sich keine signifikant unterschiedliche Verteilung in den Genotyp- und Allelfrequenzen der Kontroll- und Patientengruppen. Es zeigte sich jedoch tendenziell ein häufigeres Vorkommen des

T-Allels bei MC im Vergleich mit der Kontrollpopulation (56,52% vs. 53,71%; $p=0,09$) und der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa (55,52%), vor allem bedingt durch die höhere Frequenz des Genotyps TT (MC 32,9% vs. Kontrollgruppe 29,4%, $p=0,06$; $p_2=0,12$ (nach Bonferroni-Korrektur)). Dieser Effekt ist jedoch sehr schwach und benötigt eine Überprüfung in weiteren, unabhängigen Studienpopulationen.

5.2.2.3 Der Polymorphismus 1174 A/G

Anders als für die beiden Promotorpolymorphismen konnte für den SNP *TLR9* 1174 A/G eine signifikante Assoziation mit Colitis ulcerosa gezeigt werden. Das Allel A war in der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa mit 41,99% signifikant seltener zu finden als in der Kontrollgruppe mit 46,17% ($p= 0,035$; OR 0,84 [95% CI 0,72-0,99]) und beim Morbus Crohn mit 48,07% ($p=0,003$; OR=0,78 [95% CI 0,66-0,92]). Dies war vor allem durch das seltenere Auftreten des homozygoten Genotyps AA in der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa bedingt, den nur 17,9% der Patienten mit CU aufwiesen. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe (29,2%; $p=0,012$; OR 0,68 [95% CI 0,51-0,90]) und der Patientengruppe mit Morbus Crohn (25,4%; $p= 0,04$; $p_2=0,08$ (nach Bonferroni-Korrektur) OR 0,74 [95% CI 0,55-0,99]) zeigte, dass auch für die AA-Genotypfrequenz der Unterschied zur Kontrollgruppe signifikant war. Der Genotyp GG war in allen drei Gruppen in vergleichbaren Frequenzen zu finden. Folglich trat der heterozygote Genotyp AG bei Patienten mit CU häufiger auf (48,2%), als bei Individuen der Kontrollgruppe (43,7%) und als bei Patienten mit Morbus Crohn (45,4%). Bei diesen Ergebnissen wäre es möglich, dass das A-Allel in homozygoter Ausprägung evt. einen protektiven Effekt gegenüber Colitis ulcerosa hat. Unwahrscheinlicher ist eine Risikoerhöhung durch das G-Allel, da der homozygote Genotyp GG in allen drei Gruppen in vergleichbaren Frequenzen vorkam, und die erhöhte G-Träger-Frequenz in der Patientengruppe Colitis ulcerosa nur durch den vergleichsweise erhöhten Anteil an heterozygoten Individuen bedingt war.

Interessanterweise wurden für den 1174 A/G SNP auch Assoziationen mit SLE und rapide progressiver HIV1-Infektion nachgewiesen. Tao et al. zeigten in einer japanischen Studienpopulation, dass das G-Allel des *TLR9* 1174 A/G Polymorphismus für die Entwicklung eines SLE prädispositioniert und außerdem in einer verminderten *TLR9*-Expression resultiert {Tao, 2007}. Die genetische Assoziation konnte allerdings in einer weiteren Studie mit koreanischen Individuen von Hur et al. nicht bestätigt werden {Hur, 2005}. Es scheint unwahrscheinlich, dass dies am unterschiedlichen ethnischen Hintergrund der Studienpopulation lag, da beide Autoren vergleichbare Allelfrequenzen in ihrer jeweiligen Kontrollgruppe feststellten (55,9% A in der Untersuchung von Tao et al. vs. 56,9% A in der Studie von Hur et al.). Bochud et al. zeigten eine Assoziation des A-Allels des 1174 A/G SNPs mit rapide progressiver HIV1-Infektion {Bochud, 2007}. Die Autoren beobachteten dabei außerdem ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen diesem SNP und dem SNP 2848 A/G (auch als 1635 A/G, rs352140 bezeichnet), wobei für den Haplotyp AG das Risiko für einen rapide progressiven Verlauf der HIV1-Infektion am höchsten war. Für den Polymorphismus 2848 A/G hatte in einer Studie unserer Arbeitsgruppe keine Assoziation mit Colitis ulcerosa gezeigt werden können {Torok, 2004a}.

Die hier beschriebene Assoziation mit Colitis ulcerosa sollte in mindestens einer weiteren unabhängigen Studie überprüft werden (siehe 5.1.1 Studiendesign bei genetischen Assoziationsstudien). Da es sich bei dem *TLR9* 1174 A/G Polymorphismus vermutlich um eine Mutation mit relativ geringem Einfluss handelt, sollte dafür unbedingt eine ausreichend große Studienpopulation ausgewählt werden. Sollte es sich bei der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Assoziation nicht um einen Zufallsbefund, sondern um eine reproduzierbare Assoziation mit CU handeln, besteht zum einen die Möglichkeit, dass diese aufgrund eines partiellen Kopplungsungleichgewichts mit einem anderen, funktionell relevanten SNP zustande kommt. Zum anderen könnte es aber auch sein, dass der *TLR9* 1174 A/G Polymorphismus selbst funktionelle Folgen hat. Diesbezüglich wurde bereits einmalig eine verminderte *TLR9*-Expression im Luciferase Reporter Gene Assay für das G-Allel beschrieben {Tao, 2007}. Der *TLR9* 1174 A/G Polymorphismus befindet sich zwar in einem Intron und nimmt damit keinen direkten Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Proteins, könnte jedoch indirekt über Splicing-Varianten, über eine veränderte Stabilität des RNA-Transkripts oder über die Veränderung regulatorischer Elemente Auswirkungen auf funktioneller Ebene haben, die es näher zu untersuchen gilt.

5.2.3 Bewertung der Assoziationen mit klinischen Subtypen

Für die krankheitsassoziierten *NOD2*-Mutationen konnte in verschiedenen unabhängigen Studien eine Assoziation mit Ileumbeteiligung, stenosierendem Krankheitstyp und der Notwendigkeit von Operationen nachgewiesen werden {Achkar, 2006; Ahmad, 2002; Brant, 2003; Radford-Smith, 2006; Seiderer, 2006}. Török et al. beobachteten eine schwache Assoziation mit dem fistulierenden Krankheitstyp und der Notwendigkeit von Operationen für *TLR9* -1237 C/T C-Allelträger, die zudem mindestens eine krankheitsassoziierte *NOD2*-Mutation aufwiesen {Török, 2009}. Für den mit Morbus Crohn assoziierten *IL23R*-Polymorphismus rs1004819 wurde eine, wenn auch nicht signifikant erhöhte Ileumbeteiligung, ein vermehrtes Auftreten von Stenosen und der Notwendigkeit von Operationen bei homozygoten T-Allelträgern berichtet {Glas, 2007}.

Um zu ermitteln, ob auch für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *TLR9*-Polymorphismen unabhängige oder *NOD2*-abhängige Assoziationen mit klinischen Subtypen der CED nachweisbar sind, wurde eine Stratifizierung der Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen nach klinischen Subgruppen des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa vorgenommen. Für Morbus Crohn ergaben sich keinerlei signifikante Assoziationen. Es konnte lediglich ein etwas häufigeres Auftreten des stenosierenden/fistulierenden Krankheitstyps gegenüber dem inflammatorischen Krankheitstyp bei *TLR9* -1486 C/T C-Allelträgern beobachtet werden, was sich auch in einer erhöhten Rate von Operationen bei *TLR9* -1486 C/T C-Allelträgern spiegelt. An funktionellen Auswirkungen dieses SNPs ist bislang nur die von Tao et al. 2007 beschriebene geringfügig verminderte *TLR9*-Expression im Luciferase Reporter Gene Assay für *TLR9* -1486 C/T C-Allelträger bekannt {Tao, 2007}. Sollte der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Trend sich in einer weiteren Studie als signifikant erweisen, müsste überprüft werden, ob tatsächlich funktionelle Auswirkungen des *TLR9* -1486 C/T Polymorphismus nachgewiesen werden können, um dann den möglichen Einfluss auf das klinische Verhalten der Erkrankung

aufzuklären. Nach den bislang vorliegenden, nicht signifikanten Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass keine Assoziationen zwischen klinischen Subgruppen des Morbus Crohn und den *TLR9*-Polymorphismen -1923 A/C, -1486 C/T und 1174 A/G bestehen.

Die Genotyp-Phänotyp-Analyse für Colitis ulcerosa zeigte, dass unter G-Allelträgern der Anteil von Patienten mit isolierter Proktitis im Vergleich mit linkseitiger Colitis oder Pancolitis deutlich höher ist als unter homozygoten A-Allelträgern ($p=0,012$ (korrigiert nach Bonferroni)). Möglicherweise prädispositioniert also das G-Allel bei Colitis ulcerosa für eine isolierte Proktitis.

5.2.4 Bewertung der Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Genen

In verschiedenen Studien konnten genetische Interaktionen unterschiedlicher Signifikanz zwischen mit CED assoziierten Polymorphismen nachgewiesen werden. Speziell für Morbus Crohn wurde genetische Epistasie zwischen *IL23R* SNPs und krankheitsassoziierten Varianten im IBD5-Lokus {Cummings, 2007a}, zwischen *PTGER4*- und *ATG16L1*-Polymorphismen {Seiderer, 2008}, und kürzlich in einer Publikation unserer Arbeitsgruppe auch zwischen dem *TLR9*-Polymorphismus -1237 C/T und *NOD2*-Mutationen und *IL23R*-Varianten beschrieben {Török, 2009}. Neue Erkenntnisse bezüglich genetischer Interaktionen zwischen krankheitsassoziierten Genen könnten in Zukunft Therapieentscheidungen mitbestimmen, wenn genetische Marker Aufschluss über an der Krankheitsentstehung beteiligte Signalwege erlauben würden. Dies könnte bsw. für den Einsatz von anti-IL-12/IL-23p40 gelten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob genetische Interaktionen zwischen den *TLR9*-Polymorphismen -1923 A/C, -1486 C/T und 1174 A/G mit krankheitsassoziierten Varianten in den Genen für *NOD2*, *IL23R*, *TLR9*, *ATG16L1*, *DLG5* und im IBD5 Locus bestehen. Im Folgenden soll auf diese Ergebnisse näher eingegangen werden.

5.2.4.1 Interaktionen zwischen den Polymorphismen im *TLR9*-Gen und Mutationen im *NOD2*-Gen beim Morbus Crohn

Eine Assoziation der drei Funktionsverlustmutationen Arg702Trp, Gly908Arg sowie Leu1007fsinsC mit MC wurde für Individuen kaukasischer Herkunft in zahlreichen Studien wiederholt bestätigt. Mit Colitis ulcerosa besteht keine Assoziation für diese Mutationen. Allerdings kann mit den drei bekannten Mutationen im *NOD2*-Gen nur etwa 20% des genetischen Risikos für die Entwicklung von MC erklärt werden {Torok, 2003}. Für verschiedene andere Marker wurden genetische Interaktionen mit *NOD2*-Mutationen beim MC beschrieben, und zwar zwischen den *NOD2*-Mutationen und Polymorphismen im *CD14*-Gen, im *TLR4*-Gen, im *DLG5*-Gen und in verschiedenen *IL23-R*-Varianten {Gazouli, 2005; Klein, 2003; Torok, 2004b; Török, 2009}. Interaktionen zwischen dem *NOD2*-Gen und dem *TLR9*-Gen sind aufgrund der bekannten synergistischen Effekte naheliegend und schon für den *TLR9* -1237 T/C Polymorphismus nachgewiesen worden. Für diesen Polymorphismus konnte in einer Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sich für Individuen mit

NOD2-Mutationen, die zugleich Träger des C-Allel des -1237 T/C Polymorphismus sind, die Odds Ratio für Morbus Crohn für Träger einer *NOD2*-Mutation von 2.76 [95% KI 2.15- 3.55] auf 3.24 [95% KI 2.11- 4.97], für Träger von mindestens zwei *NOD2*-Mutationen von 8.62 [95% KI 4.23-18.08] auf 18.14 [95% KI 4.18-110.90] erhöht {Török, 2009}. Um zu überprüfen, ob weitere Interaktionen zwischen SNPs in *TLR9* und *NOD2* vorliegen wurde die Verteilung der Genotypfrequenzen der hier getesteten *TLR9*-Polymorphismen in Abhängigkeit vom *NOD2*-Status in der Kontrollgruppe und den Patientengruppen analysiert und verglichen. Individuen mit mindestens einem mutierten *NOD2*-Allel wurden als *NOD2*+, diejenigen mit zwei *NOD2*-Mutationen als *NOD2*++ und diejenigen ohne Mutation als *NOD2*- klassifiziert. Es konnten keine signifikanten Interaktionen zwischen den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *TLR9*-Polymorphismen und den mit MC assoziierten *NOD2*-Mutationen nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Anteil der T-Allelträger des Polymorphismus *TLR9* -1486 C/T bei *NOD2*+-Individuen höher war, als unter *NOD2*- Individuen ($p=0,03$; $p_2=0,06$ (nach Bonferroni-Korrektur); OR 1,51 [95%CI 1,04-2,21]). Der höchste Anteil an T-Allelträgern fand sich unter Individuen mit zwei *NOD2*-Mutationen. Diese Tendenz in der Verteilung, wie auch der Gen-dosage Effekt, war auch bei den Kontrollen und in der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa zu beobachten, jedoch geringer ausgeprägt. Die beobachtete Tendenz eines zunehmenden Anteils an T-Allelträgern unter *NOD2*+-Individuen kann auch durch die Assoziation des *TLR9* -1237 C-Allels mit *NOD2*-Mutationen bedingt sein. Wie Török et al. in einer kürzlich erschienenen Publikation zeigen konnten, ist der Anteil der *TLR9* -1237 C-Allelträger bei Patienten mit Morbus Crohn, die eine *NOD2*-Mutation tragen höher, als bei *NOD2*-Wildtyp-Trägern. Der höchste Anteil an *TLR9* -1237 C-Allelträgern fand sich bei Patienten mit zwei *NOD2*-Mutationen, es konnte also derselbe Gen-dosage Effekt wie für den *TLR9* -1486 C/T Polymorphismus beobachtet werden {Török, 2009}. Da der Haplotyp -1486T/-1237C mit 13,15% deutlich häufiger auftritt, als der Haplotyp -1486C/-1237C mit 4,59%, könnte der vermutlich funktionell relevante *TLR9* -1237 C/T SNP das tendenziell vermehrte Vorkommen von T-Allelträgern bei *NOD2*+-Patienten mit Morbus Crohn erklären (Haplotypfrequenzen aus {Berghöfer, 2005}). Bei Török et. al lag ein gegensätzlicher Trend in der Verteilung der *TLR9* -1237 T/C-Genotypen in Abhängigkeit vom *NOD2*-Status in der Kontrollgruppe und der Patientengruppe mit Colitis ulcerosa vor, während der *TLR9* -1486 C/T SNP in allen drei Gruppen den gleichen Trend in der *NOD2*-stratifizierten Verteilung zeigte. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete Interaktion nicht krankheitsspezifisch ist, sondern es sich hierbei um Effekte, welche durch ein Kopplungsungleichgewicht hervorgerufen wurden, handelt. Somit kann diesen Interaktionen nicht dieselbe Bedeutung beigemessen werden, wie den beschriebenen Interaktionen mit dem Polymorphismus -1237 T/C {Török, 2009}.

5.2.4.2 Interaktionen mit weiteren krankheitsassoziierten Polymorphismen

Es konnten drei signifikante Interaktionen zwischen dem *TLR9* -1486 C/T Polymorphismus und SNPs im *IL23R*-Gen nachgewiesen werden. Dabei trat das seltenere Risikoallels des Polymorphismus *IL23R* rs11209032 bei *TLR9* -1486 C/T T-Allelträgern im Vergleich zu den Kontrollen vermehrt auf ($p=0,04$). Zusätzlich wurde ein vermindertes Vorkommen der jeweiligen protektiven Allele der Polymorphismen *IL23R* rs11465804 ($p=0,02$), rs11209026 ($p=0,02$) bei homozygoten *TLR9* -1486 C/T T-Allelträgern beobachtet. Zwar weisen die Kontrollgruppe und die Patientengruppe

mit Colitis ulcerosa hinsichtlich der Verteilungen den gleichen Trend auf, jedoch deutlich abgeschwächt. Die stärkste Interaktion besteht mit dem protektiven *IL23R* rs11465804 G-Allel und kommt vermutlich durch die sehr niedrige Frequenz dieses Allels zustande (Morbus Crohn 0,032; Colitis ulcerosa 0,049; Kontrollgruppe 0,062; siehe Tabelle 28). Es ist keine eindeutige Tendenz bezüglich einer Assoziation von protektiven Allelen bzw. Risikoallelen des Polymorphismus *IL23R* mit einem *TLR9* -1486 C/T Genotyp zu erkennen. Das beim Morbus Crohn tendenziell häufigere T-Allel des *TLR9* -1486 C/T Polymorphismus scheint allerdings eher in Kombination mit Risikoallelen der *IL23R*-Polymorphismen aufzutreten, während protektive *IL23R*-Varianten seltener bei T-Allelträgern vorzukommen scheinen. Aus diesem Schema bricht lediglich der Polymorphismus *IL23R* s11209032 aus. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vermutlich keine bedeutenden Interaktionen zwischen den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *TLR9*-Polymorphismen und SNPs im *IL23R*-Gen vorliegen. Die beobachteten leichten Assoziationen stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit zufällige Häufungen dar oder sind durch Kopplungsungleichgewichte mit unbekanntem funktionell relevanten SNPs bedingt.

Eine weitere Assoziation lag zwischen *TLR9* -1486 C/T und den mit Morbus Crohn assoziierten Genen *SLC22A4* 1672 C/T und *SLC22A5* -207G/C im IBD5 Locus vor. Dabei trat der Risiko-Haplotyp TC häufiger bei *TLR9* -1486 C/T T-Allelträgern auf.

Für die Patientengruppe mit Colitis ulcerosa fanden sich keine signifikanten Interaktionen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 855 Individuen mit Morbus Crohn, 481 Individuen mit Colitis ulcerosa und ein Kontrollkollektiv aus 1029 unverwandten, gesunden Individuen hinsichtlich drei verschiedener Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen für den Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) untersucht. Ziel war es, zu ermitteln, ob Assoziationen dieser SNPs mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa oder mit klinischen Subtypen der beiden Erkrankungen vorliegen, und ob Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Genen stattfinden. Angesichts der zahlreichen Hinweise auf die Rolle der bakteriellen Darmflora in der Pathogenese der CED und der bei CED-Patienten beobachteten Veränderungen der immunologischen Abläufe in der Mukosa, kann TLR9, ein Rezeptor für CpG-DNA-Motive und Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort, als funktionelles Kandidatengen betrachtet werden. Zudem konnte für einen weiteren *TLR9*-Polymorphismus, nämlich -1237 C/T bereits eine Assoziation mit Morbus Crohn, bzw. signifikante Interaktionen zwischen diesem *TLR9*-Polymorphismus und krankheitsassoziierten Varianten von *NOD2* und *IL23R* bei Patienten mit Morbus Crohn gezeigt werden {Török, 2004; Török, 2009}. Es wurden für die vorliegende Arbeit drei Polymorphismen ausgewählt, mithilfe derer in Kombination mit den SNPs -1237 C/T und 2848 G/A, für die die Studienpopulation bereits typisiert war, zwischen den elf häufigsten beschriebenen 5-Punkt *TLR9*-Haplotypen differenziert werden kann. Es handelt sich dabei um die beiden Promotorpolymorphismen -1923 A/C und -1486 C/T sowie den Polymorphismus 1174A/G im Intron 1 des *TLR9*-Gens.

Als wichtigstes Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann eine hier erstmals beschriebene Assoziation des Polymorphismus 1174 A/G mit Colitis ulcerosa betrachtet werden. Für den SNP 1174 A/G konnte ein signifikant selteneres Auftreten des A-Allels bei Patienten mit Colitis ulcerosa gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,035$) oder Patienten mit Morbus Crohn ($p=0,002$) gezeigt werden. Signifikant war auch das seltenere Vorkommen des Genotyps AA bei Patienten mit Colitis ulcerosa ($p=0,012$ gegenüber Kontrollgruppe bzw. $p=0,004$ gegenüber Patientengruppe Morbus Crohn) Dies kann im Sinne eines protektiven Effekts des 1174 A/G A-Allels gegenüber Colitis ulcerosa interpretiert werden. Bei der Analyse möglicher Assoziationen des Polymorphismus mit klinischen Charakteristika der Colitis ulcerosa zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen isolierter Proktitis gegenüber Pancolitis und linksseitiger Colitis bei homozygoten G-Allelträgern ($p=0,014$). Eine Assoziation mit Morbus Crohn oder Interaktionen mit anderen krankheitsassoziierten Genen lagen für den SNP 1174 A/G nicht vor.

Weiterhin konnte in dieser Studie eine - wenn auch statistisch nicht signifikant - erhöhte Frequenz des T-Allels bei Patienten mit Morbus Crohn ($p=0,09$), die vor allem durch den Genotyp TT bedingt war, beobachtet werden. Bei der Untersuchung möglicher Interaktionen mit anderen Polymorphismen zeigte sich in der Patientengruppe Morbus Crohn ein vermehrtes Vorkommen von T-Allelträgern bei *NOD2*-Mutationsträgern, und Assoziationen mit *IL23R* Polymorphismen und dem Risikohaplotyp TC im IBD5 Locus. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass - Risiko-assoziierte Varianten im *NOD2*, *IL23R* und im IBD5-Locus bei *TLR9* -1486 T-Allelträgern tendenziell häufiger auftraten. Außerdem ergab die Stratifizierung nach klinischen Subgruppen beim Morbus Crohn ein tendenziell häufigeres Vorkommen des inflammatorischen Krankheitstyps und eine verminderte Rate von Operationen

bei homozygoten T-Allelträgern. Die hier beschriebenen Tendenzen und Assoziationen könnten Zufallsbefunde sein, bzw. durch Kopplungsungleichgewicht mit dem oben erwähnten *TLR9* -1237 C/T oder einem anderen, bislang unbekanntem Polymorphismus zustande kommen. Diese sollten in weiteren unabhängigen Studien überprüft werden, um eine pathogenetische Rolle des Polymorphismus -1486 C/T beim Morbus Crohn besser eingrenzen zu können.

Für den Polymorphismus -1923 A/C konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Allel- oder Genotypfrequenzen zwischen den Patientengruppen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Polymorphismus -1923 A/C nicht mit einer der beiden Erkrankungen assoziiert ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Assoziation des *TLR9*-Polymorphismus 1174 A/G mit Colitis ulcerosa kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass *TLR9* nicht nur, wie bereits beschrieben eine Rolle in der Pathogenese des Morbus Crohn spielt, sondern auch Bedeutung für die Colitis ulcerosa, vor allem die Proktitis ulcerosa, hat. Der Polymorphismus -1486 C/T scheint mit weiteren Suszeptibilitätsvarianten für Morbus Crohn zu interagieren, und das Krankheitsrisiko zu erhöhen. Es handelt sich hierbei jedoch um sehr schwache Effekte, so dass Aussagen über die Krankheitsrelevanz vor Ausschluss anderer Einflüsse (z.B. Kopplungsungleichgewichte) nicht getroffen werden können. Zusammen mit den Beobachtungen bzgl. Interaktionen zwischen dem Polymorphismus -1237 T/C im *TLR9* und Polymorphismen im *NOD2* und *IL23R* {Török, 2009}, unterstützen diese Ergebnisse aus genetischer Sicht jedoch eine Rolle von *TLR9* in der Pathogenese Chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Ein wichtiger Punkt bleibt allerdings die nähere Abgrenzung der funktionellen Relevanz der beschriebenen Assoziationen, was eine große Herausforderung für künftige Untersuchungen darstellt.

7. Literaturverzeichnis

- Abercrombie J. Pathological and Practical Researches on Disease of the Stomach, the Intestinal Tract and Other Viscera of the Abdomen. Edinburgh: Waugh and Innes; 1828.
- Abreu MT. The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:481-9.
- Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:854-66.
- Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002;32:1958-68.
- Aldred PM, Hollox EJ, Armour JA. Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3. *Hum Mol Genet* 2005;14:2045-52.
- Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004;5:417-25.
- Aufses AH, Jr. The history of Crohn's disease. *Surg Clin North Am* 2001;81:1-11, vii.
- Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 2005;202:1715-24.
- Bamias G, Martin C, 3rd, Marini M, et al. Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2003;171:4868-74.
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008;40:955-62.
- Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7:49-56.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9237-42.
- Berghofer B, Frommer T, Konig IR, et al. Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1147-54.
- Beutler B. Tumor Necrosis Factors: The Molecules and Their Emerging Role in Medicine. New York: Raven Press Ltd; 1992.
- Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998;16:351-5.
- Bochud PY, Hersberger M, Taffe P, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *Aids* 2007;21:441-6.
- Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-33.
- Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, et al. Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. Environmental factors in inflammatory bowel disease: a co-twin control study of a Swedish-Danish twin population. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:1147-52.
- Braat H, Stokkers P, Hommes T, et al. Consequence of functional Nod2 and Tlr4 mutations on gene transcription in Crohn's disease patients. *J Mol Med* 2005;83:601-9.
- Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, et al. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:645-52.
- Brant SR, Picco MF, Achkar JP, et al. Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:281-9.
- Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schurmann G, Meuer S. T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut* 1997;41:215-20.
- Browning BL, Huebner C, Petermann I, et al. Association of DLG5 variants with inflammatory bowel disease in the New Zealand Caucasian population and meta-analysis of the DLG5 R30Q variant. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1069-76.
- Browning BL, Huebner C, Petermann I, et al. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2504-12.
- Cariappa A, Sands B, Forcione D, Finkelstein D, Podolsky DK, Pillai S. Analysis of MHC class II DP, DQ and DR alleles in Crohn's disease. *Gut* 1998;43:210-5.

- Cavanaugh J. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001;68:1165-71.
- Chakravarti A. To a future of genetic medicine. *Nature* 2001;409:822-3.
- Cipolla G, Crema F, Sacco S, Moro E, de Ponti F, Frigo G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives. *Pharmacol Res* 2002;46:1-6.
- Coban C, Ishii KJ, Kawai T, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005;201:19-25.
- Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, et al. Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 2000;68:1542-8.
- Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003;361:865-72.
- Colombel JF, Laharie D, Grandbastien B. Anticipating the onset of inflammatory bowel disease. *Gut* 1999;44:773-4.
- Cope GF, Heatley RV, Kelleher JK. Smoking and colonic mucus in ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;293:481.
- Copin R, De Baetselier P, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E. MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J Immunol* 2007;178:5182-91.
- Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* 2000;67:263-8.
- Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, et al. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1063-8.
- Cummings JR, Cooney R, Pathan S, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:941-6.
- Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-74.
- Das K. Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel disease: new insights into autoimmune pathogenesis. *Dig Dis Sci* 1999;11-3.
- Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103:351-61.
- Desplat-Jego S, Johanet C, Escande A, et al. Update on Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies, anti-nuclear associated anti-neutrophil antibodies and antibodies to exocrine pancreas detected by indirect immunofluorescence as biomarkers in chronic inflammatory bowel diseases: results of a multicenter study. *World J Gastroenterol* 2007;13:2312-8.
- D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998;114:262-7.
- Ding Y, Xia B, Lu M, et al. MHC class I chain-related gene A-A5.1 allele is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *Clin Exp Immunol* 2005;142:193-8.
- Donnenberg MS. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 2000;406:768-74.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
- Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, et al. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 2004;72:7202-11.
- Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40:619-22.
- Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 2002;31:41-62.
- Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006;79:439-48.
- Ferguson LR, De Flora S. Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res* 2005;591:24-33.
- Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL, Huebner C, Petermann I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res* 2007;622:70-83.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413:78-83.

- Folwaczny C, Glas J, Török H. Crohn's disease: an immunodeficiency? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;621-6.
- Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Loeschke K, Fricke H. Antineutrophil and pancreatic autoantibodies in first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:523-8.
- Folwaczny C, Noehl N, Tschop K, et al. Goblet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology* 1997;113:101-6.
- Folwaczny M, Glas J, Torok HP, Mauermann D, Folwaczny C. The 3020insC mutation of the NOD2/CARD15 gene in patients with periodontal disease. *Eur J Oral Sci* 2004;112:316-9.
- Fukata M, Michelsen KS, Eri R, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1055-65.
- Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-7.
- Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:8-15.
- Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005;11:681-5.
- Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1157-63.
- Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.
- Glas J, Konrad A, Schmechel S, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol* 2008;103:682-91.
- Glas J, Martin K, Brunnler G, et al. MICA, MICB and C1_4_1 polymorphism in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001;58:243-9.
- Glas J, Seiderer J, Wetzke M, et al. 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* 2007;2:e819.
- Gordon LK, Eggena M, Targan SR, Braun J. Definition of ocular antigens in ciliary body and retinal ganglion cells by the marker antibody pANCA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1250-5.
- Gordon LK, Eggena M, Targan SR, Braun J. Mast cell and neuroendocrine cytoplasmic autoantigen(s) detected by monoclonal pANCA antibodies. *Clin Immunol* 2000;94:42-50.
- Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995;83:793-802.
- Hacker H, Mischak H, Hacker G, et al. Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *Embo J* 1999;18:6973-82.
- Hacker H, Mischak H, Miethke T, et al. CpG-DNA-specific activation of antigenpresenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 1998;17:6230-40.
- Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-11.
- Hamprecht A. Genetische Polymorphismen in Toll-like-Rezeptoren, rheumatoide Arthritis und Höhe von Rheumafaktor im Serum. Berlin: Medizinischen Fakultät der Charité; 2005.
- Hanauer SB, Kucharzik T, Maaser C, et al. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities
- Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12 Suppl 1:S3-9.
- Hartmann G, Battiany J, Poeck H, et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003;33:1633-41.
- Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000;164:944-53.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.

- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:79-94.
- Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, Vatn MH, Moum B. Are there any differences in phenotype or disease course between familial and sporadic cases of inflammatory bowel disease? Results of a population-based follow-up study. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1955-63.
- Heppell, Jacques MD. Surgical management of inflammatory bowel disease 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/10592&view=3dprint>.)
- Heresbach D, Gulwani-Akolkar B, Lesser M, et al. Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2368-72.
- Hollander D. Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep* 1999;1:410-6.
- Holtmann M, Mudter J, Galle PR, Neurath MF. [The mucosal immune system. How clear is the pathophysiology?]. *Internist (Berl)* 2002;43:1343-4, 7-53.
- Holtmann MH, Douni E, Schutz M, et al. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur J Immunol* 2002;32:3142-51.
- Holtmann MH, Galle PR, Neurath MF. Immunotherapeutic approaches to inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:455-66.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002;168:4531-7.
- Hue S, Ahern P, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006;203:2473-83.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-3.
- Ina K, Itoh J, Fukushima K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999;163:1081-90.
- Ince MN, Elliott DE. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surg Clin North Am* 2007;87:681-96.
- Innate Immunity PGA, NHLBI Program in Genomic Applications. TLR9.snpper. 2008. (Accessed 11.09.2008, at <http://innateimmunity.net/IIPGA2/PGAs/InnateImmunity/snpfiles/TLR9/TLR9.snpper.html>.)
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-12.
- Jabbari K, Bernardi G. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene* 2004;333:143-9.
- Jewell D. Ulcerative Colitis. In: al MFe, ed. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Philadelphia: W.B. Saunders 2002:2039-67.
- Kakuta Y, Kinouchi Y, Negoro K, Takahashi S, Shimosegawa T. Association study of TNFSF15 polymorphisms in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;55:1527-8.
- Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European Journal of Radiology* 2000;35:154-67.
- Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckmann L, Raz E. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 2005;115:695-702.
- Kawagoe T, Sato S, Jung A, et al. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J Exp Med* 2007;204:1013-24.
- Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:1034-41.
- Klein W, Tromm A, Griga T, et al. Interaction of polymorphisms in the CARD15 and CD14 genes in patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:834-6.
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731-4.
- Korzenik JR, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ. Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005;352:2193-201.

- Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:277-86.
- Krishnan A, Korzenik JR. Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:21-39.
- Krug A, French AR, Barchet W, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004;21:107-19.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004;103:1433-7.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-63.
- Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:795-804.
- Kuo CC, Lin WT, Liang CM, Liang SM. Class I and III phosphatidylinositol 3'-kinase play distinct roles in TLR signaling pathway. *J Immunol* 2006;176:5943-9.
- Lachheb J, Dhifallah IB, Chelbi H, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens* 2008;71:417-25.
- Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005;11:1489-95.
- Lammers KM, Ouburg S, Morre SA, et al. Combined carriership of TLR9-1237C and CD14-260T alleles enhances the risk of developing chronic relapsing pouchitis. *World J Gastroenterol* 2005;11:7323-9.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004;5:190-8.
- Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 2003;81:85-91.
- Lee J, Gonzales-Navajas JM, Raz E. The "polarizing-tolerizing" mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin Immunopathol* 2008;30:3-9.
- Lee J, Mo JH, Katakura K, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:1327-36.
- Lee JC, Bridger S, McGregor C, Macpherson AJ, Jones JE. Why children with inflammatory bowel disease are diagnosed at a younger age than their affected parent. *Gut* 1999;44:808-11.
- Lee KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q, Snapper CM. TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cell Immunol* 2007;245:103-10.
- Levine A, Karban A, Eliakim R, et al. A polymorphism in the TNF-alpha promoter gene is associated with pediatric onset and colonic location of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:407-13.
- Lindberg E, Tysk C, Andersson K, et al. Smoking and inflammatory bowel disease. *Gut* 1988;29:352-7.
- Lockhart-Mummery HE, Morson BC. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut* 1960;1:87-105.
- Loftus EV, Jr., Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:1-20.
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:513-20.
- Madretsma S, Wolters LM, van Dijk JP, et al. In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:1017-20.
- Mallas EG, Mackintosh P, Asquith P, Cooke WT. Histocompatibility antigens in inflammatory bowel disease. Their clinical significance and their association with arthropathy with special reference to HLA-B27 (W27). *Gut* 1976;17:906-10.
- Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;351:2069-79.
- Merrett MN, Mortensen N, Kettlewell M, et al. Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Gut* 1996;38:362-4.

- Mirza MM, Fisher SA, King K, et al. Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2003;72:1018-22.
- Morgagni G. *Seat and Causes of Diseases*. Book 111, Letter XXXI, Article 2 ed. New York: Hafner Publishing; 1960.
- Moum B, Ekblom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease -- methodological considerations. *Digestive and Liver Disease* 2002;34:364-9.
- Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, et al. Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dIlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett* 1998;433:63-7.
- Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B α ubiquitination. *Science* 2000;289:1560-3.
- Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 2007;13:26-8.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-90.
- Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002;195:1129-43.
- Ng MW, Lau CS, Chan TM, Wong WH, Lau YL. Polymorphisms of the toll-like receptor 9 (TLR9) gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1456-7.
- Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2007;133:1670-89.
- Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2004;34:177-83.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353-64.
- Onnie CM, Fisher SA, Pattni R, et al. Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:263-71.
- Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1075-81.
- Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998;161:5733-44.
- Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471-5.
- Peppercorn, Mark A MD. Clinical manifestations and diagnosis of Crohn's disease in adults 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/5518&view=3dprint>.)
- Peppercorn, Mark A MD. Clinical manifestations, diagnosis, and prognosis of ulcerative colitis in adults 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/4680&view=3dprint>.)
- Peppercorn, Mark A MD. Definition of and risk factors for inflammatory bowel disease 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/4555&view=3dprint>.)
- Peppercorn, Mark A MD. Medical management of ulcerative colitis 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/5061&view=3dprint>.)
- Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* 1992;3:47-52.
- Pierik M, Joossens S, Van Steen K, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1-8.
- Pierik M, Rutgeerts P, Vlietinck R, Vermeire S. Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:3657-67.
- Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.

- Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
- Qiao L, Schurmann G, Betzler M, Meuer SC. Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology* 1991;101:1529-36.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004;126:520-8.
- Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease--Are we there yet? *World J Gastroenterol* 2006;12:7097-103.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-41.
- Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98:945-53.
- Rath HC, Schultz M, Freitag R, et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001;69:2277-85.
- Reif S, Lavy A, Keter D, et al. Lack of association between smoking and Crohn's disease but the usual association with ulcerative colitis in Jewish patients in Israel: a multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:474-8.
- Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001;29:223-8.
- Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39:596-604.
- Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* 1989;96:1016-20.
- Rumio C, Besusso D, Palazzo M, et al. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *Am J Pathol* 2004;165:373-81.
- Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Am J Gastroenterol* 1995;90:740-7.
- Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR. Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis: results of a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1996;71:431-6.
- Sands B. Crohn's disease. In: al MFe, ed. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. Philadelphia: W.B. Saunders 2002:2005-38.
- Sartor R. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirshner J, ed. *Inflammatory Bowel Disease*. 5th ed ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999:153-78.
- Sartor RB. Review article: How relevant to human inflammatory bowel disease are current animal models of intestinal inflammation? *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11 Suppl 3:89-96; discussion -7.
- Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126:1620-33.
- Sartor, R Balfour MD. Antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/14540&view=3dprint>).
- Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;55:749-53.
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001;2:947-50.
- Schreiber S, Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Stoll M, Folsch UR. [Genetics and the environment. Has the picture become clearer?]. *Internist (Berl)* 2002;43:1335-41.
- Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 2005;6:376-88.

- Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, et al. 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* 2006;12:1114-21.
- Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, et al. 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* 2008;14:437-45.
- Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002;359:62-9.
- Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2007;178:6252-8.
- Snapper, Scott B MD, PhD, Podolsky, Daniel K MDImmune and microbial mechanisms in the pathogenesis of inflammatory bowel disease 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/7894&view=3dprint.>)
- Sonnenberg A. Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees. *Gut* 1990;31:1037-40.
- Srivastava ED, Barton JR, O'Mahony S, et al. Smoking, humoral immunity, and ulcerative colitis. *Gut* 1991;32:1016-9.
- Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139-45.
- Stoll M, Corneliusen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease
- Identification of a novel human homolog of the Drosophila dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *Nat Genet* 2004;36:476-80.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
- Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol* 2004;16:17-22.
- Tamboli CP. Current medical therapy for chronic inflammatory bowel diseases. *Surg Clin North Am* 2007;87:697-725.
- Tao K, Fujii M, Tsukumo S, et al. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2007;66:905-9.
- Targan SR, Deem RL, Liu M, Wang S, Nel A. Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J Immunol* 1995;154:664-75.
- J. E. M. Teitelbaum, W. A. M. Walker. Nutritional considerations in inflammatory bowel disease 2007. (Accessed 01.02.2008, at <https://docweb.lrz-muenchen.de/cgi-bin/doc/nph-webdoc.cgi/000110A/http/www.uptodateonline.com/utd/content/topic.do=3ftopicKey=3dinflam bd/6856&view=3dprint.>)
- Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *Bmj* 1996;312:95-6.
- Torok HP, Glas J, Endres I, et al. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1723-33.
- Torok HP, Glas J, Lohse P, Folwaczny C. Alterations of the CARD15/NOD2 gene and the impact on management and treatment of Crohn's disease patients. *Dig Dis* 2003;21:339-45.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 2004;127:365-6.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, et al. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1421-7.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004;112:85-91.
- Torok HP, Goke B, Konrad A. Pharmacogenetics of Crohn's disease. *Pharmacogenomics* 2008;9:881-93.
- Trachtenberg EA, Yang H, Hayes E, et al. HLA class II haplotype associations with inflammatory bowel disease in Jewish (Ashkenazi) and non-Jewish caucasian populations. *Hum Immunol* 2000;61:326-33.

- Tremelling M, Berzuini C, Massey D, et al. Contribution of TNFSF15 gene variants to Crohn's disease susceptibility confirmed in UK population. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:733-7.
- Tsalenko A, Ben-Dor A, Cox N, Yakhini Z. Methods for analysis and visualization of SNP genotype data for complex diseases. *Pac Symp Biocomput* 2003:548-61.
- Tuvlin, Jeffrey A.; Sania S. Raza. Smoking and inflammatory bowel disease: Trends in familial and sporadic cohorts. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007;13:573-9.
- Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-6.
- van den Berg-Loonen EM, Dekker-Saeys BJ, Meuwissen SG, Nijenhuis LE, Engelfriet CP. Histocompatibility antigens and other genetic markers in ankylosing spondylitis and inflammatory bowel diseases. *J Immunogenet* 1977;4:167-75.
- van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004;13:763-70.
- van Heel DA, Ghosh S, Hunt KA, et al. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1553-7.
- van Heel DA, Udalova IA, De Silva AP, et al. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet* 2002;11:1281-9.
- Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, et al. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut* 2007;56:1173-4.
- Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, et al. The genetics of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102:2820-31.
- Various. Ulcerative colitis. 2008. (Accessed at http://en.wikipedia.org/wiki/Ulcerative_colitis.)
- Various. NOD2. 2008. (Accessed at <http://en.wikipedia.org/wiki/NOD2>.)
- Various. TLRs. 2008. (Accessed at <http://en.wikipedia.org/wiki/TLRs>.)
- Various. CpG site. 2008. (Accessed at <http://en.wikipedia.org/wiki/CpG>.)
- Vashishtha A, Fischetti VA. Surface-exposed conserved region of the streptococcal M protein induces antibodies cross-reactive with denatured forms of myosin. *J Immunol* 1993;150:4693-701.
- Wagner H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:62-9.
- Wagner H. The sweetness of the DNA backbone drives Toll-like receptor 9. *Curr Opin Immunol* 2008;20:396-400.
- Watanabe M. [Crossing between mucosal immunity and epithelial regeneration/differentiation in the human intestine]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2006;29:295-302.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53:1658-64.
- Wehkamp J, Stange EF. NOD2 mutation and mice: no Crohn's disease but many lessons to learn. *Trends Mol Med* 2005;11:307-9.
- Werner T, Haller D. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: From the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutat Res* 2007;622:42-57.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002;420:324-9.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:1144-50.
- Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 2005;14:3499-506.
- Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993;34:517-24.
- Yang SK, Loftus EV, Jr., Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:260-70.
- Yi AK, Yoon JG, Yeo SJ, Hong SC, English BK, Krieg AM. Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J Immunol* 2002;168:4711-20.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 TLR9 Proteinstruktur {aus: Takeshita, 2004}.....	31
Abbildung 2 <i>TLR9</i> -Gen mit einer Auswahl von SNPs (gekennzeichnet sind der Transkriptionsstart (TS), der Translationsstart (0) und die Lage der Polymorphismen relativ zum Startcodon) {aus: Hamprecht, 2005}.....	34
Abbildung 3 Schmelzkurve -1923 A/C.....	53
Abbildung 4 Verteilung der <i>TLR9</i> -1923 A/C Genotypen.....	54
Abbildung 5 Schmelzkurve -1486 C/T.....	55
Abbildung 6 Verteilung der <i>TLR9</i> - 1486 C/T Genotypen.....	56
Abbildung 7 Schmelzkurve 1174 A/G.....	57
Abbildung 8 Verteilung der <i>TLR9</i> 1174 A/G Genotypen.....	58
Abbildung 9 Patientengruppe CU <i>TLR9</i> 1174 A/G*Montreal Klassifikation.....	60
Abbildung 10 <i>NOD2</i> * <i>TLR9</i> -1486 C/T.....	64

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TLR-Familie {Übersicht in: Various, 2008}.....	30
Tabelle 2 Die sieben häufigsten <i>TLR9</i> -Haplotypen in verschiedenen ethnischen Gruppen {aus: Lazarus, 2003}.....	34
Tabelle 3 Die elf <i>TLR9</i> -Haplotypen nach Berghöfer et al. {Berghöfer, 2005}.....	35
Tabelle 4 Basisdaten der Studienpopulation und phänotypische Einteilung der Patientengruppen (MC: n=855, CU: n=481).....	40
Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien.....	41
Tabelle 6 Enzyme.....	41
Tabelle 7 Synthetische Oligonukleotide.....	41
Tabelle 8 Verwendete Nukleotidsequenzen.....	42
Tabelle 9 Primer für Standard-PCR (Sequenzierung).....	42
Tabelle 10 Primer für RT-PCR.....	42
Tabelle 11 Sonden für Genotypisierung.....	43
Tabelle 12 Kitsysteme.....	43
Tabelle 13 Einwegmaterialien.....	43
Tabelle 14 Geräte.....	43
Tabelle 15 Bedingungen und Reaktionsansätze der Standard-PCR.....	46
Tabelle 16 Reaktionsansätze der RT-PCR.....	48
Tabelle 17 Standard-RunProtocol der RT-PCR.....	49
Tabelle 18 Annealing Temperature für die RT-PCR.....	49
Tabelle 19 Schmelzpunkte der Sonden für den -1923 A/C Polymorphismus.....	53
Tabelle 20 Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus <i>TLR9</i> -1923 A/C.....	54
Tabelle 21 Schmelzpunkte der Sonden für den -1486 C/T Polymorphismus.....	55
Tabelle 22 Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus - 1486 C/T.....	56
Tabelle 23 Schmelzpunkte der Sonden für den 1174 A/G Polymorphismus.....	57
Tabelle 24 Allel- und Genotypfrequenzen des Polymorphismus 1174 A/G.....	58
Tabelle 25 Genotyp-Phänotyp Korrelationen MC.....	59
Tabelle 26 Genotyp-Phänotyp Korrelationen UC.....	60
Tabelle 27 Patientengruppe CU <i>TLR9</i> 1174 A/G*Montreal Klassifikation.....	60
Tabelle 28 Genotypen für alle SNPs für die eine Analyse auf genetische Interaktionen mit dem <i>TLR9</i> -Polymorphismen vorgenommen wurde: MAF=minor allele frequency; die OR [95% CI] gilt für den Vergleich zwischen MC bzw. CU und den Kontrollen.....	62
Tabelle 29 Patientengruppe Morbus Crohn und Kontrollen <i>TLR9</i> C1486T * <i>NOD2</i>	63
Tabelle 30 Interaktionen <i>IL23R</i> * <i>TLR9</i> -1486 C/T MC und Kontrollen.....	64
Tabelle 31 Interaktionen OCTN-Haplotyp* <i>TLR9</i> -1486 C/T MC und Kontrollen.....	65
Tabelle 32 Vergleich des SNP -1923 A/C mit Daten aus der Literatur.....	69
Tabelle 33 Vergleich des SNP -1486 C/T mit Daten aus der Literatur.....	70
Tabelle 34 Vergleich des SNP 1174 A/G mit Daten aus der Literatur.....	71

10. Abkürzungsverzeichnis

ABCB1: ATP-binding cassette subfamily B member 1
AP-1: Activating Protein 1
ATG16L1: Autophagy related 16-like 1
C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein
CARD15: caspase activation and recruitment domain 15
cDCs: conventional dendritic cells
CED: chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen
CREB: c-AMP-responsive element-binding protein
CU: Colitis Ulcerosa
DD: Death domain
DLG5: Drosophila discs large homologue 5
ERK: extracellular receptor kinase
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
GALT: gut-associated lymphoid tissue
GUK: guanylate kinase
HBD-2, HBD-3 und HBD4: human beta defensins B2, B3 und B4
HLA: human leukocyte antigen
HSV: Herpes simplex virus
IBD: inflammatory bowel disease
IKDCs: IFN-producing natural killer dendritic cells
IKK: I κ B kinase complex
IL: Interleukin
IL-23R: Interleukin-23 Rezeptor
IRAK1: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK4: Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF3: Interferon Regulatory Factor 3
IRF-5: IFN-regulatory factor 5
JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase
LBP: LPS binding protein
LPS: Lipopolysaccharid
LRR: Leucine-rich repeat
MAGUK: membran associated guanylate kinase homologues
MC: Morbus Crohn
MCMV: murine cytomegalovirus
MDP: Muramyl Dipeptid
MHC: major histocompatibility complex
MICA: MHC class I chain gene A
Myd88: Myeloid Differentiation primary response gene 88
NF- κ B: Nuclear Factor- κ B
NOD2: Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMCs: peripheral blood mononuclear cells
PCR: polymerase chain reaction
PD: Phosphodiester 2'-Desoxyribose
PDCs: plasmacytoid dendritic cells
PDZ: protein interaction motif
PI3 K: Phosphoinositide 3 kinase
PRR: Pattern Recognition Receptors
PS: Phosphothiotat 2'-Desoxyribose
RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RR: Relatives Risiko
RT-PCR: Real-time PCR
SH3: Scr homology 3
SLC22A4 und SLC22A5: sodium dependent organic cation transporter A4 und A5
SLE: Systemischer Lupus erythematosus
SNPs: Single Nucleotide Polymorphismen
TAK1: Transforming growth factor- β associated kinase 1
TBK1: TANK-binding kinase 1
TIR: Toll-IL-1 Rezeptor
Tirap: TIR domain containing adaptor protein
TLR9: Toll-like Receptor 9
TLRs: Toll-like Rezeptoren
TNFSF15: tumor necrosis factor superfamily
TNF- α : tumor necrosis factor α
TRAF6: Tumor necrosis factor associated factor 6
Trif: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. med. Christian Folwaczny danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Integration in seine Arbeitsgruppe. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Helga-Paula Török für die wissenschaftliche Betreuung und stetige Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Entstehung dieser Arbeit. Ohne die kompetente Beratung von Frau Kerstin Maier, die mir in allen Bereichen des Laboralltags zur Seite stand, wäre der experimentelle Teil der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen, dafür danke ich ihr an dieser Stelle ganz herzlich. Auch Herrn Dr. med. Dipl.-biol. Jürgen Glas möchte ich für seine Unterstützung bei der Auswahl der Primer und Bedingungen der RT-PCR danken.

Für die finanzielle Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare und systembiologische Medizin“ des „Förderprogramms für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich den Verantwortlichen, hierbei sei vor allem Herr Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, Vorsitzender der Kommission FöFoLe genannt.

Meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben, und zu allen Zeiten stets unterstützend zur Seite standen, möchte ich meinen allerherzlichsten Dank aussprechen. Nicht zuletzt danke ich meinem Mann, der mit viel Geduld und Humor alle Höhen und Tiefen der Promotion miterleben musste, sowie meiner kleinen Tochter, die durch ihre Anwesenheit während des Verfassens der Arbeit meine Motivation stets beflügelt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Johanna Herzog, geb. Konnerth geb. 25.01.1982 in München
1988 - 1992	Grundschule am Winthirplatz, München
1992 – 1996	Willi- Graf- Gymnasium(NG), München
1996 - 1999	Wilhelmsgymnasium (HG), München
1999 – 2001	Landschulheim Marquartstein, Marquartstein
29. 06.2001	Abitur (1,0)
9/ 2001 - 2/2003	nach vorrausgehender betriebsinterner Ausbildung und Praktika Teilzeit- bzw Aushilfstätigkeit bei Kieser Training, München
2002	Beginn des Studiums der Philosophie an der Hochschule für Philosophie der Jesuiten, München
April 2003	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU, München
März 2005	Physikum (2,0)
April 2005 – April 2010	Klinischer Studienabschnitt an der TUM
November 2005	Beginn der Doktorarbeit im Rahmen des Promotionsstudienganges "Molekulare Medizin" der LMU in der Arbeitsgruppe "Molekulare Gastroenterologie"
Februar 2006	Famulatur auf der Frühgeborenenstation, Kinderklinik des Schwabinger Krankenhauses, München
September 2006	Famulatur in der Inneren Medizin/ Hämato-Onkologie im Lenox Hill Community Medical Center, New York
März/ April 2007	Famulatur in der Pädiatrie/ Hämato-Onkologie im Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto
April 2008 – Januar 2009	Elternzeit
Februar 2009 – Januar 2010	Praktisches Jahr Innere Medizin: Weill Medical College der Cornell University, New York, USA; Chirurgie: Klinikum Bogenhausen, München; Pädiatrie: Kinderklinik Schwabing, München
April 2010	2.Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1,0)
August 2010	Assistenzärztin in der Kinderklinik Schwabing - Kinderonkologie, München