

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

Direktor: Prof. Dr. B. Göke

**Die Rolle des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus bei chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen**

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

vorgelegt von
Dorothea Leistner
aus
Salzburg

2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Julia Seiderer-Nack

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Roland Kappler
Prof. Dr. Hans-Joachim Anders
Prof. Dr. Sibylle Koletzko

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Stephan Brand

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

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2011

Auszüge dieser Arbeit wurden nach Genehmigung durch das Dekanat vorab veröffentlicht:

1. Seiderer J, Dambacher J, **Leistner D**, Tillack C, Glas J, Niess JH, Pfennig S, Jürgens M, Müller-Myhsok B, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Reinecker HC, Brand S. Genotype-phenotype analysis of the CXCL16 p.Ala181Val polymorphism in inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2008; 127: 49-55

2. Seiderer J, Dambacher J, **Leistner D**, Niess JH, Pfennig S, Diebold J, Haller D, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Reinecker HC, Brand S. Enhanced expression of the chemokine CXCL16 in intestinal inflammation and association of the CXCL16 p.Ala181Val polymorphism with early disease onset and ileal involvement in patients with CD: Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 19-24th 2007, Washington DC, USA
Gastroenterology 2007; 132: Suppl. 2-A457

Meinen Eltern und meiner Oma

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	3
1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	3
1.1.1. Definition	3
1.1.2. Inzidenz und Prävalenz	3
1.1.3. Klinik und Krankheitsverlauf der CED	4
1.1.4. Orale Manifestationen der CED	8
1.1.5. Ätiologie und Pathogenese der CED	11
1.2. Genetische Grundlagen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	15
1.2.1. Das <i>NOD2/CARD15</i> -Gen in der Pathogenese des Morbus Crohn	16
1.2.2. Weitere Suszeptibilitätsgene bei CED	19
1.2.3. Genetische Faktoren in der Pathogenese der Parodontitis und der oralen Manifestation des Morbus Crohn	22
1.3. Chemokine – Zytokine mit chemotaktischer Funktion	23
1.3.1. Immunologische Funktion der Chemokine	23
1.3.2. Die Chemokine CXCL16 und CX3CL1 (Fraktalkine)	26
1.3.3. Chemokine in der Pathogenese der CED	27
1.4. Ziele der Arbeit	30
2. MATERIAL UND METHODIK	32
2.1. Studienpopulation	32
2.1.1. Patienten-Rekrutierung	32
2.1.2. Datenerhebung und Parameter der phänotypischen Auswertung	32
2.2. Verwendete Materialien und Laborgeräte	34
2.3. Methodik	37
2.3.1. DNA-Extraktion	37
2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
2.3.3. DNA-Sequenzierung	40
2.3.4. Agarose-Gel-Elektrophorese	41
2.3.5. Genotypisierung des p.Ala181Val-Polymorphismus des <i>CXCL16</i> -Gens mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	42

2.4. Genotypisierung der <i>NOD2/CARD15</i> -Varianten	44
2.5. Statistik	45
3. ERGEBNISSE	46
3.1. Demographische Daten der Studienpopulation	46
3.2. Genotyp-Analyse des <i>CXCL16</i> p.Ala181Val-Polymorphismus sowie der <i>NOD2/CARD15</i> -Varianten in CED-Patienten und gesunden Probanden	47
3.2.1. Allel-Frequenz des <i>CXCL16</i> p.Ala181Val-Polymorphismus	47
3.2.2. Allel-Frequenz der <i>NOD2/CARD15</i> -Varianten	48
3.3. Genotyp-Phänotyp-Analyse des <i>CXCL16</i> p.Ala181Val-Polymorphismus	49
3.3.1. Genotyp-Phänotyp-Analyse der Patienten mit Morbus Crohn	49
3.3.2. Genotyp-Phänotyp-Analyse der Patienten mit Colitis ulcerosa	59
3.4. Kombinierte Genotyp-Phänotyp-Analyse unter Berücksichtigung des <i>CXCL16</i> +/ <i>NOD2</i> -Genotyps	66
4. DISKUSSION	74
5. ZUSAMMENFASSUNG	78
6. LITERATURVERZEICHNIS	80
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110
8. ANHANG	113
9. DANKSAGUNG	117
10. LEBENSLAUF	118

1. EINLEITUNG

1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1. Definition

Als chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) (engl.: inflammatory bowel disease, IBD) bezeichnet man schubweise auftretende, chronische Entzündungen des Darms. Die beiden am häufigsten auftretenden Krankheitsbilder sind der Morbus Crohn (M. Crohn) und die Colitis ulcerosa.

Die Krankheit M. Crohn wurde erstmals 1932 von ihrem Namensgeber, dem Gastroenterologen Dr. Burrill Bernard Crohn (1884-1983) beschrieben (Crohn et al., 1932).

Weitere Bezeichnungen der Erkrankung sind: Crohn-Krankheit, Ileitis regionalis/terminalis, Enteritis regionalis Crohn oder Ileocolitis regionalis/terminalis. Beim M. Crohn handelt es sich um eine multifaktorielle, alle Wandschichten betreffende granulomatöse Entzündung, die den gesamten Magen-Darm-Trakt von der Mundhöhle bis zum After betreffen kann; bevorzugt befallen sind jedoch meist die terminalen Ileumabschnitte.

Die Colitis ulcerosa (syn. ulcerative Colitis) zeichnet sich durch einen entzündlichen Befall des Rektums und des Dickdarms aus. Dieses Krankheitsbild wurde erstmals 1859 von Sir S. Wilks beschrieben (Wilks, 1859). Entgegen dem M. Crohn betrifft die Erkrankung nicht alle Darmwandschichten, sondern ist auf die Mukosa beschränkt. Die Entzündung der Darmschleimhaut dehnt sich vom Rektum ausgehend kontinuierlich nach proximal aus.

1.1.2. Inzidenz und Prävalenz

Die Inzidenz des M. Crohn liegt in den westlichen Industriestaaten bei etwa 3-5 auf 100.000 Einwohnern; bei der Colitis ulcerosa liegt sie bei etwa 2-5 auf 100.000 Einwohnern (Jacobsen

et al., 2006). Die Prävalenz wird beim M. Crohn auf etwa 30-55 pro 100.000 Einwohnern geschätzt und bei der Colitis ulcerosa auf etwa 25-50 pro 100.000 Einwohnern. Bei beiden Erkrankungen sind Frauen und Männer gleichermaßen betroffen. Beim M. Crohn erkranken jedoch vor allem junge Erwachsene zwischen dem 16. und 35. Lebensjahr, sowie wieder ältere Menschen ab dem 60. Lebensjahr (Baumgart et al., 2007). Bei der Inzidenz und Prävalenz sind jedoch auch geographische sowie ethnische Variationen zu beobachten. Demnach erkranken die Bewohner der Nordhalbkugel häufiger als die Bewohner der südlichen Hemisphäre und Menschen mit europäischer oder afroamerikanischer Herkunft häufiger als Asiaten oder hispanisch-stämmige Bevölkerungsschichten (Baumgart et al., 2007).

1.1.3. Klinik und Krankheitsverlauf

M. Crohn gehört zusammen mit der Colitis ulcerosa zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit schubweisem Verlauf. Histologisch zeigen sich beim M. Crohn mehrkernige Riesenzellen, Epitheloidzellgranulome und aphtenähnliche Geschwüre der Schleimhaut mit Fissuren und Fistelbildung (Yantiss et al., 2006). Die Leitsymptome des M. Crohn sind rezidivierend auftretende Diarrhoen (meist ohne Blutbeimengung), Bauchschmerzen (bei Mitbeteiligung des terminalen Ileums im rechten Unterbauch lokalisiert), Fieber, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Anämie, selten auch ein Befall der Mundschleimhaut, sowie bei Kindern oft als Erstsymptom eine Wachstumsretardierung (Mekhijan et al., 1979; Russel et al., 2004). Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa sind die entzündlichen Veränderungen diskontinuierlich (sog. „skip lesions“) und transmural. Hierbei zeigen sich aphtöse Läsionen und fissurale Ulzera eingebettet zwischen ödematös aufgetriebenen Schleimhautinseln (sog. „Pflastersteinrelief“).

Der M. Crohn wird phänotypisch nach der Vienna-Klassifikation (Gasche et al., 2000) unterteilt, die auf dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose (A), der Lokalisation (L) sowie dem Verhaltensmuster (B) der Krankheit basiert (siehe Tabelle 1) und in der vorliegenden Arbeit Verwendung findet.

Alter	
A1	< 40 Jahre
A2	> 40 Jahre
Lokalisation	
L1	terminales Ileum
L2	Kolon
L3	Ileokolon
L4	oberer Gastrointestinaltrakt
Krankheitsverhalten	
B1	nicht stenosierend, nicht penetrierend
B2	stenosierend
B3	penetrierend

Tabelle 1: Einteilung des M. Crohn nach der Vienna-Klassifikation

Seit 2006 kann der M. Crohn auch nach der Montreal Klassifikation (Silverberg et al., 2005) in drei Gruppen unterteilt werden: A1-A3 (Alter), L1-L4 (Lokalisation) und B1-B3p (Krankheitsverhalten) (siehe Tabelle 2).

Neben den typischen Symptomen des Magen-Darm-Traktes können beim M. Crohn auch extraintestinale Manifestationen auftreten. Am häufigsten ist dadurch die Haut mit Veränderungen in Form von einem Erythema nodosum oder einem Pyoderma gangraenosum (Farmer et al., 1975) sowie die Gelenke in Form von Arthritiden/Arthralgien oder einer Sakroileitis betroffen (Wordsworth, 1998, Holden et al., 2003). Außerdem können das Skelett (Osteopenie, Osteoporose), das Auge (Iritis, Iridocyclitis, Uveitis), der obere Gastrointestinaltrakt und die Leber/Gallenwege (Steatosis hepatis, primär sklerosierende Cholangitis) betroffen sein (Petrelli et al., 1982, Rasmussen et al., 1997, Danese et al., 2005). Die Erkrankung M. Crohn weist zudem mögliche Komplikationen wie Fisteln

(Perianalfisteln), Stenosen (Ileus), Gallen- und Nierensteinbildung, Fissuren und Abszesse auf (Schwartz et al., 2002, Russel et al., 2004). Bei Erkrankung im Kindesalter treten Wachstums- und Gelenkstörungen auf, die zum Minderwuchs führen können. Weitere Komplikationen kann die, durch den Ileumbefall oder durch eine operative Resektion hervorgerufene, Malabsorption bewirken. Diese führt vor allem zu einem Vitamin B12-Mangel mit der daraus entstehenden perniziösen Anämie (Danese et al., 2005), Harnsäuresteinen (Obialo et al., 1991), Osteoporose (Silvennoinen et al., 1995) sowie Gallensäureverlust mit Gallensteinbildung und chologener Diarrhoe (Hutchinson et al., 1994). Die Stenosen sind anfangs meist durch eine Einengung des betroffenen Darmsegments während des entzündlichen Prozesses bedingt, zu späteren Zeitpunkten durch fibrösen Umbau und Strikturen. Im Verlauf der Erkrankung tritt bei ca. 20% - 30% der Patienten ein Ileus infolge von Stenosen auf (Louis et al., 2001).

Grundsätzlich kann man als Leitsymptome der Colitis ulcerosa rezidivierende Diarrhoen (blutig, oft mit Schleim) mit schmerzhaften Entleerungen, Tenesmen, Darmblutungen, Bauchschmerzen/Koliken, Gewichtsverlust, Fieber und Anämien nennen. Innerhalb eines Jahres können 40-70% der Patienten aus der Remission einen erneuten Schub entwickeln. Auch bei Colitis ulcerosa sind die zuvor genannten extraintestinalen Manifestationen zu finden. Als mögliche Komplikationen bei der Colitis ulcerosa müssen das kolorektale Karzinom, das toxische Megakolon und ein therapierefraktärer Blutverlust genannt werden. Die Colitis ulcerosa wird nach der Montreal Klassifikation (siehe Tabelle 2) aufgrund der anatomischen Lokalisation in drei Krankheitssubtypen unterteilt: E1 Proktitis (Rektum, Ausbreitung distal des Sigmoids), E2 Linksseitenkolitis (Colon descendens, Ausbreitung distal der linken Kolonflexur) und E3 Pankolitis (gesamtes Kolon, Ausbreitung bis proximal der linken Kolonflexur).

M. Crohn	
A1	< 16 Jahre bei Diagnose
A2	> 17 – 40 Jahre
A3	> 40 Jahre
L1	terminales Ileum
L2	Kolon
L3	Ileokolon
L4	oberer GI-Trakt
B1	nicht strikturierend, nicht penetrierend
B2	strikturierend
B3	intern penetrierend
B3p	perianal penetrierend
Colitis ulcerosa	
E1	Proktitis
E2	Linksseitenkolitis
E3	Pankolitis

Tabelle 2: Montreal Klassifikation des M. Crohn und der Colitis ulcerosa (nach: Silverberg et al., 2005)

Die folgende Tabelle 3 zeigt noch einmal die wichtigsten Charakteristika beider Krankheitsbilder:

	M. Crohn	Colitis ulcerosa
Lokalisation	gesamter Gastrointestinaltrakt	primär Rektum
Ausbreitung	diskontinuierlich	kontinuierlich
Symptomatik	extraintestinale Manifestationen, Diarrhoe (meist ohne Blut)	Tenesmen, blutig-schleimige Diarrhoe
Röntgen	Stenosen, segmentäre Fisteln, Pseudopolypen, „Pflastersteinrelief“	Pseudopolypen, „Gartenschlauch“-Phänomen (Haustrenverlust)
Endoskopie	Stenosen, Fisteln, scharf begrenzte Ulzerationen	Kontaktblutungen, diffuse Ulzerationen
Histologie	epitheloidzellige Granulome, gesamte Darmwand betroffen	oberflächliche Ulzera, Kryptenabszesse, nur Mukosa und Submukosa betroffen
Chirurgie	rezidiv auch nach Operationen	kurativ
Komplikationen	Fisteln, Stenosen, maligne Entartung, extraintestinale Komplikationen	maligne Entartung, Blutungen, Perforationen, toxisches Megakolon

Tabelle 3: Charakteristische Merkmale von M. Crohn und Colitis ulcerosa (nach: Reuter P., „Springer Lexikon, Diagnose und Therapie“, Springer 2006)

1.1.4. Orale Manifestationen der CED

Bevor die Erstdiagnose M. Crohn überhaupt gestellt wird, können in der Mundhöhle schon initiale Anzeichen der Erkrankung erkennbar werden (Coenen et al., 1988, Caye-Thomasen et al., 2002). Bei etwa 5-20% (Bork et al., 2008) der M. Crohn Patienten treten orale Manifestationen in Form von Aphten, Entzündungen der Schleimhaut und Lippenschwellungen (Cheilitis granulomatosa) auf (siehe Tabelle 4). Hervorzuheben ist hier die Assoziation der Cheilitis granulomatosa mit dem sog. „Melkersson-Rosenthal-Syndrom“. Das „Melkersson-Rosenthal-Syndrom“ ist eine chronische Erkrankung unklarer Ätiologie. Die klassischen Symptome dieses Leidens sind die Fazialisparese, die Lingua plicata und schmerzhafte Schwellungen der Gesichts- und Mundschleimhaut (Bork et al., 2008). Oft ist die Cheilitis granulomatosa das erste Anzeichen des oralen M. Crohn. Deshalb kann und muss der Zahnarzt in der Früherkennung dieser Erkrankung eine große Rolle spielen.

- Aphten
- Cheilitis granulomatosa („Melkersson-Rosenthal-Syndrom“)
- Pyostomatitis vegetans
- granulomatöse Stomatitis
- Fissuren der Unterlippe
- rezidivierende Mundschleimhautabszesse
- Cheilitis angularis

Tabelle 4: orale Manifestationen bei M. Crohn (nach: Bork et al., 2008)

Die häufigsten intraoralen Erscheinungsbilder (siehe Abbildungen 1 bis 6) bei M. Crohn sind schmerzhafte Schleimhautläsionen mit zentralen Ulzerationen, Lippenschwellungen und hyperplastischer Gingivitis (Harty et al., 2005) sowie aphtöse Läsionen, die sich meist nicht von rezidivierenden Aphten unterscheiden lassen. Weitere Studien belegen, dass Patienten,

die an M. Crohn leiden, häufiger an einer schweren Parodontitis (Erkrankung des Zahnhalteapparates) mit ausgeprägten Entzündungszeichen erkranken können (Lamster et al., 1977, Engel et al., 1988). Patienten mit einer oralen Manifestation der M. Crohn Erkrankung scheinen einen schwereren Krankheitsverlauf zu durchleben als Patienten ohne erkennbare Anzeichen in der Mundhöhle (Pittock et al., 2001, Ojha et al., 2007). Führt man bei den intraoral auftretenden Läsionen eine Probeexzision durch, so lassen sich in den meisten Fällen die typischen histologischen Merkmale eines M. Crohn wie Ulzerationen der Schleimhaut, nicht verkäsende Granulome mit Riesenzellen, Epitheloidgranulome, perilymphatische lymphocelluläre Infiltration und Lymphödeme der oberen Hautschichten nachweisen (Alawi, 2005). Das für den M. Crohn so typische Phänomen des „Pflastersteinreliefs“ lässt sich zeitweise auch intraoral in Form einer unregelmäßigen, weich-knotig imponierenden („cobblestone-like“) Verdickung der Wangenschleimhaut beobachten (Bork et al., 2008). Die Colitis ulcerosa kann ebenfalls von schmerzhaften Apften gekennzeichnet sein, das häufigere Begleitsymptom der Colitis ulcerosa ist jedoch die Pyostomatitis vegetans, eine Erkrankung der Mundschleimhaut mit einer Vielzahl von kleinen Abszessen, die erodieren können und Ulzera hinterlassen (Bork et al., 2008). Die Anwendung von lokal schmerzlindernden Spülungen wie Subcutin- und Bepanthen-Lösungen im Wechsel, sowie die Therapie mit Mesalazin, Kortikosteroiden, Immunsuppressiva und seit kurzem Anti-Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha Antikörpern kann in kürzester Zeit zu einem vollständigen Rückgang der Symptome führen (Huthöfer et al., 2006, Ruocco et al., 2007).



Abbildung 1 und 2: M. Crohn.

Leukoplakisch-erosive Veränderungen der Gingiva;
schmierig belegte, granulomatöse Ulzeration der rechten Zungenseite (aus: Bork, Burgdorf, Hoede, 2008)

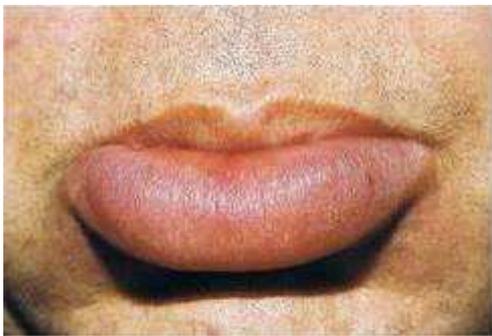


Abbildung 3 und 4: Melkersson-Rosenthal-Syndrom.

Cheilitis granulomatosa der Unterlippe;
Cheilitis granulomatosa. Schwellung beider Lippen (aus: Bork, Burgdorf, Hoede, 2008)

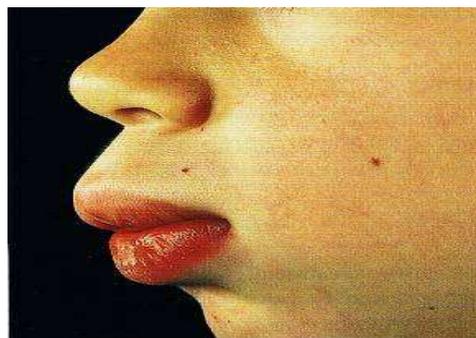
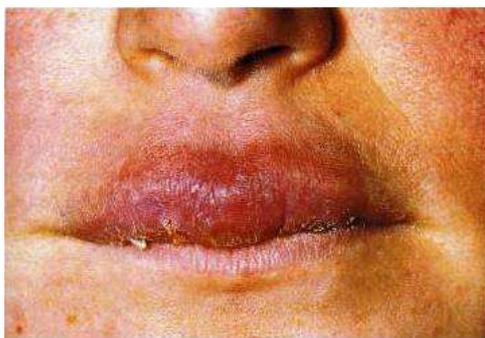


Abbildung 5 und 6: Cheilitis granulomatosa.

Ekzematisierte Form;

Cheilitis granulomatosa als Initialsymptom eines M. Crohn bei einem 10-jährigen Jungen. Ein Jahr später Entwicklung der Darmsymptomatik (aus: Bork, Burgdorf, Hoede, 2008)

1.1.5. Ätiologie und Pathogenese der CED

Die genaue Ätiologie und Pathogenese des M. Crohn ist noch unklar. Man geht jedoch davon aus, dass die Erkrankung im Wesentlichen auf dem Zusammenspiel dreier Hauptfaktoren basiert (siehe Abbildung 7): der genetischen Prädisposition und der intestinalen Mikroflora mit einer Dysregulation des Immunsystems als endogene Faktoren sowie dem Einfluss von Umweltfaktoren als exogene Komponente (Fiocchi, 1998, Shanahan, 2002, Podolsky, 2002).

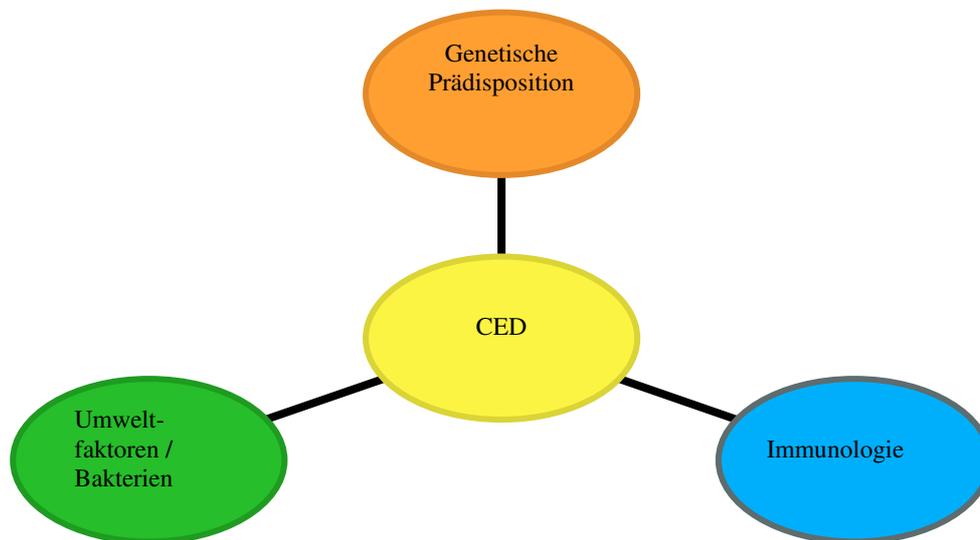


Abbildung 7: Vereinfachtes Modell zur multifaktoriellen Entstehung der CED.

Einer der entscheidenden Punkte der Pathogenese der CED liegt in der Immunologie der Darmmukosa. Bei der Abwehr von viralen, bakteriellen und parasitären Erregern spielt das darmassoziierte Immunsystem eine entscheidende Rolle (Durst et al., 1998). In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die intestinale Darmflora eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung einer Kolitis ist (Sellon et al., 1998). Physiologischerweise befindet sich die Darmmukosa hierbei in einer ständigen, aber kontrollierten Entzündung, wobei ein

Gleichgewicht zwischen entzündlichen und anti-entzündlichen Mechanismen aufrechterhalten wird (Shanahan, 2002). Die Unterscheidung der pathologischen Antigene von der physiologischen Darmflora ist dabei entscheidend. Ein immunologisches Fehlverhalten (immunpathogene Autoantikörper gegen organspezifische zelluläre Antigene) scheint zu einer lokalen Gewebeerstörung zu führen, bei der eine zellvermittelte Immunität mit einer erhöhten Produktion des Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α) mitursächlich ist (Ottiviani et al., 2003). Bei der Erkennung pathogener Keime spielen zwei Rezeptorengruppen eine Rolle: die Membran-gebundenen „toll-like receptors“ (TLR) und die zytosolischen NOD-Proteine („Nucleotid binding oligomerization domain“). Beide zusammen werden als „pattern recognition receptors“ (PRR) bezeichnet („Antigen erkennende Rezeptoren“). Die membrangebundenen TLRs besetzen mit Geburt eine Schlüsselposition in der Abwehr von pathogenen Antigenen. Sie sind auch entscheidend an der Aufrechterhaltung einer intakten epithelialen Barriere beteiligt (Cario, 2005). Interessanterweise wurde bei Patienten mit CED eine erhöhte Expression proentzündlicher TLRs (v. a. TLR4) festgestellt (Cario et al., 2000). Auch eine erhöhte Produktion der zytosolischen NOD-Proteine wurde mit einer gesteigerten Entzündungsantwort bei CED-Patienten in Verbindung gebracht (Cario, 2005). Mit Hilfe dieser Rezeptoren werden bakterielle Antigene auf Darmepithelzellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen den T-Lymphozyten präsentiert. Dies führt zu einer Proliferation und Differenzierung naiver T-Lymphozyten in proinflammatorische oder antiinflammatorische T-Zellen (Iwasaki et al., 2004) und zu einer Stimulation der Zytokinproduktion (siehe Abbildung 8). Bei CED-Patienten jedoch liegt nach derzeitigem Wissensstand eine Störung dieser Kaskade vor. Physiologische Antigene werden als pathogen erkannt, was zu einer erhöhten Proliferation der naiven T-Zellen zu

proinflammatorischen T-Helfer-Zellen vom Typ I (Th1) und zum Typ II (Th2) führt (Podolsky, 2002).

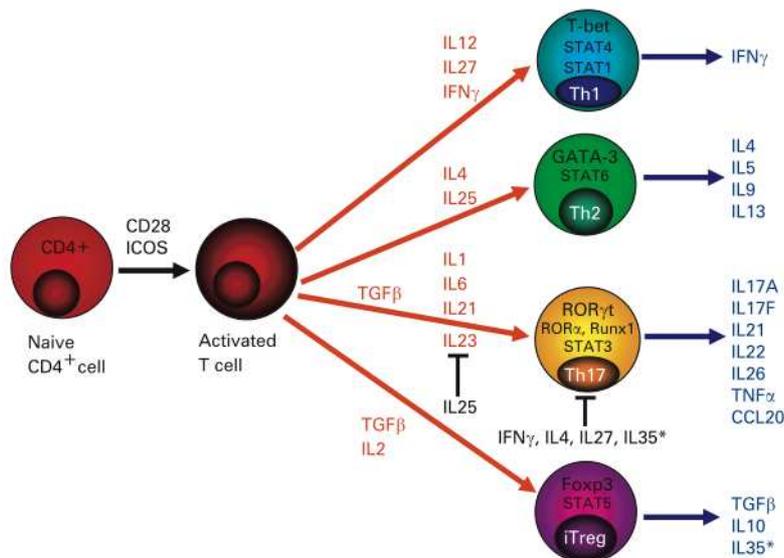


Abbildung 8: Darstellung der T-Zell-Differenzierung.

Thymozyten proliferieren in antiinflammatorische, regulatorische T-Zellen (iTreg) und proinflammatorische T-Helfer-Zellen (Th1, Th2 und Th17), die aus naiven CD4 positiven (CD4+) T-Zellen entstehen. Zytokine, welche die Entstehung von Th1-, Th2-, Th17- und iTreg-Zellen beeinflussen, sind rot markiert. Die wirkungsreichsten Zytokine dieser vier Zelllinien sind blau markiert. Zytokine, welche die Entwicklung der Th17-Zellen verhindern, sind schwarz markiert (nach: Brand, 2008).

Zudem scheint der vor wenigen Jahren neu entdeckte Typ 17 der T-Helfer-Zellen (Th17) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der CED sowie weiterer chronischer Autoimmunerkrankungen (z. B. der Multiplen Sklerose) zu spielen (Iwakura et al., 2006). Die durch IL-1 β , IL-6, TGF- β und IL-23 ausgelöste Differenzierung der naiven T-Zellen in Th17-Zellen unterscheidet sich von der Differenzierung in Th1 und Th2 (Steinman, 2007). Durch das Ungleichgewicht zwischen den T-Helfer-Zellen und regulatorischen, antiinflammatorischen Zellen kommt es zu einer unkontrollierten Immunantwort, die erneut die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren fördert, woraus eine chronische Entzündungsreaktion resultiert, die die Mukosa schädigt (siehe Abbildung 9).

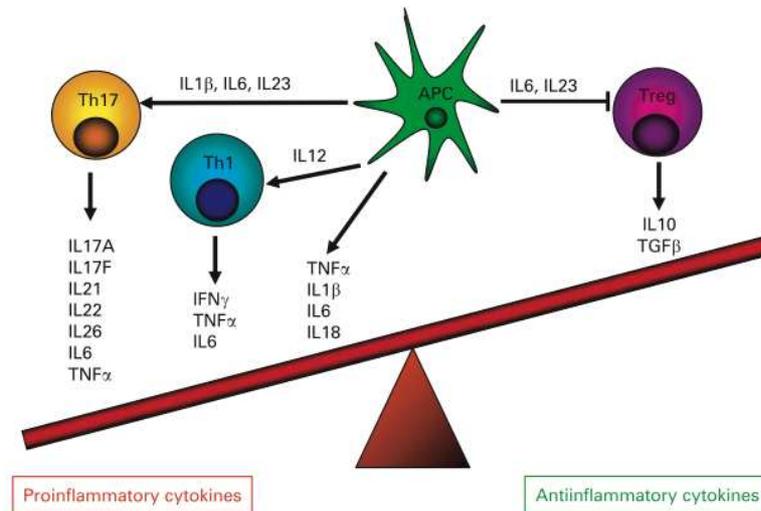


Abbildung 9: Das Ungleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei M. Crohn.

Bei Patienten mit M. Crohn überwiegen die proinflammatorischen T-Helfer (Th) 17 und Th1 Zytokine gegenüber den antiinflammatorischen Zytokinen, die von regulierenden T-Zellen (Treg) sezerniert werden. Von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) sezernierte Zytokine lösen nach dem Kontakt mit Bakterien entweder die Differenzierung in Th17 oder Th1 aus oder haben einen direkten proinflammatorischen Effekt (z. B. über die Sekretion von Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)). Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Interleukin (IL) 23 die regulative T-Zell Aktivität verhindert und intestinale Entzündung hervorruft (nach: Brand, 2008).

Der Rolle der Umweltfaktoren bei der Pathogenese von CED muss aus mehreren Gründen Beachtung geschenkt werden. Zum einen konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Nikotinkonsum (Rubin et al., 2000) sowie eine Störung der mikrobiellen Flora durch den weltweit vermehrt auftretenden „modernen“ westlichen Lebensstil mit verbesserten hygienischen Bedingungen (Hugot et al., 2003) zu einer erhöhten Anfälligkeit für CED führen kann. Hier gilt die Hypothese einer globalen Antigenexposition infolge hygienisch unzureichender Bedingungen als wichtige Trainingsfunktion des Immunsystems. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer frühen Appendektomie ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von M. Crohn zeigen (Kaplan et al., 2008), gleichzeitig aber die Inzidenz von Colitis ulcerosa bei einer frühen Appendektomie sinkt (Koutroubakis et al., 2002). Die Theorie, dass CED durch atypische mykobakterielle Infektionen (*Mycobacterium avium paratuberculosis*) und Virusinfektionen (z. B. Masernvirus) verursacht werden

könnten, konnte bisher nicht bestätigt werden (Loftus, 2004, Lakatos et al., 2007). Außerdem werden Zusammenhänge mit einer spezifischen Ernährung (Diät), oralen Kontrazeptiva, Stillen, nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten sowie der Psychosomatik mit emotionaler Belastung (Stress) als Auslöser der Krankheit vermutet (Loftus, 2004, Baumgart et al., 2007).

1.2. Genetische Grundlagen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Für die genetische Prädisposition sprechen ein familiär gehäuftes Auftreten von CED, ein vermehrtes Vorkommen bei monozygoten Zwillingen (Tysk et al., 1988, Orholm et al., 2000) sowie eine erhöhte Inzidenzrate in bestimmten Bevölkerungsgruppen (z.B. Ashkenazi-Juden) (Kurata et al., 1992).

In den letzten Jahren wurden sogenannte Suszeptibilitätsgene analysiert (Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001b), die entscheidend zu dem Verständnis der Pathogenese der CED beigetragen haben. Hierzu gehören Gene, die eine aktive Rolle in der Erkennung bakterieller Antigene und der Regulation des Immunsystems spielen, die an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind und die für die Integrität der epithelialen Barriere verantwortlich sind (Russel et al., 2004). Durch Überprüfung verschiedener Auffälligkeiten der DNA, die bei CED-Patienten gehäuft vorkamen, konnten bestimmte Genorte innerhalb eines Chromosoms ausfindig gemacht werden, die ursächlich für CED zu sein scheinen. Man bezeichnete diese auffälligen DNA-Loci als sogenannte „inflammatory bowel disease“ (IBD)-Suszeptibilitäts-Loci, nummeriert von IBD1-IBD9 (Newman et al., 2005b, Vermeire, 2005, Baumgart et al., 2007) (siehe Tabelle 5).

CED-Suszeptibilitäts-Region (IBD-Loci)	Region des Chromosoms	assoziierte Erkrankung	Literatur
IBD-1	16q12	M. Crohn	Hugot et al., 1996
IBD-2	12q14	Colitis ulcerosa	Satsangi et al., 1996
IBD-3	6p	CED	Hampe et al. 1999
IBD-4	14q11-12	M. Crohn	Ma et al., 1999
IBD-5	5q31-33	M. Crohn	Ma et al., 1999
IBD-6	19p13	CED	Rioux et al., 2000
IBD-7	1p36	CED	Cho et al., 1998
IBD-8	16q13	M. Crohn	Satsangi et al., 1996
IBD-9	3p26	CED	Satsangi et al., 1996

Tabelle 5: Lokalisation der neun Hauptloci, die mit CED assoziiert werden (nach: Baumgart et al., 2007)

Mehrere Studien konnten in den letzten Jahren bestätigen, dass der IBD1-Locus auf dem Chromosom 16 liegend eine erhöhte Prädisposition für einen M. Crohn hervorrufen kann (Hugot et al., 1996, Ohmen et al., 1996, Curran et al., 1998, Cho et al., 1998). Diese Region wurde genauer untersucht und im Vergleich mit der DNA-Sequenz künstlich veränderter Chromosomen von Bakterien konnte das *NOD2/CARD15*-Gen identifiziert werden.

1.2.1. Das *NOD2/CARD15*-Gen in der Pathogenese des M. Crohn

Die Erstbeschreibung des *NOD2/CARD15*-Gens als Crohn-assoziiertes Suszeptibilitäts-gen erfolgte 2001 durch die zwei Arbeitsgruppen um Hugot und Ogura (Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001). Man bezeichnete das Gen zunächst als „nucleotid binding oligomerization domain“ (NOD) 2-Gen und benannte es später in „caspase activating recruitment domain“ (CARD) 15 um. Die derzeitige Nomenklatur spricht daher vom *NOD2/CARD15*-Gen. Das

von *NOD2/CARD15* kodierte NOD2- Protein besteht aus 1040 Aminosäuren und verfügt über zwei N-terminale CARD-Domänen. Zentral liegt die NOD-Domäne und C-terminal die LRR-Region, die sich aus 10 leucin-reichen Wiederholungen zusammensetzt (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: Struktur des *NOD2/CARD15*-Proteins.

CARD: caspase-activating and recruitment domain; NOD: nucleotid-binding oligomerization Domain; LRRs: Leucin rich repeats (Graphik: A. Mayregg).

Das NOD2-Protein ist ein cytosolisches Protein, das von Monozyten und Zellen des Immunsystems exprimiert wird und strukturelle Ähnlichkeit mit Proteinen, die die Apoptose regulieren, wie z. B. Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1), CED 4 (cell-death-4) sowie mit Resistenzgenen auf Pflanzen (Inohara et al., 1999) aufweist. Drei Hauptmutationen in diesem 12 Exon umfassenden Gen konnten mit einem M. Crohn in Verbindung gebracht werden (c.2104C>T (p.R702W) in Exon 4, c.2722G>C (p.G908R) in Exon 8 und c.3020insC (p.1007fs) in Exon 11) (Hugot et al., 2001). Zudem konnten von unserer Arbeitsgruppe mehrere neue CED-assoziierte *NOD2/CARD15*-Varianten identifiziert werden (siehe Abbildung 11). Die Mutationen führen zu einer veränderten Ausprägung des Proteins. Eine defekte Erkennung bakterieller Bestandteile sowie eine vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine sind die Folge (Baumgart et al., 2007). Ist nur ein Allel von einer Mutation betroffen (heterozygote Ausprägung), so kann das Risiko an M. Crohn zu erkranken um ein dreifaches ansteigen (Podolsky, 2002). Sollte eine Mutation sogar beide

Allele betreffen, der Patient also ein homozygoter Träger sein, so steigt das Risiko bis um das 30-40 fache an (Podolsky, 2002).

Phänotypisch konnte gezeigt werden, dass Varianten im *NOD2/CARD15*-Gen mit einem früheren Krankheitsbeginn sowie stärker ausgeprägten Komplikationen wie Stenosen oder Fisteln verbunden sind (Hampe et al., 2001b, Akolkar et al., 2001b, Lesage et al., 2002, Cuthbert et al., 2002, Ahmad et al., 2002, Newman et al., 2004, Seiderer et al. 2006). Besonders Patienten, die für die Insertionsmutation p.1007fs homozygot sind, konnten als Hochrisikopatienten für M. Crohn eingestuft werden (Seiderer et al., 2006). Diese Patienten zeigten signifikant häufiger einen sehr frühen Krankheitsbeginn sowie einen stenosierenden Krankheitsverlauf mit wiederholten Operationen und die Ausbildung entero-enteralen Fisteln (Seiderer et al., 2006).

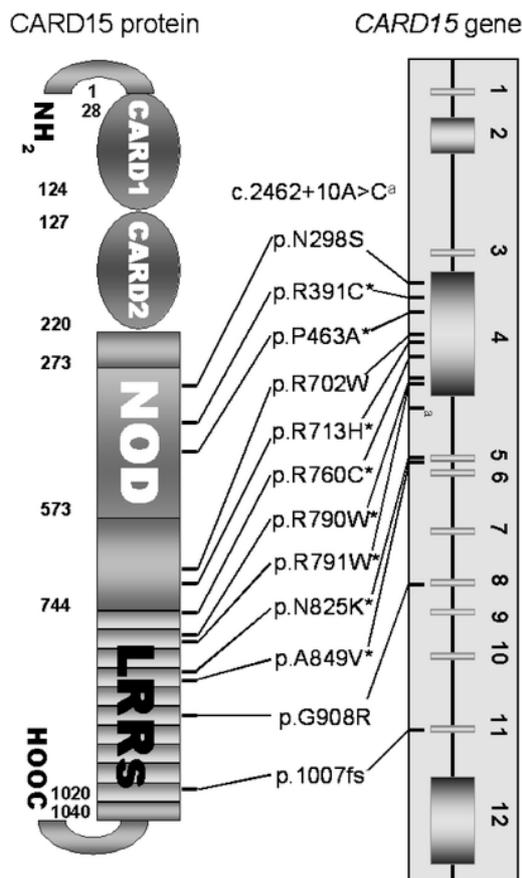


Abbildung 11: Darstellung der acht neuen Aminosäuresubstitutionen auf dem *CARD15* Gen.

Hierbei konnten die Varianten

c.1171C>T	(p.R391C),
c.1387C>G	(p.P463A),
c.2138G>A	(p.R713H),
c.2278C>T	(p.R760C),
c.2368C>T	(p.R790W),
c.2371C>T	(p.R791W),
c.2475C>G	(p.N825K),
c.2546C>T	(p.A849V)

als neue, Crohn-assoziierte Varianten des *CARD15* Gens identifiziert werden (nach: Schnitzler et al., 2006).

1.2.2. Weitere Suszeptibilitätsgene bei CED

Seit der Erstbeschreibung des *NOD2/CARD15*-Gens konnten durch die Identifikation weiterer Suszeptibilitätsgene neue Erkenntnisse hinsichtlich der zugrunde liegenden pathogenetischen Prozesse bei CED gewonnen werden. So wurden insbesondere bei M. Crohn Genvarianten identifiziert, die in Bezug auf die Erkennung und Prozessierung bakterieller Strukturen eine große Rolle spielen oder wichtig für den Prozess der Autophagozytose sind. Gleichzeitig scheinen auch Genvarianten, die an der Regulation der proinflammatorischen Immunantwort durch Interleukin-23 und Interleukin-17 beteiligt sind, von Bedeutung bei der intestinalen Entzündung bei CED zu sein (Duerr et al., 2006, Mathew et al., 2007) (siehe Abbildung 12).

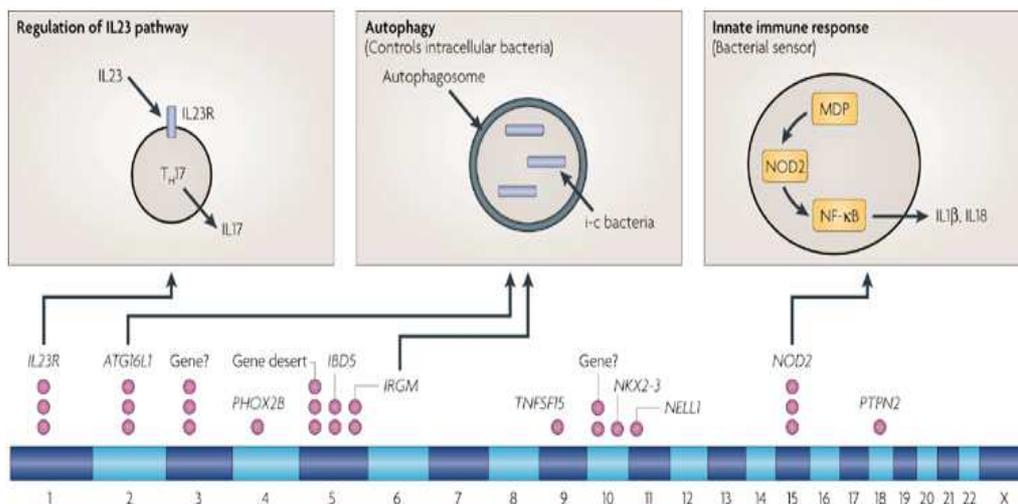


Abbildung 12: Aktuelle Übersicht über Suszeptibilitätsgene und funktionelle Mechanismen in der Pathogenese des M. Crohn. Das Diagramm zeigt die chromosomale Lokalisation der derzeit bekannten und durch aktuelle Genom-weite Studien identifizierten Genvarianten bei Patienten mit M. Crohn. Basierend auf der Identifikation dieser Gene ergeben sich neue Einblicke in die pathogenetischen Grundlagen, die sich—wie in dieser Graphik gezeigt—in die Bereiche *Innate Immune response* (Erkennung bakterieller Antigene durch das angeborene Immunsystem), *Autophagie* (Kontrolle intrazellulärer Bakterien) und *proinflammatorische Immunreaktion durch Aktivierung des IL-23/IL-17-Systems* unterteilen lassen. Die Anzahl der violetten Punkte gibt die bislang bekannte Assoziationsstärke des identifizierten Genlokus an; die maximale Assoziationsstärke (Genlokus wurde durch unabhängige Arbeitsgruppen repliziert) ist durch drei Punkte wiedergegeben. *ATG16L1*, *ATG16 autophagy-related 16-like 1*; *IBD5*, *inflammatory bowel disease 5*; *IL23R*, *interleukin 23 receptor*; *IRGM*, *immunity-related GTPase family M*; *NELL1*, *NEL-like 1*; *NKX2-3*, *NK2 transcription factor related locus 3*; *NOD2*, *nucleotide-binding oligomerization-domain-containing 2*; *PHOX2B*, *paired-like homeobox 2B*; *PTPN2*, *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2*; *TNFSF15*, *tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 15* (Abbildung aus: Mathew CG. New links to the pathogenesis of Crohn's disease provided by genome-wide association scans. *Nature Review Genetics* 2007).

Insbesondere durch die Entdeckung der *IRGM*- und *ATG16L1*-Gene und deren Rolle bei der Autophagie konnte ein neuer Ansatz in der Ätiologie des M. Crohn im angeborenen Immunsystem gestellt werden (Hampe et al., 2007). Das *IRGM* („Immunity-related GTPase family, M“-Gen, das sich auf dem Chromosom 5q33.1 befindet, kodiert für ein Protein, das eine wichtige Rolle bei der Autophagie spielt, einem Prozess, bei dem körpereigene Zellbestandteile, aber auch fremde Viren und Bakterien umhüllt und zerstört werden. SNPs (SNP; „single nucleotid polymorphism“) im *IRGM*-Gen sind mit einem erhöhten Risiko für M. Crohn assoziiert (Massey et al., 2007, Parkes et al., 2007). Das *ATG16L1* („ATG 16 autophagy related 16-like 1“-Gen ist auf dem Chromosom 2q37.1 lokalisiert, und das von diesem Gen kodierte Protein ist ebenfalls entscheidend für den Prozess der Autophagie. Mutationen dieses Gens konnten eine erhöhte Assoziation zu M. Crohn nachgewiesen werden (Cummings et al., 2007, Prescott et al., 2007). Vor allem die Mutation des einzelnen Nukleotids rs2241880 (T300A) scheint bei westlichen, europäischen Bevölkerungen eine große Rolle zu spielen (Prescott et al., 2007, Roberts et al., 2007, Glas et al., 2008, Zhang et al., 2008). Eine Epistasis mit anderen Suszeptibilitätsgenen des M. Crohn (*NOD2/CARD15*, *IL23R*) konnte nicht nachgewiesen werden (Glas et al., 2008). Im Jahr 2006 wurde die IL23/Th17-Achse zum ersten Mal mit der Pathogenese des M. Crohn in Verbindung gebracht (Duerr et al., 2006). Das Interleukin 23-Rezeptor (*IL23R*)-Gen sitzt auf dem Chromosom 1p31 und kodiert für das Protein des IL23-Rezeptors. Dieses Protein ist in der Zellmembran verschiedener Zellen des Immunsystems (Monozyten, Killerzellen, T-Zellen) verankert und interagiert mit dem Protein Interleukin-23. Zusammen nehmen sie eine wichtige Rolle in der Entzündungsantwort ein (Zhang et al., 2008). Genetische Varianten des *IL23R*-Gens erhöhen die Wahrscheinlichkeit, an M. Crohn zu erkranken (Duerr et al., 2006, Glas et al., 2007, Newman et al., 2009). Der *IL23R* rs1004819-Polymorphismus zeigt dabei die höchste

Assoziation zu M. Crohn; im Gegensatz dazu scheint der p.Arg381Gln- Polymorphismus eine protektive Wirkung auf M. Crohn und sogar Colitis ulcerosa auszuüben (Glas et al., 2007). Vor kurzem konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine Epistasie zwischen den Suszeptibilitätsgenen *NOD2/CARD15* und *IL23R* mit Genvarianten im Toll-like Rezeptor 9-Gen besteht (Török et al., 2009), was die Suszeptibilität für M. Crohn verändern kann.

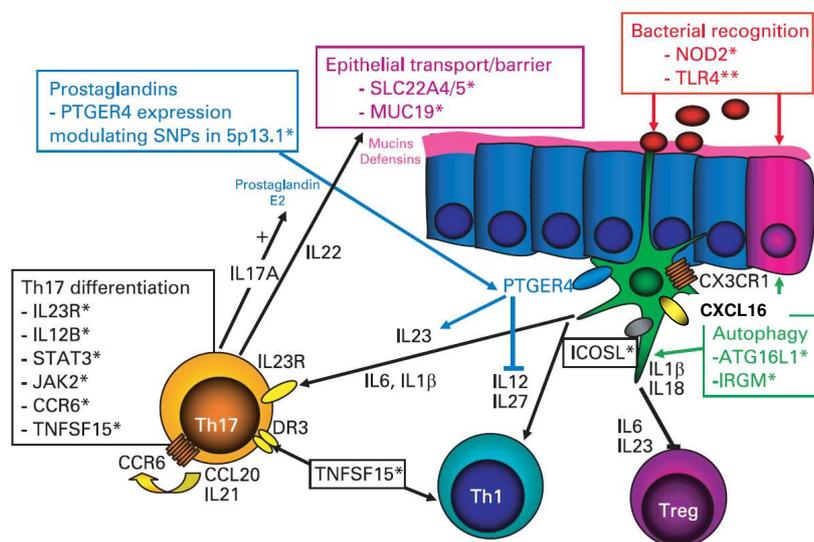


Abbildung 13: Die Hauptgruppen der M. Crohn-Suszeptibilitätsgene und ihre Auswirkung auf die Th17-Zell-Entwicklung. Die Abbildung gibt einen Überblick inwieweit sich die wichtigsten M. Crohn-Suszeptibilitätsgene an der Entwicklung der Th17-Zellen beteiligen. Die Erkennung bakterieller Bestandteile durch APCs hängt von Rezeptoren wie NOD2 und TLR4 ab. Bakterielle Bestandteile werden von APCs phagozytiert; ein Prozess, der besonders im terminalen Ileum auch von der Expression des Chemokin-Rezeptors CX3CR1 abhängig ist, der wiederum mit dem auf Epithelzellen exprimierten Fraktalkine kommuniziert. Die Phagozytose der Bakterien ist abhängig von den Autophagie-Genen *ATG16L1* und *IRGM*. *ATG16L1* kann ebenso die Interleukin (IL)1 β - und IL-18-Sekretion in APCs beeinflussen. Aktivierte APCs sezernieren IL-23, IL-6 und IL-1 β , welche die Treg-Entstehung verhindern, dennoch aber entscheidend für die Th17-Zell-Entwicklung sind. IL12 hingegen, das ebenso von Antigen-stimulierten APCs sezerniert wird, verstärkt die Entstehung der Th1-Zellen positiv. Th17-Zellen produzieren Zytokine wie IL-17A und IL-22, die auf der intestinalen Barriere agieren und die Freisetzung von Defensinen, Muzinen und Prostaglandinen stimulieren. IL-22 moduliert auch die intestinale Barrierefunktion. Die Defensin-Sekretion aus Paneth-Zellen wird zusätzlich durch M. Crohn-assoziierte *NOD2*- und *ATG16L1*-Mutationen moduliert. Auf der anderen Seite wurde β -Defensin 2 nachgewiesen, ein Ligand für TLR4 und CCR6 zu sein. Prostaglandin E2 bindet an seinen Rezeptor *PTGER4* und zusammen mit bakteriellen Produkten fördert es die Freisetzung von IL-23 aus dendritischen Zellen. Durch *PTGER4*-modulierte Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) sind ebenfalls mit M. Crohn assoziiert. *PTGER4* ist notwendig für die Reifung und Migration bestimmter APC-Subpopulationen. SNPs in oder in der Nähe der Gene *MUC19* und *ICOSL* werden ebenfalls mit einer Suszeptibilität für M. Crohn assoziiert. Außerdem kodiert das M. Crohn-Suszeptibilitätsgen *TNFSF15* für TL1A, das ein Tumor-Nekrose-Faktor ähnliches Molekül ist (exprimiert von intraepithelialen Lymphozyten), an DR3 bindet und eine starke Co-Stimulation der Th1- und Th17-Zellen hervorruft. Die Gene mit einem Stern wurden in der Meta-Analyse von Barrett et al. bestätigt. Das *TLR4*-Gen (das Gen mit zwei Sternen) wurde in einer großen Meta-Analyse als Suszeptibilitätsgen für M. Crohn nachgewiesen (De Jager et al., 2007). APCs, antigen presenting cell; DR3, death receptor 3; ICOSL, ligand for inducible co-stimulating molecule; *PTGER4*, prostaglandin receptor EP4; Th, T helper cell; TL1A; TNF-like molecule 1A; TNFRSF 25, TNF receptor superfamily 25; Treg, regulatory T cell (nach: Brand, 2008).

1.2.3. Genetische Faktoren in der Pathogenese der Parodontitis und der oralen Manifestation des M. Crohn

Die Parodontitis (chronisch entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates) weist einige klinische Gemeinsamkeiten mit M. Crohn auf. Dazu zählen der schubweise Verlauf, Bakterien bzw. abnorme Immunreaktion auf Bakterien als ätiologischer Faktor, ähnliche Mechanismen in der Entzündungsantwort sowie Risikofaktoren wie Rauchen oder Stress (Brandzaeg, 2001). Da das *NOD2/CARD15*-Gen an der intrazellulären Erkennung von Bakterien beteiligt ist und die Entzündungsantwort stark beeinflusst, wurde untersucht, ob die *NOD2/CARD15*-Mutationen (v. a. die 3020insC Mutation), die für M. Crohn einen schwereren Krankheitsverlauf bedingen, auch in der Parodontitis eine Rolle spielen könnten. Die dazu durchgeführten Studien belegen jedoch eine nahezu gleichmäßig verteilte Frequenz der Mutationen bei Patienten mit Parodontitis und bei den Kontrollgruppen (Folwaczny et al., 2004), so dass die Pathophysiologie der Parodontitis durch eine Mutation des *NOD2/CARD15*-Gens wohl nicht beeinflusst wird (Laine et al., 2004, Noack et al., 2006). Da bei Patienten mit CED auch ein unterschiedliches Ausprägungsmuster bei den sog. Toll-like Rezeptoren festgestellt werden konnte (Cario et al., 2000) und hier eine weitere genetische Prädisposition für die Erkrankung gesehen wird, wurden hierzu ebenfalls Studien in Bezug auf die Parodontitis durchgeführt. Die meisten TLRs (v. a. TLR2, TLR4, TLR9) werden mit einer signifikant erhöhten Menge im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe exprimiert, was eine Beteiligung in der Pathogenese der Parodontitis nahelegt (Kajita et al., 2007, Beklen et al., 2008). Neuere Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang der Differenzierung der naiven T-Zellen (v. a. durch das Interleukin 23) in die kürzlich entdeckte Th17-Zelle mit der Pathogenese des M. Crohn. Auch bei der Parodontitis konnte nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von Th17-Zellen bzw. die durch IL-23 induzierte Th17-Entzündungskaskade

entscheidend für den Krankheitsverlauf sein können (Cardoso et al., 2009, Ohyama et al., 2009). Zudem wurde Interleukin-18, ein proinflammatorisches Zytokin, ebenfalls in Verbindung gebracht, zusammen mit *NOD2/CARD15*-Varianten und einem Polymorphismus seines *IL18*-Gens, einen spezifischen Krankheitsverlauf bei M. Crohn hervorzurufen (Glas et al., 2005). Eine Untersuchung, ob ein Polymorphismus des *IL18*-Gens auch bei Parodontitis eine Rolle spielt, zeigte jedoch, dass auch hier keine Assoziation gestellt werden kann (Folwaczny et al., 2005). Weitere interessante Erkenntnisse über gemeinsame Suszeptibilitätsgene werden sicherlich auch hier noch die genomweiten Studien liefern, wie sie schon für die Parodontitis allein (*GLT6D1*-Gen) durchgeführt wurden (Schaefer et al., 2009).

1.3. Chemokine – Zytokine mit chemotaktischer Funktion

1.3.1. Immunologische Funktion der Chemokine

Chemokine sind kleine, chemotaktisch wirkende Zytokine („chemoattractant cytokines“), die die Migration der Leukozyten zu Orten der Entzündung, Infektion oder Verletzung koordinieren (Charo et al., 2006). Das bedeutet, dass sie Leukozyten anlocken und aktivieren können, indem sie selektiv auf deren Rezeptoren einwirken und aus diesem Grund eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Entzündungsprozessen spielen (Baggiolini, 1998). Chemokine sind, ausgehend von ihrer Struktur, relativ kleine Proteine, die aus ca. 75-125 Aminosäuren bestehen. Basierend auf strukturellen Unterschieden im Motiv, dargestellt durch die erhaltenen Reste des Cysteins, die man in der N-terminalen Region aller Chemokine findet, können die annähernd 50 bekannten menschlichen Chemokine zur Zeit in vier Untergruppen

unterteilt werden: C, CC, CXC oder CX₃C (Bacon et al., 2002, Murphy, 2002) (siehe Abbildung 14).

Da Chemokine die Bewegung von mononuklearen Zellen durch den Körper dirigieren können, sind sie ein wichtiger Bestandteil der erworbenen Immunreaktion, sowie der Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten (z.B. chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Asthma oder Multipler Sklerose) (Charo et al., 2006). Sie wirken aber nicht nur in der Wundheilung und bei intestinalen Verletzungen (Dwinell, 1999, Brand et al., 2002, Brand et al., 2003, Brand et al., 2005), sondern auch in der Entzündungsantwort der gastrointestinalen Mukosa (Papadakis, 2004). Chemokine werden vor allem im Thymus, im sekundären Lymphgewebe und in epithelialen Zellen (wie z.B. intestinalen Epithelzellen) gebildet. Da das intestinale Epithel die wichtigste Barriere zwischen den Bakterien und Antigenen des Darmlumens und den Immunzellen der Lamina propria darstellt, sind die intestinalen Epithelzellen ständig der Mikroflora des Darms ausgesetzt. Aus diesem Grund produzieren sie im Rahmen dieser Antigen-Epithelzell-Interaktion eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen (Brand et al., 2005). Die Einwanderung der Chemokine in das Entzündungsgebiet erfolgt durch Chemotaxis. Die Chemokine können aber auch direkt in die Adhäsionsvorgänge am Endothel eingreifen und somit die transendotheliale Migration der Leukozyten fördern (Haptotaxis) (Nattermann 2008).

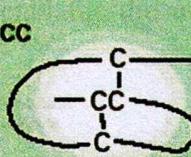
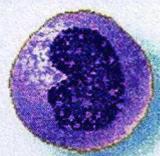
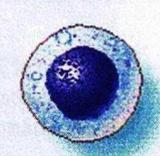
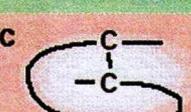
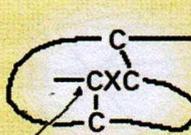
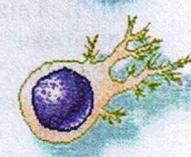
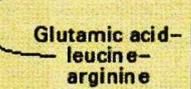
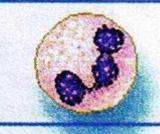
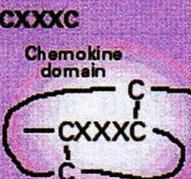
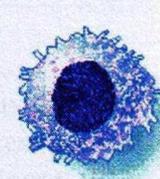
Chemokine	Receptor	Cell Type
 <p>MCP-3, -4; MIP-1α; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES</p>	 <p>CCR1 CCR3</p>	Eosinophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 
MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 
Fractalkine	CX ₃ CR1	
SDF-1	CXCR4	
MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 β (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX ₃ CR1	
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
 <p>PARC, DC-CK1 Lymphotactin</p>	? ?	Resting T cell 
SDF-1	CXCR4	
 <p>MCP-3, -4; MIP-1α; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1α, MIP-1β, RANTES MIP-3α (LARC, Exodus-1) MDC, TECK</p>	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 
SDF-1	CXCR4	
 <p>Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO-α, -β, -γ; ENA-78; NAP-2; LIX</p>	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	CCR2 CCR5	
 <p>Chemokine domain Mucin-like domain Cytoplasmic domain</p> <p>Fractalkine</p>	CX ₃ CR1	Natural killer cell 
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Abbildung 14: Chemokine und korrespondierende Chemokinrezeptoren.

Chemokine und korrespondierende Chemokinrezeptoren einschließlich deren Targetzellen mit Darstellung der konservierten Cysteinstrukturen der vier verschiedenen Chemokin-Unterfamilien (nach: Luster AD et al., 1998).

1.3.2. Die Chemokine CXCL16 und CX3CL1 (Fraktalkine)

Während die Mehrheit der Chemokine als lösliche Moleküle sezerniert wird, sind die beiden Chemokine CXCL16 und CX3CL1/Fraktalkine (Neurotaksin) die einzigen Chemokine mit transmembranen Domänen (Bazan et al., 1997). Diese beiden einzigartigen Chemokine besitzen einen intrazellulären und einen Muzin-ähnlichen Stiel, der die N-terminale Domäne des Chemokins auf der Zelloberfläche repräsentiert. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Genvarianten des *CX3CL1*-Gens (Fraktalkine) mit einem schwereren Krankheitsverlauf für M. Crohn korrelieren (Brand et al., 2006). CXCL16 ist überwiegend auf Antigen-repräsentierenden Zellen zu finden, wo es als Ligand für den CXC Chemokin-Rezeptor 6 (CXCR6/Bonzo) Interaktionen zwischen Antigen-repräsentierenden Zellen und T-Lymphozyten vermittelt (Hara et al., 2006). CXCL16 bewirkt eine Chemotaxis von CXCR6+ Lymphozyten (wie z. B. Th1-polarisierte aktivierte CD4+ und CD8+T-Zellen und natürliche Killerzellen) an den Ort der Entzündung (Tabata et al., 2005). Die membrangebundene Form des CXCL16 ist identisch zum Scavenger-Rezeptor SR-PSOX, der bei der Aufnahme von oxidierten Low-Density-Lipoproteinen und Phosphatidylserinen eine Rolle spielt und dessen Mitwirken bei Arteriosklerose und koronarer Herzerkrankung bewiesen wurde (Minami et al., 2001). Interessanterweise zeigen Studien, dass auch Genvarianten von *CXCL16* mit koronarer Herzerkrankung assoziiert werden können (Lundberg et al., 2005). CXCL16 wird außerdem eine Schlüsselrolle bei entzündlichen Erkrankungen wie Sarkoidose (Agostini et al., 2005), Autoimmunenzephalomyelitis (Fukumoto et al., 2004), Hepatitis (Heydtmann et al., 2005) und rheumatoider Arthritis (Nanki et al., 2005) zugeschrieben, indem es die T-Lymphozyten-Infiltration reguliert. Ebenso vermittelt CXCL16 die Adhäsion und Phagozytose von gram-negativen und gram-positiven Bakterien, was durch eine signifikante Verhinderung der bakteriellen Phagozytose nach Unterdrückung der chemotaktischen Aktivität von CXCL16

durch Antibiose bewiesen werden konnte. Die zentrale Rolle von CXCL16 für T-Zell-vermittelte Erkrankungen wird weiter durch Erkenntnisse der Studie von Xu et al. bestätigt, die im Modell der hepatischen Entzündung zeigen konnte, dass ein gegen CXCL16 gerichteter monoklonaler Antikörper die Zahl der T-Lymphozyten, welche die Leber infiltrierten, deutlich verringerte und protektiv auf das Leben der Mäuse wirkte (Xu et al., 2005).

1.3.3. Chemokine in der Pathogenese der CED

Chemokine und deren Rezeptoren spielen bei der Pathogenese der CED eine entscheidende Rolle, da durch sie wichtige immunologische Vorgänge wie die Chemoattraktion von Leukozyten reguliert werden. In Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass es bei Patienten mit CED zu einer vermehrten Bildung unterschiedlichster Chemokin-Rezeptoren kommt (Papadakis et al., 2000). Besonders das Chemokin IL-8, das durch die Bindung mit seinen Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 aktiviert wird, konnte bei beiden Formen der CED in einer erhöhten Menge nachgewiesen werden (Daig et al., 1996, Keshavarzian et al., 1999), wobei der Serum-Spiegel mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Mazzucchelli et al., 1994). Folgende Tabelle 6 zeigt weitere Chemokine, die bei CED-Patienten erhöht exprimiert wurden:

Chemokin	normale Mukosa	Expression bei CED	Chemokin-Rezeptor
IL-8	+	+++	CXCR1,2
Eotaxin	+	+++	CCR3
ENA 78	-/+	++	CXCR2
MCP-1	+	++	CCR2
MCP-3	+	++	CCR1,2,3
RANTES	+	++	CCR1,3,5
MIP-1 α	-	++	CCR1,5
MIP-3 β	-	++	CCR5
IP-10	+	++	CXCR3
Fraktalkine	+	++	CX3CR1
TECK	+	++	CCR9
MEC	+	+	CCR10
CCL20	+	++	CCR6
SDF-1	+	?	CXCR4

Tabelle 6: Chemokin-Expression in normaler und entzündeter intestinaler Mukosa (nach: Papadakis et al., 2000).

Die folgende Abbildung 15 zeigt noch einmal die wichtigsten Chemokine mit alter und neuer

Nomenklatur:

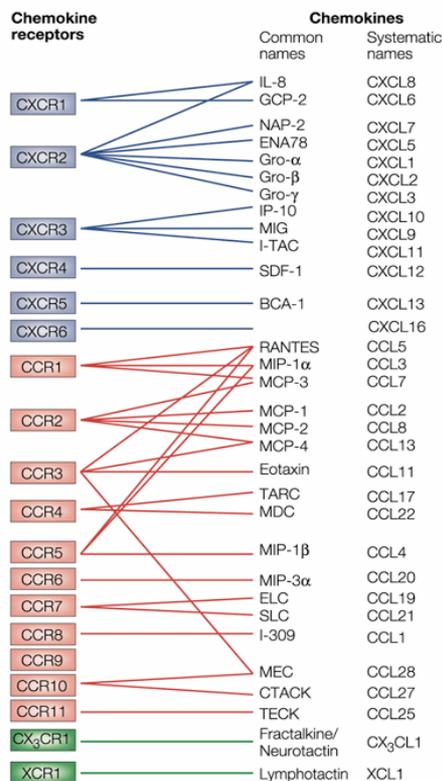


Abbildung 15: Übersicht über die verschiedenen Chemokin-Rezeptoren und deren Liganden mit „historischer“ Bezeichnung („common names“) und systematischem Namen („systematic names“).

Bedeutung der Abkürzungen für „common names“:

BCA-1, B-cell-attracting chemokine 1; CTACK, cutaneous T-cell-attracting chemokine; ELC, Epstein-Barr-virus-induced gene 1 ligand chemokine; ENA78, epithelial-cell-derived neutrophil-activating peptide 78; GCP-2, granulocyte chemotactic protein 2; Gro, growth-regulated oncogene; IL-8, interleukin 8; IP-10, interferon-inducible protein 10; I-TAC, interferon-inducible T-cell chemoattractant; MCP, monocyte chemoattractant protein; MDC, macrophage-derived chemokine; MEC, mucosae-associated epithelial chemokine; MIG, monokine induced by interferon; MIP, macrophage inflammatory protein; NAP-2, neutrophil-activating peptide 2; RANTES, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; SDF-1, stromal-cell-derived factor 1; SLC, secondary lymphoid-tissue chemokine; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; TECK, thymus-expressed chemokine.

(Originalabbildung aus *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 106-115).

Für die Chemokine MIP-1 α , MIP-3 β und RANTES, die an den Rezeptor CCR5 binden, konnte eine Funktion in der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses bei CED nachgewiesen werden (Mac Dermott et al., 1999, Papadakis et al., 2004). IP-10 bewirkt über seine Bindung mit CXCR3 eine Chemotaxis auf Lymphozyten. Es kann auch in gesunder Schleimhaut gefunden werden, jedoch ist seine Expression während einer Entzündung erhöht (Papadakis et al., 2000). Durch seine Bindung mit dem Rezeptor CCR2 kann das Chemokin MCP-1 die Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen, Monozyten und T-Zellen sowie die Freisetzung von IL-10 beeinflussen (Papadakis et al., 2000). Auch für die Chemokine CXCL12/SDF-1 („stromal cell-derived factor-1“) und CCL20/MIP-3 α („Macrophage inflammatory protein-3“) mit ihren Rezeptoren CXCR4 und CCR6 konnte eine verstärkte Chemoattraktion von Abwehrzellen nachgewiesen werden (Agace et al., 2000, Izadpanah et al., 2001). Durch die erhöhte Expression des CX3CR1-Liganden Fraktalkine im entzündeten Darmgewebe werden T-Zellen und Monozyten rekrutiert und eine starke Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen gefördert (Muehlhoefer et al., 2000, Brand et al., 2006). Aufgrund dieser Untersuchungen geht man davon aus, dass den Chemokinen und ihren Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der mukosalen Entzündung, wie sie bei CED zu finden ist, zuzuordnen ist. Neueste Studien zeigen, dass die aus kolorektalen Karzinomen gewonnenen Zellen die mRNA von CXCL16 und dem korrespondierenden Rezeptor CXCR6 aufweisen. Diese Erkenntnis und die Tatsache, dass die CXCL16-mRNA und der CXCL16-Spiegel bei intestinalen Entzündungen *in vitro* und bei Patienten mit M. Crohn erhöht sind (siehe Abbildung 16), suggerieren eine bedeutende Funktion dieses Chemokins (Diegelmann et al., 2010).

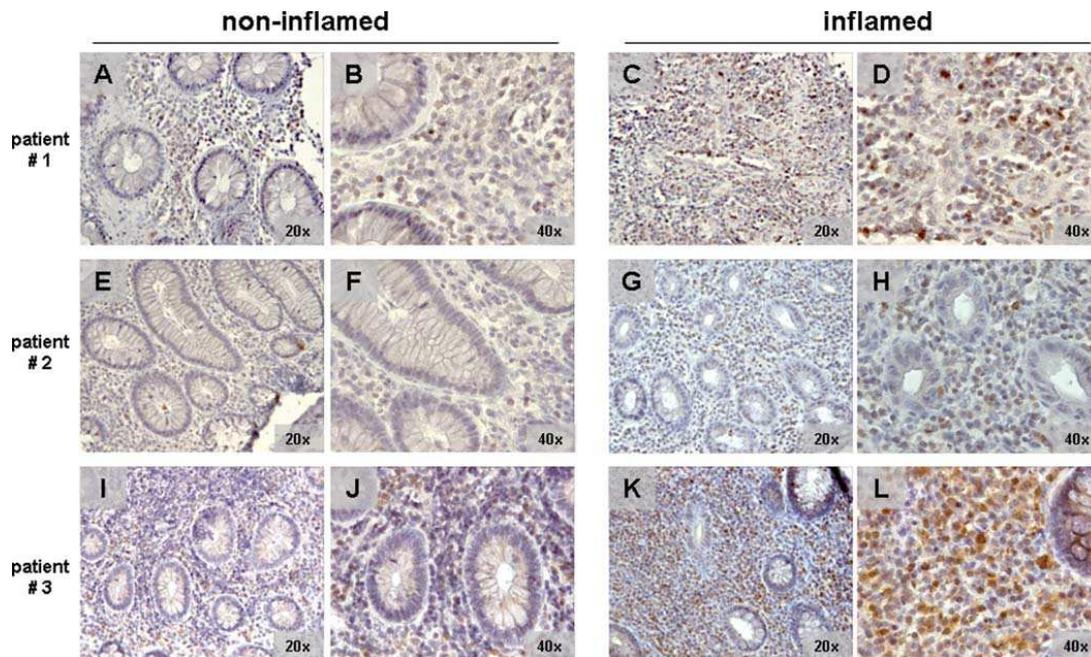


Abbildung 16: Die Expression von CXCL16 ist bei Patienten mit M. Crohn erhöht.

Die immunhistochemische Analyse der Biopsien dreier Patienten mit M. Crohn (A-D, Patient 1; E-H, Patient 2; I-L, Patient 3) zeigte eine erhöhte mukosale Infiltration mit CXCL16-exprimierten Immunzellen im entzündeten Gewebe (C/D, G/H, K/L) verglichen mit entzündungsfreiem Gewebe (A/B, E/F, I/J) (nach: Diegelmann et al., 2010).

Die exakte Rolle von CXCL16 in der Pathogenese der CED ist jedoch bisher unklar und daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4. Ziele der Arbeit

Ausgehend von der bisherigen Datenlage scheinen Chemokine eine wichtige Rolle in der Aufnahme verschiedener Pathogene sowie der Chemotaxis von T-Zellen und natürlichen Killerzellen zu spielen. Im Gegensatz zu dem CX3CR1-Liganden Fraktalkine, für den wichtige Schlüsselfunktionen in der intestinalen Entzündung nachgewiesen wurden (Muehlhofer et al., 2000, Brand et al., 2006), ist die Rolle des Chemokins CXCL16 für die Pathogenese der CED bislang unklar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten könnte CXCL16 jedoch ein potentielles Schlüssel-Chemokin in der Entstehung von T-Zell-

vermittelten intestinalen Entzündungen sein. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der CXCL16-Rezeptor CXCR6 auf intestinalen epithelialen Zellen angeordnet ist und Patienten mit M. Crohn vermehrt CXCL16-mRNA exprimieren. Basierend auf einer im Jahr 2005 publizierten Arbeit, die eine Assoziation der C->T Mutation auf dem Codon 181 des Exons 4 des *CXCL16*-Gens mit der Inzidenz von koronaren Stenosen zeigen konnte (Lundberg et al., 2005), soll in der vorliegenden Arbeit *CXCL16* erstmals als Suszeptibilitätsgen bei CED untersucht werden.

Hierbei werden folgende Fragestellungen untersucht:

- Durch Genotypisierung von 574 Individuen mit CED sowie Kontrollen soll die *CXCL16* p.Ala181Val-Substitution als Suszeptibilitätsgen bei M. Crohn und Colitis ulcerosa untersucht werden.
- In einer anschließenden detaillierten Genotyp-Phänotyp-Analyse soll die *CXCL16* p.Ala181Val-Substitution in ihrer Bedeutung für phänotypische Charakteristika wie Krankheitslokalisierung und Verlauf der CED untersucht werden.
- In einer kombinierten Genotyp-Phänotyp-Analyse soll zudem untersucht werden, ob das gemeinsame Vorliegen der signifikant mit CED-assoziierten *NOD2/CARD15* Mutationen und der *CXCL16* p.Ala181Val-Substitution phänotypische Konsequenzen bei M. Crohn aufweist.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Studienpopulation

2.1.1. Patienten-Rekrutierung

Alle an der Studie teilnehmenden Patienten wurden zwischen Januar 2002 und Dezember 2006 in der Ambulanz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen der medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern der Universität München rekrutiert. Die 209 Kontrollpersonen waren nicht verwandt, gesund und von europäischer Abstammung. Die Diagnosen M. Crohn und Colitis ulcerosa wurden aufgrund etablierter klinischer Kriterien sowie mit Hilfe endoskopischer, radiologischer und histopathologischer Befunde gestellt (Lennard et al., 1989). Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München genehmigt. Alle teilnehmenden Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme.

Die Studienpopulation (n=574) setzte sich aus 201 Patienten mit M. Crohn (Männer 46,3 %, Durchschnittsalter $40,3 \pm 11,9$ Jahre), 164 Patienten mit Colitis ulcerosa (Männer 50,6 %, Durchschnittsalter $42,8 \pm 14,7$ Jahre), sowie 209 gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen (Männer 47,4%, Durchschnittsalter $48,6 \pm 15,2$ Jahre) zusammen.

2.1.2. Datenerhebung und Parameter der phänotypischen Auswertung

Die demographischen sowie klinischen Daten wurden durch eine retrospektive Auswertung der Patientenakten durch die Verfasserin der Promotionsschrift und einen unabhängigen Facharzt der Gastroenterologie erstellt. Zur Datenerhebung wurde zum Zeitpunkt der Patientenaufnahme zudem ein detailliertes Anamnesegespräch durchgeführt und ein detaillierter Fragebogen ausgefüllt (Bogen im Anhang). Bei der Auswertung wurden folgende

Parameter berücksichtigt: Alter bei Diagnose, Körpergewicht, Körpergröße, Geschlecht, Familienanamnese, extraintestinale Manifestationen, Krankheitsverlauf und Lokalisation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Komplikationen wie Stenosen, Fisteln oder Abszesse, chirurgische Eingriffe und medikamentöse Therapien mit Steroiden, Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat und/oder Infliximab. Bezüglich Krankheitslokalisation und Krankheitsverlauf wurden die Patienten mit M. Crohn nach der Vienna-Klassifikation (Gasche et al., 2000) unterteilt, die auf dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose (A), der Lokalisation (L), sowie dem Verhaltensmuster (B) der Krankheit basiert (siehe Tabelle 7). Die Daten wurden verblindet zur Genotypisierung erhoben.

Alter	
A1	< 40 Jahre
A2	> 40 Jahre
Lokalisation	
L1	terminales Ileum
L2	Kolon
L3	Ileokolon
L4	oberer Gastrointestinaltrakt
Krankheitsverhalten	
B1	nicht stenosierend, nicht penetrierend
B2	stenosierend
B3	penetrierend

Tabelle 7: Einteilungskriterien des M. Crohn nach der Vienna Klassifikation

Bei den Colitis ulcerosa-Patienten wurde die anatomische Lokalisation gemessen an den Leitlinien der Montreal Klassifikation nach den Kriterien Pankolitis, linksseitige Kolitis oder nur auf das Rektum begrenzte Kolitis (Proktitis) unterteilt (siehe Tabelle 8).

	Einteilung der Colitis ulcerosa	Lokalisation
E1	Pankolitis	gesamtes Kolon, Ausbreitung bis proximal der linken Kolonflexur
E2	linksseitige Kolitis	Colon descendens, Ausbreitung distal der linken Kolonflexur
E3	Proktitis	Rektum, Ausbreitung distal des Sigmoids

Tabelle 8: Einteilung der Colitis ulcerosa nach der Montreal-Klassifikation

Patienten mit Colitis indeterminata wurden von der Studie ausgeschlossen.

2.2. Verwendete Materialien und Laborgeräte

Für die im Folgenden beschriebenen Versuchsreihen wurden die unten aufgeführten Chemikalien und Geräte verwendet:

DNA-Extraktion:

Substanz	Hersteller
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Ethanol	Merck (Darmstadt)

Polymerasekettenreaktion (PCR):

Substanz	Hersteller
Nuklease-freies Wasser	Promega (Mannheim)
DMSO	Merck (Darmstadt)
dNTP (20 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)

Primer CXCL16 forward	MWG Biotech (Ebersberg)
Primer CXCL16 reverse	MWG Biotech (Ebersberg)
Taq DNA Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR-Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
MgCl ₂	Invitrogen (Karlsruhe)

Enzymatischer Verdau:

Substanz	Hersteller
Nuklease-freies Wasser	Promega (Mannheim)
Enzym AluI	New England BioLabs (Frankfurt/Main)
Restriktionspuffer	New England BioLabs (Frankfurt/Main)

Agarose-Gel-Elektrophorese:

Substanz	Hersteller
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
Destilliertes Wasser	Milli-Q Reagent Water Systems (Millipore/Schwalbach)
Ethidiumbromid	Bio-Rad (München)
Tris	Fischer (Schwerte)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Bio-Rad (München)

Salzsäure	Merck (Darmstadt)
-----------	-------------------

Zusammengesetzte Lösungen:

TE-Puffer
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

Ladepuffer
50,0 % Glycerin (V/V)
0,1 % Bromphenolblau (W/V)
49,9 % TE-Puffer (V/V)

TAE-Puffer
40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA

Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien:

Gerät	Hersteller
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Filter-Pipettenspitzen	Biozym (Hamburg)
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Waage PL200	Mettler-Toledo (Gießen)
Vortex Typ REAX 1D	Heidolph (Kehlheim)

Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler PTL-200	MJ-Research (Waltham/USA)
Gelkammer	Bio-Smart (Bern/Schweiz)
Stromgeber der Kammer Modell 1000/500	Bio-Rad (München)
UV-Transilluminator MultiDoc-It	UVP (Cambridge/UK)
Einmal-Handschuhe	Semper Care (Semperit/Wien/Österreich)
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich/Schweiz)
Zentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Kapillarsequenzier 3730	Applied Biosystems (Foster City/CA/USA)

2.3. Methodik

Alle Versuche wurden in den Forschungslaboren der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums der LMU München-Großhadern durchgeführt.

2.3.1. DNA-Extraktion

Um eine Untersuchung der genomischen Erbsubstanz möglich zu machen, muss diese zunächst aus den kernhaltigen Zellen von Na₂-EDTA-antikoaguliertem Vollblut isoliert werden. Dabei werden die Zellmembranen enzymatisch zerstört und die nun freie Nukleinsäure mittels Ionenaustauschchromatographie durch ein Filtermembransystem von Proteinen und Verunreinigungen getrennt. Für die vollständige DNA-Extraktion wurde das „QiaAmp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet und entsprechend dem

Protokoll des Herstellers verfahren. Die DNA-Extraktion wurde im Institut für Klinische Chemie des Universitätskrankenhauses Großhadern der LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. med. P. Lohse durchgeführt. 20 µl Protease wurden mit 200 µl Vollblut des Probanden und 200 µl des Puffers AL gemischt und anschließend für zehn Minuten bei 56°C inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Ethanol (97%) wurden die durchmischten Reagenzien in ein zentrifugierbares Chromatographiesäulensystem gefüllt. Durch eine spezielle Silika-Gel-Membran des Systems wurde bei einer anschließenden Zentrifugation (8000 rpm, 60 sek) die DNA von weiteren Zellbestandteilen gereinigt. Nach zweimaligem Waschen des Chromatographiesäulensystems (200 µl Waschpuffer AW1 bzw. AW2) und nachfolgender Zentrifugation (8000 rpm, 60 sek bzw. 14000 rpm, 180 sek) konnte die isolierte genomische DNA mit 200 µl des Puffers AE aus der Membran des Systems gelöst werden. Durch eine letzte Zentrifugation (60 sek bei 8000 rpm) erhielt man 3 bis 12 µg isolierte DNA, in 200 µl Puffer gelöst. Gelagert wurde die so gewonnene DNA bei 4°C.

2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist es möglich, einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs *in vitro* zu vervielfältigen. Eine typische PCR besteht aus drei Schritten: der Denaturierung, dem Annealing (Primerhybridisierung) und der Elongation.

Bei der Denaturierung schmilzt die doppelsträngige DNA durch Hitzebehandlung und zerfällt in ihre Einzelstränge. Anschließend wird die Temperatur gesenkt und die DNA-Einzelstränge können sich mit im Überschuss zugesetzten, komplementären DNA-Fragmenten (Primer) paaren (Annealing). Zuletzt wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der hitzestabilen

DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) erhöht, um eine optimale Zweistrangsynthese zu ermöglichen (Elongation). Diese drei Schritte werden über 40-mal wiederholt, um die Anzahl des gewünschten DNA-Strangs exponentiell zu vervielfältigen. Das Gesamtvolumen eines einzelnen PCR-Ansatzes betrug 20 µl und setzte sich folgendermaßen zusammen: 2 µl der genomischen DNA und 0,4 µl jeweils der folgenden Primer wurden verwendet:

Primer	Sequenz
CXCL16 forward	5'-ACTCGTCCCAATGAAACCAC-3'
CXCL16 reverse	5'-CCACAGCTTCATCTCCCACT-3'

Tabelle 9: Primer für die PCR

Die weiteren Bedingungen waren wie folgt:

13 µl H₂O (Nuklease-frei), 0,6 µl MgCl₂ (50mM), 0,4 µl dNTP (20mM), 1 µl DMSO (5 %), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 Units/µl) und 2 µl 10x Puffer. In jeden PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle eingeschlossen, die alle Reagenzien eines PCR-Ansatzes, anstatt DNA jedoch nur Wasser, enthielt. Hierdurch ließen sich eventuelle DNA-Kontaminationen des PCR-Ansatzes überprüfen. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden die Proben zur Amplifizierung in den Thermocycler gegeben. Die Amplifizierung wurde mit 43 Zyklen bei 95°C, 60°C und 72°C für jeweils 35 Sekunden durchgeführt, eingeleitet von einem einzigen Zyklus bei 95°C für drei Minuten, gefolgt von einem einzigen Zyklus bei 72°C für sieben Minuten.

2.3.3. DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Sequenz des 477 bp großen PCR-Produkts wurde es mit der sogenannten Didesoxymethode, die auch Kettenabbruch-Synthese genannt wird und 1977 erstmalig von Sanger et al. beschrieben wurde, sequenziert. Das Ergebnis wurde dann mit der zu erwarteten Nukleotidabfolge verglichen. Die Sequenzierung des Basenstrangs und des komplementären Basenstrangs wurde im Institut für Klinische Chemie-Großhadern des Universitätsklinikums der LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. med. P. Lohse durchgeführt. Bei der Didesoxymethode wird, von einem kurzen Abschnitt bekannter Sequenz (Primer) ausgehend, durch eine DNA-Polymerase der komplementäre Strang einer Einzelstrang-DNA verlängert. Jedoch sind dem Nukleotidgemisch in geringer Menge sogenannte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugegeben. Diese „Stopnukleotide“ besitzen keine 3'-OH-Gruppe: Werden nun sie anstatt eines normalen Nukleotids in die DNA eingebaut, ist die Verlängerung der DNA durch die Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe zur Verknüpfung mit dem nächsten Nukleotid fehlt und es kommt zum Strangabbruch. So entstehen DNA-Stränge unterschiedlicher Länge. Da im Voraus jedes der vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde, kann man nun die entstandenen Kettenabbruchprodukte sichtbar machen und anhand ihres „Stopnukleotids“ analysieren. Die Sequenz der Basen entspricht derjenigen des sequenzierten DNA-Strangs. Ein Beispiel einer solchen Sequenzierung ist in Abbildung 17 dargestellt.

In die erste Tasche des Gels wurden 5 µl eines Längenstandards, der sogenannten DNA-Leiter, gegeben, um die Größe der PCR-Produkte abschätzen zu können. Die Auftrennung der Proben erfolgte für eine Stunde bei 160 V. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Entsprechen die PCR-Produkte nicht der erwarteten Größe von 477 bp oder war die Negativkontrolle verunreinigt, wurde die PCR für die entsprechenden Proben wiederholt (siehe Abbildung 18).

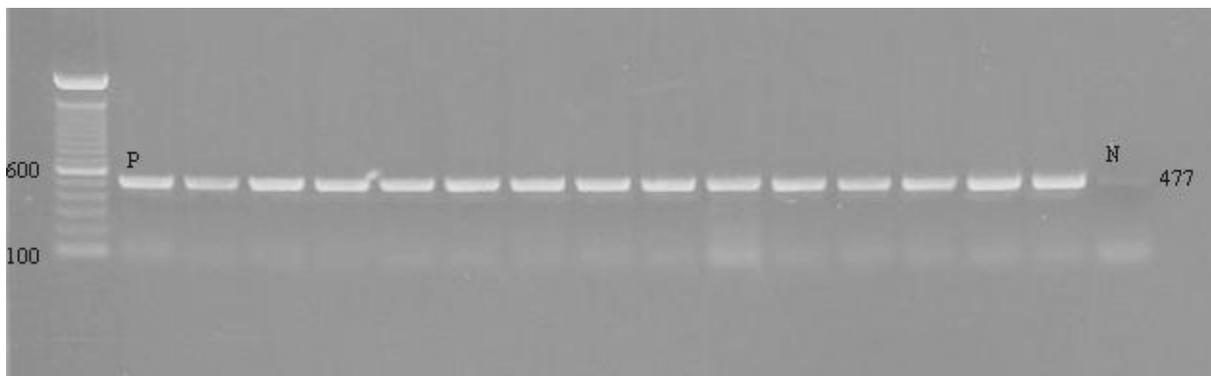


Abbildung 18: Polymerasekettenreaktion.

P markiert die Patientenproben, N die Negativkontrolle, 100-600 bp die DNA-Leiter und 477 bp die Größe des PCR-Produkts.

2.3.5. Genotypisierung des p.Ala181Val-Polymorphismus des *CXCL16*-Gens mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Die Genotypisierung des C->T Austausches, die dem *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus zugrunde liegt, wurde mit der RFLP-Analyse durchgeführt. 5 µl des erhaltenen PCR-Produkts wurden zusammen mit 12,5 µl H₂O (Nuklease-frei), 2 µl 10x Restriktionspuffer und 0,5 µl des Restriktionsenzym AluI bei 37°C für mindestens 16h inkubiert. Die C->T Mutation beeinflusst die Länge des Restriktionsfragments, weil dadurch eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym AluI (New England BioLabs, Frankfurt/Main) verloren geht. Es gibt drei Varianten des Polymorphismus. Bei der ersten besitzt nur eines der beiden Chromosome

die Mutation, die Zellen sind heterozygot (CT). Bei der zweiten Variante haben beide Chromosomen die Veränderung und sind demnach homozygot (TT). Besitzt das Chromosom gar keine Mutation, so wird es als Wildtyp bezeichnet (CC). Nach dem Verdau ergaben sich bei der Elektrophorese folglich drei Ergebnisse: lag ein homozygoter Fall vor, so fand sich nur ein unverändertes DNA-Fragment (477bp), da das Enzym nicht schneiden konnte. Handelte es sich um eine heterozygote Mutation, so erhielt man drei unterschiedlich lange Banden (477, 428, 49 bp), da das Enzym nur die Hälfte der DNA-Fragmente verdauen konnte. Und beim Wildtyp waren vier Fragmente zu beobachten (428, 49, 16, 6 bp). Die Fragmente mit 49, 16 und 6 bp sind aufgrund ihrer geringen Größe auf dem Agarosegel nicht erkennbar (siehe Abbildung 19).

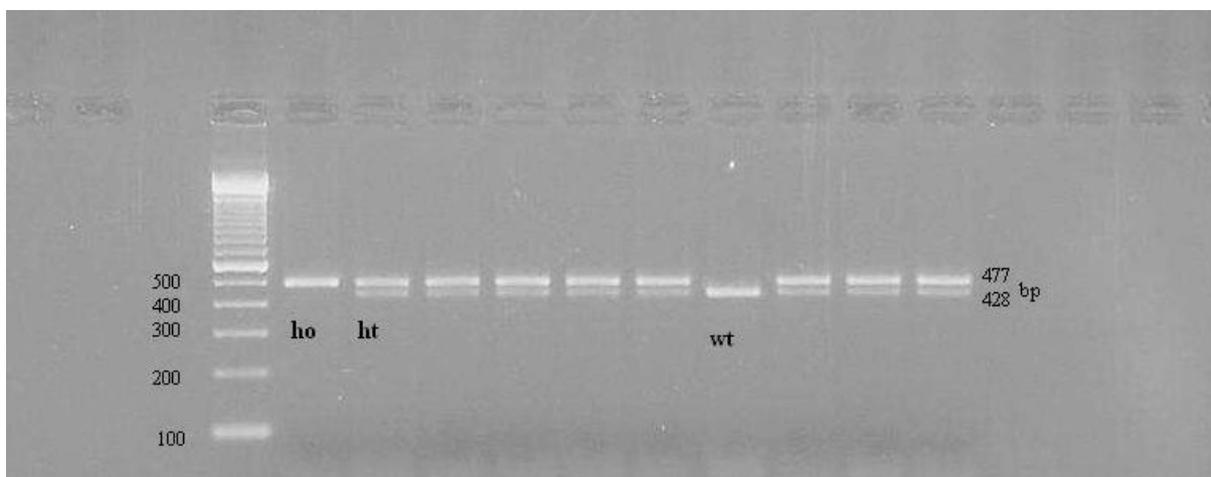


Abbildung 19: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus.

100 bp-500 bp kennzeichnet die DNA-Leiter, 477 bp und 428 bp das erwartete Produkt,

49, 16, 6 bp sind aufgrund der geringen Größe nicht sichtbar; ho=homozygot, ht=heterozygot, wt=wildtyp.

2.4. Genotypisierung der *NOD2/CARD15*-Varianten

Das Vorliegen der drei gemeinsamen *NOD2/CARD15*-Varianten p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 wurde direkt durch DNA-Sequenzierung ermittelt. Dafür wurden zunächst die DNA-Orte, die für die Mutationen (3'-Region von Exon 4, Exon 8 und Exon 11) bekannt sind, in Form einer PCR amplifiziert. Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend aufgereinigt und sequenziert. Die DNA-Sequenz wurde mit Hilfe eines Sequenz-Analyseprogrammes ermittelt und sichtbar gemacht.

Tabelle 10 zeigt die Primer der PCR-Reaktionen und Tabelle 11 die Primer der Sequenzreaktionen:

Exon	Primer		Größe des Produktes (bp)
	vorwärts	rückwärts	
4	5'-TTAGGTCCCGTCTTCACCATG-3'	5'-CTCCCACACTTAGCCTTGATGG-3'	1936
8	5' - GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG-3'	5'-CTCCTCCCTCTTCACCTGATCTC-3'	223
11	5'- GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG-3'	5'-GATCCTCAA AATTCTGCCATTCC-3'	293

Tabelle 10: PCR-Primer zur Amplifikation der Exons 4, 8 und 11

Exon	Primer	Orientierung
4	5'- CTCCCACACTTAGCCTTGATGG-3'	rückwärts
8	5'-GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG-3'	vorwärts
11	5'-GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG-3'	vorwärts

Tabelle 11: Primer zur Sequenzierung der Exons 4, 8 und 11

2.5. Statistik

Für den Vergleich quantitativer, kategorischer Variablen wurde der Fisher`s exact test oder der χ^2 Test verwendet. Der Student`s t test wurde für quantitative Variablen angewendet. Alle Tests waren zwei-geteilt, wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde. Alle statistischen Analysen wurden mit der SAS-Software 8.2 für Windows Win XP durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Demographische Daten der Studienpopulation

An der Studie nahmen insgesamt 574 Personen europäischer Abstammung im Alter von 17-86 Jahren teil. Die Studienpopulation (n=574) setzte sich aus 201 Patienten mit M. Crohn (Männer 46,3%, Durchschnittsalter $40 \pm 11,9$ Jahre), 164 Patienten mit Colitis ulcerosa (Männer 50,6%, Durchschnittsalter $42,8 \pm 14,7$ Jahre), sowie 209 gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen (Männer 47,4%, Durchschnittsalter $48,6 \pm 15,2$ Jahre) zusammen. Die demographischen Daten sind in Tabelle 12 dargestellt:

	M. Crohn (n=201)	Colitis ulcerosa (n=164)	Kontrollgruppe (n=209)
Geschlecht			
Männlich (%)	93 (46,3%)	83 (50,6%)	99 (47,4%)
Weiblich (%)	108 (53,7%)	81 (49,4%)	110 (52,6%)
Alter (Jahre)			
Mittelwert \pm SD	$40,3 \pm 11,9$	$42,8 \pm 14,7$	$48,6 \pm 15,2$
Spannweite	17 - 75	18 - 84	23 - 86
Body Maß Index			
Mittelwert \pm SD	$23,2 \pm 4,0$	$24,1 \pm 4,3$	
Spannweite	16 - 40	16 - 41	
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose			
Mittelwert \pm SD	$28,3 \pm 11,9$	$31,9 \pm 13,7$	
Spannweite	7 - 71	9 - 81	
Krankheitsdauer			
Mittelwert \pm SD	$11,9 \pm 8,2$	$10,7 \pm 7,8$	
Spannweite	1 - 43	0,5 - 39	
Positive Familienanamnese bei CED (%)			
	25 (12,4%)	21 (12,8%)	

Tabelle 12: Demographische Daten der Studienpopulation.
SD=Standardabweichung

3.2. Genotyp-Analyse des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus sowie der *NOD2/CARD15*-Varianten bei CED-Patienten und gesunden Probanden

3.2.1. Allel-Frequenz des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus

Die Ergebnisse der Genotyp-Analyse des *CXCL16*-Polymorphismus bei Patienten mit M. Crohn (n=201) oder Colitis ulcerosa (n=164) und der gesunden Kontrollgruppe (n=209) werden in den Tabellen 13 und 14 dargestellt. Die Genotyp-Analyse der Kontrollgruppe zeigte 31 Personen als ValVal homozygote Träger (14,8%), 102 Personen als AlaVal heterozygote Träger (48,8%) und 76 Personen als AlaAla Wildtyp-Träger (36,4%). Bei der M. Crohn-Gruppe wurden 67 AlaAla Wildtyp-Patienten (33,3%) identifiziert. 99 Patienten waren AlaVal heterozygot (49,3%) und 35 Patienten waren ValVal homozygot (17,4%). Die Gruppe der Colitis ulcerosa-Patienten zeigte 46 Personen mit AlaAla Wildtyp-Status (28,1%); 84 Personen waren für AlaVal heterozygot (51,2%) und 34 Personen ValVal homozygot (20,7%).

Zusammenfassend unterschied sich die Verteilung der verschiedenen *CXCL16*-Genotypen bei Patienten mit CED nicht signifikant von der gesunden Kontrollgruppe und der vorhergesagten Hardy-Weinberg-Verteilung ($p = 0,535$). Eine signifikante Assoziation des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus mit der Suszeptibilität für M. Crohn oder Colitis ulcerosa konnte damit nicht nachgewiesen werden.

Genotyp	AlaAla (CC)	AlaVal (CT)	ValVal (TT)
Kontrollgruppe	76 (36,4%)	102 (48,8%)	31 (14,8%)
M. Crohn	67 (33,3%)	99 (49,3%)	35 (17,4%)
Colitis ulcerosa	46 (28,1%)	84 (51,2%)	34 (20,7%)

Tabelle 13: Frequenz des p.Ala181Val *CXCL16*-Polymorphismus bei CED Patienten und gesunden Probanden, AlaAla = Wildtyp, AlaVal = heterozygote Träger, Val Val = homozygote Träger

<i>CXCL16</i> p.Ala181Val- Polymorphismus	CC vs CT p-Wert	CC vs TT p-Wert	CT vs TT p-Wert	CC vs CT+TT p-Wert
M. Crohn	MC vs Kontrolle p=0,663	MC vs Kontrolle p=0,458	MC vs Kontrolle p=0,671	MC vs Kontrolle p=0,535
Kontrollgruppe	1,10 (0,72-1,69)	1,28 (0,71-2,30)	1,16 (0,67-2,03)	1,14 (0,76-1,72)
Colitis ulcerosa	CU vs Kontrolle p=0,238	CU vs Kontrolle p=0,063	CU vs Kontrolle p=0,387	CU vs Kontrolle p=0,096
	1,36 (0,85-2,17)	1,81 (0,99-3,33)	1,33 (0,76-2,35)	1,47 (0,94-2,28)
	MC vs CU p=0,401	MC vs CU p=0,284	MC vs CU p=0,672	MC vs CU p=0,306
	0,81 (0,50-1,30)	0,71 (0,39-1,29)	0,87 (0,50-1,52)	0,78 (0,50-1,22)

Tabelle 14: Frequenz des *CXCL16*-Polymorphismus bei CED Patienten und gesunden Probanden (MC = M. Crohn, CU = Colitis ulcerosa)

3.2.2. Allel-Frequenz der *NOD2/CARD15*-Varianten

445 Patienten mit CED wurden hinsichtlich der drei bekanntesten Mutationen des *NOD2/CARD15*-Gens (R702W, G908R, 1007fs) auf ihren Genotyp hin untersucht. Das Ergebnis teilte sich in 303 Wildtypen (68,1%), 104 heterozygote (34,3%) und 38 homozygote bzw. compound heterozygote (8,5%) Allelträger auf. Als compound heterozygoten Allelträger bezeichnet man einen Patienten mit unterschiedlichen Mutationen in Kopien des gleichen Gens (siehe Tabelle 15). Bei den 303 M. Crohn-Patienten stellte man 183 (60,4%) ohne einen Polymorphismus, 84 (27,7%) mit einem der drei Polymorphismen und 36 (11,9%) mit unterschiedlichen Mutationen fest. Bei den 142 Colitis ulcerosa-Patienten wurden 120 (85,0%) Wildtypen, 20 (14,1%) heterozygote und 2 (0,01%) homozygote Allelträger

festgestellt. Dies bestätigt die Beobachtung, dass die *NOD2/CARD15*-Varianten häufiger bei Patienten mit M. Crohn als bei Patienten mit Colitis ulcerosa auftreten.

	Wildtyp	heterozygot	homozygot/ compound heterozygot
CED (n=445)	303 (68,1%)	104 (34,3%)	38 (8,5%)
M. Crohn (n=303)	183 (60,4%)	84 (27,7%)	36 (11,9%)
Colitis ulcerosa (n=142)	120 (85,0%)	20 (14,1%)	2 (0,01%)

Tabelle 15: Frequenz der *NOD2/CARD15*-Varianten bei CED Patienten und aufgeteilt in M. Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten (MC = M. Crohn; CU = Colitis ulcerosa)

3.3. Genotyp-Phänotyp-Analyse des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus

3.3.1. Genotyp-Phänotyp-Analyse der Patienten mit M. Crohn

Die demographischen Daten Geschlecht, Body Maß Index (BMI), Alter bei Diagnose, Krankheitsdauer, Alter, Dauer der Erkrankung, Lokalisation, immunsuppressive Therapie, Operationen, Komplikationen (Fisteln, Stenosen, Abszesse), extraintestinale Manifestationen sowie eine positive Familienanamnese wurden auf einen Zusammenhang mit dem Genotyp des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus (AlaAla = Wildtyp; AlaVal = heterozygot; ValVal = homozygot) bei M. Crohn-Patienten untersucht. Die Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analyse sind in Tabelle 16 zusammengefasst (siehe Tabelle 16):

Geschlecht

Bei Vergleich der Wildtypen und den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Geschlechts festgestellt werden. 31 der 67 M. Crohn-Patienten, die Wildtypen (d.h. ohne Mutation) waren, waren männlich, was einem Prozentsatz von 46,3% entspricht. Desweiteren waren 17 der 35 homozygoten Träger männlichen Geschlechts (48,6%) sowie 45 der 99 heterozygoten Allelträger (45,4%).

Body Maß Index

Bezüglich des Body Maß Indices konnte kein signifikanter Unterschied bei Vergleich der Wildtypen und den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus nachgewiesen werden. Der BMI lag bei den Wildtypen bei $23,2 \pm 4,1$ kg/m² mit einer Spannweite (SW) von 17-40, bei den homozygoten Trägern bei $23,9 \pm 4,1$ kg/m² mit einer SW von 16-31 und bei den heterozygoten Trägern bei $23,0 \pm 3,9$ kg/m² mit einer SW von 16-37.

Alter bei Diagnose

Es konnte ein signifikant jüngeres Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei den homozygoten Trägern ValVal ($24,3 \pm 9,1$ Jahre; SW = 7-49 Jahre) des *CXCL16* p. Ala181Val-Polymorphismus nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19), verglichen mit den AlaAla Wildtypen ($29,1 \pm 12,0$ Jahre; SW = 12-66 Jahre) und den AlaVal heterozygoten Trägern ($29,2 \pm 12,4$ Jahre; SW = 13-71 Jahre) ($p=0,028$ homozygot vs Wildtyp; $p=0,016$ homozygot vs heterozygot).

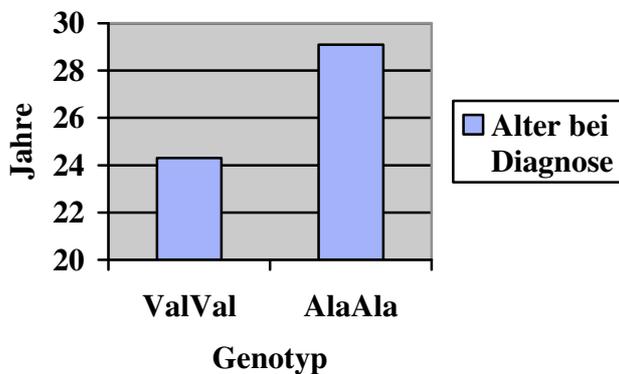


Abbildung 19: Das Val-Allel des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus ist mit einem frühen Krankheitsbeginn assoziiert ($p=0,028$).

Krankheitsdauer

In Bezug auf die Krankheitsdauer konnte keine signifikante Differenz zwischen Wildtypen und den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus festgestellt werden. Die Wildtypen waren durchschnittlich $12,3 \pm 8,4$ Jahre mit einer SW von 1-34 erkrankt im Vergleich zu den Homozygoten mit $13,1 \pm 8,8$ Jahren (SW = 3-43) und den Heterozygoten mit $11,3 \pm 7,9$ Jahren (SW = 2-33).

Alter

Die Unterschiede bezüglich des Alters zum Zeitpunkt der Erhebung waren nicht signifikant zwischen den Trägern des Polymorphismus und den Wildtypen, wobei die homozygoten ValVal Träger ein etwas jüngeres Alter aufwiesen ($37,5 \pm 10,6$ Jahre; SW = 17-61) im Vergleich zu den AlaAla Trägern ($41,4 \pm 12,1$ Jahre; SW = 19-69) und den heterozygoten AlaVal Trägern ($40,4 \pm 12,2$ Jahre; SW = 20-75).

Alter bei Diagnose (Vienna A)

In Bezug auf das Alter bei Diagnosestellung nach der Vienna-Klassifikation konnte ein deutlich jüngeres Alter bei der Erstdiagnose bei den homozygoten Allelträgern nachgewiesen werden. 32 (91,4%) der 35 homozygoten Träger waren unter 40 Jahre (A1) zum Zeitpunkt der Diagnose im Unterschied zu 55 (82,1%) von 67 Wildtypen und 81 (81,8%) von 99 heterozygoten Trägern. In der Altersgruppe über 40 Jahre (A2) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden: 3 (8,6%) von 35 homozygoten Trägern im Vergleich zu 12 (17,9%) von 67 Wildtypen und 18 (18,2%) von 99 heterozygoten Trägern waren über 40 Jahre bei der Erstdiagnose.

Lokalisation (Vienna L)

Bei Vergleich der Wildtypen und den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus konnte beim Befall des terminalen Ileums (L1) kein signifikanter Unterschied gefunden werden, denn 9,0% (6 von 67) der Wildtypen, 7,1% (7 von 99) der Heterozygoten und 8,6% (3 von 35) der Homozygoten zeigten diese Krankheitsausprägung. Beim Befall des Kolons (L2) jedoch konnte ein Unterschied festgestellt werden (siehe Abbildung 20). AlaAla homozygote Patienten hatten eine höhere Beteiligung des Kolons (31,3%; 21 von 67) verglichen mit Patienten, die nur einen Val-Austausch hatten (14,1%; 14 von 99) und den homozygoten Patienten (17,1%; 6 von 35) ($p=0,009$). In Bezug auf das Ileokolon (L3) konnte ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Krankheitsmanifestation bei den heterozygoten AlaVal Trägern (56,6%; 56 von 99) und homozygoten ValVal-Trägern (57,2%; 20 von 35) im Vergleich zu den AlaAla-Wildtypen (43,3%; 29 von 67) festgestellt werden ($p=0,024$). Der Befall des oberen Gastrointestinaltrakts (L4) konnte mit einem erhöhten Risiko für die

heterozygoten Träger (22,2%; 22 von 99) im Unterschied zu den Wildtypen (16,4%; 11 von 67) und den homozygoten Trägern (17,1%; 6 von 35) assoziiert werden.

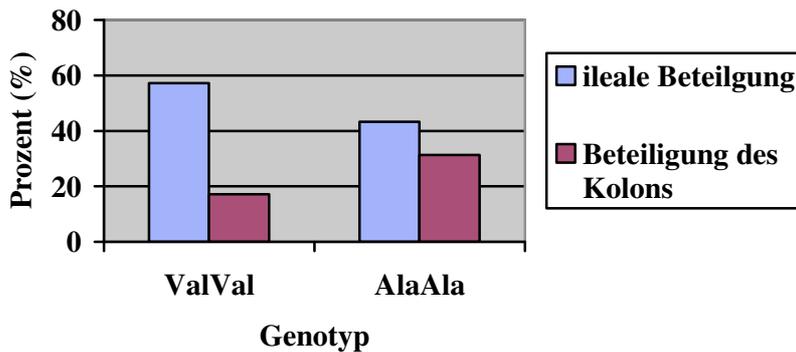


Abbildung 20: Der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus ist bei Patienten mit M. Crohn mit einer ilealen Beteiligung assoziiert.

($p=0,024$ für ileale Beteiligung (L3); OR 2,17; CI 1,12-4,21 vs AlaAla; $p=0,009$ für eine Beteiligung des Kolons; OR 2,60; CI 1,29-5,25 vs AlaAla; OR = odds ratio; CI = confidence interval)

Krankheitsverhalten (Vienna B)

In Hinblick auf das Krankheitsverhalten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus festgestellt werden. Bei 20,9% (14 von 67) der Wildtypen, 20,2% (20 von 99) der Heterozygoten und 17,1% (6 von 35) der Homozygoten wurde ein nicht-stenosierendes, nicht-penetrierendes Verhalten (B1) nachgewiesen. Stenosen (B2) konnten bei 22,4% (15 von 67) der AlaAla-Träger, 27,3% (27 von 99) der AlaVal-Träger und 25,7% (9 von 35) der ValVal-Träger festgestellt werden. Eine Fistelbildung (B3) fand bei 56,7% (38 von 67) der Wildtypen, 52,5% (52 von 99) der heterozygoten Träger und 57,2% (20 von 35) der homozygoten Träger statt.

Therapie mit Immunsuppressiva

Bei der Medikation mit Immunsuppressiva konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus und den Wildtypen nachgewiesen werden. Immunsuppressiva wurden bei 86,6% (58 von 67) der Wildtypen, 75,8% (75 von 99) der heterozygoten AlaVal-Träger und bei 82,9% (29 von 35) der homozygoten ValVal-Träger eingesetzt.

Extraintestinale Manifestationen

Auch bei der Betrachtung der extraintestinalen Manifestationen konnten keine signifikanten Differenzen zwischen den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus und den Wildtypen festgestellt werden. Bei 54 der 67 Wildtypen (80,6%), 70 der 99 heterozygoten Allelträger (70,7%) sowie 23 der 35 homozygoten Allelträger (65,7%) traten extraintestinale Manifestationen auf.

Positive Familienanamnese

In Bezug auf die Familienanamnese wurden keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der Wildtypen und der Träger des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus gefunden. Jedoch schienen die ValVal-Träger eine etwas erhöhte Anzahl (20,0%; 7 von 35) an erkrankten Familienangehörigen aufzuweisen als die AlaAla-Träger (11,9%; 8 von 67) und die AlaVal-Träger (10,1%; 10 von 99).

Operationen aufgrund M. Crohn

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der durchgeführten Operationen aufgrund eines M. Crohn festgestellt: bei 41 der 67 Wildtypen (61,2%), 56 der 99

Heterozygoten (56,6%) und 22 der 35 Homozygoten (62,9%) wurde ein chirurgischer Eingriff durchgeführt.

Fisteln, Stenosen, Abszesse

Bezüglich der M. Crohn assoziierten Komplikationen wie Fisteln, Stenosen und Abszessbildungen wurde keine signifikante Diskrepanz gefunden. Bei 38 der 67 Patienten (56,7%), die keine Mutation aufwiesen, 52 der 99 heterozygoten Patienten (52,5%) und 20 der 35 (57,1%) homozygoten Patienten konnte eine Fistelbildung gezeigt werden. Bei 67,2% (45 von 67) der Wildtypen, 68,7% (68 von 99) der heterozygoten Träger und 74,3% (26 von 35) der homozygoten Träger traten Stenosen auf. Die Anzahl der Patienten, die eine Abszessbildung erfuhren, lag bei den Wildtypen bei 28 von 67 (41,8%), bei den heterozygoten Allelträgern bei 33 von 99 (33,3%) und bei den homozygoten Allelträgern bei 15 von 35 (42,9%).

Zusammenfassung der Genotyp-Phänotyp-Analyse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus bei den M. Crohn-Patienten mit einem frühen Krankheitsbeginn sowie ilealer Beteiligung assoziiert ist. Die Genotyp-Phänotyp-Analyse demonstrierte ein signifikant jüngeres Alter zum Zeitpunkt der Diagnose bei den homozygoten ValVal-Trägern (d.h.: $24,3 \pm 9,1$ Jahre) verglichen mit den AlaAla-Wildtypen ($29,1 \pm 12$ Jahre) oder den heterozygoten AlaVal-Trägern ($29,2 \pm 12,4$ Jahre); ($p = 0,028$ homozygot vs Wildtyp und $p = 0,016$ homozygot vs heterozygot). Es konnte festgestellt werden, dass sich die Patienten nicht signifikant in den Merkmalen wie Alter, Geschlecht, Body Maß Index, Familienanamnese, Gebrauch von immunhemmenden Medikamenten oder extraintestinalen Manifestationen unterscheiden.

Zusätzlich fanden sich keine Unterschiede in den M. Crohn-assoziierten Komplikationen wie z. B. chirurgische Eingriffe, Anzahl von Fisteln, Stenosen oder Abszessbildungen. Betrachtet man die Lokalisation der Krankheit, übereinstimmend mit der Vienna Klassifikation, hatten AlaAla Patienten eine höhere Anzahl einer Beteiligung des Kolons (L2) verglichen mit Patienten, die nur einen Val Austausch besaßen (31,3%; $p = 0,009$). Zusätzlich war ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Krankheitsmanifestation im Ileum (L3) bei Patienten mit nur einem Val Allel im Vergleich zu den Wildtyp Patienten mit dem AlaAla Status ($p = 0,024$) zu finden (vergleiche Tabelle 16).

	1	2	3	(1) vs (2)	(1) vs (3)	(2) vs (3)	(1) vs (2)+(3)
	AlaAla	AlaVal	ValVal	p - Wert	p - Wert	p - Wert	p - Wert
	(n=67)	(n=99)	(n=35)				
Männlich	31	45	17	p=1,000	p= 0,838	p= 0,844	p=1,000
n = (%)	46,3%	45,4%	48,6%	0,97 (0,52-1,80)	1,10 (0,48-2,49)	1,13 (0,52-2,45)	1,00 (0,56-1,80)
Body Maß Index (kg/m²)							
Mittelwert ± SA	23,2 + 4,1	23,0 + 3,9	23,9 + 4,1	p=0,675	p=0,443	p=0,249	p=0,969
Spannweite	17-40	16-37	16-31				
Alter bei Diagnose (Jahre)							
Mittelwert ± SA	29,1 + 12,0	29,2 + 12,4	24,3 + 9,1	p=0,962	p=0,028	p=0,016	p=0,512
Spannweite	12-66	13-71	7-49				
Krankheitsdauer (Jahre)							
Mittelwert ± SA	12,3 + 8,4	11,3 + 7,9	13,1 + 8,8	p=0,401	p=0,653	p=0,260	p=0,633
Spannweite	1-34	2-33	3-43				
Alter (Jahre)							
Mittelwert ± SA	41,4 + 12,1	40,4 + 12,2	37,5 + 10,6	p=0,602	p=0,091	p=0,178	p=0,324
Spannweite	19-69	20-75	17-61				
Alter bei Diagnose (Vienna A)							
< 40 Jahre (A1)	55 (82,1%)	81 (81,8%)	32 (91,4%)	p=1,000	p=0,252	p=0,279	p=0,690
> 40 Jahre (A2)	12 (17,9%)	18 (18,2%)	3 (8,6%)	0,98 (0,44-2,20)	2,33 (0,61-8,87)	2,37 (0,65-8,60)	1,17 (0,54-2,56)
Lokalisation							
Terminales Ileum (L1)	6 (9,0%)	7 (7,1%)	3 (8,6%)	(L1) p=0,771	(L1) p=1,000	(L1) p=0,721	(L1) p=0,784
				0,77 (0,25-2,41)	0,95 (0,22-4,06)	1,23 (0,30-5,05)	0,82 (0,29-2,36)
Kolon (L2)	21 (31,3%)	14 (14,1%)	6 (17,1%)	(L2) p=0,011	(L2) p=0,158	(L2) p=0,738	(L2) p=0,009
				0,36 (0,17-0,78)	0,45 (0,16-1,26)	1,26 (0,44-3,57)	0,38 (0,19-0,77)
Ileokolon (L3)	29 (43,3%)	56 (56,6%)	20 (57,2%)	(L3) p=0,114	(L3) p=0,214	(L3) p=1,000	(L3) p=0,099
				1,71 (0,91-3,19)	1,75 (0,77-3,99)	1,02 (0,47-2,23)	1,72 (0,95-3,10)
Oberer GI (L4)	11 (16,4%)	22 (22,2%)	6 (17,1%)	(L4) p=0,430	(L4) p=1,000	(L4) p=0,633	(L4) p=0,571
				1,46 (0,65-3,24)	1,05 (0,35-3,14)	0,72 (0,27-1,97)	1,35 (0,62-2,90)

Krankheitsverhalten								
nicht-stenosierend, nicht penetrierend (B1)	14 (20,9%)	20 (20,2%)	6 (17,1%)	(B1) p=1,000 0,96 (0,45-2,06)	(B1) p=0,795 0,78 (0,27-2,26)	(B1) p=0,807 0,82 (0,30-2,24)	(B1) p=0,852 0,91 (0,44-1,89)	
stenosierend (B2)	15 (22,4%)	27 (27,3%)	9 (25,7%)	(B2) p=0,586 1,30 (0,63-2,68)	(B2) p=0,807 1,20 (0,46-3,11)	(B2) p=1,000 0,92 (0,38-2,22)	(B2) p=0,606 1,27 (0,64-2,54)	
penetrierend (B3)	38 (56,7%)	52 (52,5%)	20 (57,2%)	(B3) p=0,636 0,84 (0,45-1,58)	(B3) p=1,000 1,02 (0,45-2,32)	(B3) p=0,696 1,21 (0,55-2,62)	(B3) p=0,764 0,89 (0,49-1,60)	
Immun-suppressive Therapie	58 (86,6%)	75 (75,8%)	29 (82,9%)	p=0,113 0,48 (0,21-1,12)	p=0,796 0,75 (0,24-2,31)	p=0,483 1,55 (0,57-4,17)	p=0,185 0,54 (0,24-1,21)	
Extra-intestinale Manifestationen	54 (80,6%)	70 (70,7%)	23 (65,7%)	p=0,203 0,58 (0,28-1,22)	p=0,145 0,46 (0,18-1,16)	p=0,670 0,79 (0,35-1,80)	p=0,128 0,55 (0,27-1,11)	
Positive Familienanamnese	8 (11,9%)	10 (10,1%)	7 (20,0%)	p=0,801 0,83 (0,31-2,22)	p=0,377 1,84 (0,61-5,59)	p=0,146 2,22 (0,77-6,39)	p=1,000 0,99 (0,40-2,42)	
Operation wegen MC	41 (61,2%)	56 (56,6%)	22 (62,9%)	p=0,631 0,83 (0,44-1,55)	p=1,000 1,07 (0,46-2,50)	p=0,555 1,30 (0,59-2,87)	p=0,761 0,88 (0,49-1,61)	
Fisteln	38 (56,7%)	52 (52,5%)	20 (57,1%)	p=0,636 0,84 (0,45-1,58)	p=1,000 1,02 (0,45-2,32)	p=0,696 1,21 (0,55-2,62)	p=0,764 0,89 (0,49-1,60)	
Stenosen	45 (67,2%)	68 (68,7%)	26 (74,3%)	p=0,866 1,07 (0,55-2,08)	p=0,504 1,41 (0,57-3,52)	p=0,668 1,32 (0,55-3,14)	p=0,746 1,15 (0,61-2,16)	
Abszesse	28 (41,8%)	33 (33,3%)	15 (42,9%)	p=0,325 0,70 (0,38-1,32)	p=1,000 1,05 (0,46-2,39)	p=0,315 1,50 (0,68-3,30)	p=0,443 0,78 (0,43-1,42)	

Tabelle 16: Assoziation zwischen dem *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus und Krankheitscharakteristiken des M. Crohn

3.3.2. Genotyp-Phänotyp-Analyse der Patienten mit Colitis ulcerosa

Entsprechend der Auswertung bei den M. Crohn Patienten wurden auch die Colitis ulcerosa-Patienten hinsichtlich eines Zusammenhangs des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus mit den demographischen Daten wie Geschlecht, Body Maß Index, Alter bei Diagnose, Krankheitsdauer, Alter, Lokalisation, immunsuppressiver Therapie, Operationen, Komplikationen (Fisteln, Stenosen, Abszesse), extraintestinale Manifestationen sowie positiver Familienanamnese untersucht (siehe Tabelle 17).

Geschlecht

Hinsichtlich des Geschlechts konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus und den Wildtypen festgestellt werden: 52,2% (24 von 46) der Wildtypen, 54,8% (46 von 84) der heterozygoten Allelträger und 44,1% (15 von 34) der homozygoten Allelträger waren männlich.

Body Maß Index

Der Body Maß Index konnte keine signifikante Diskrepanz zwischen den Wildtypen und den Trägern des Polymorphismus aufweisen. Bei den Wildtypen lag er bei $23,9 \pm 3,9$ kg/m² (SW = 16-32), bei den Heterozygoten bei $24,6 \pm 4,8$ kg/m² (SW = 18-41) und bei den Homozygoten bei $23,4 \pm 3,4$ kg/m² (SW = 16-30).

Alter bei Diagnose

Bezüglich des Alters bei Diagnose wurde kein signifikanter Zusammenhang im Vergleich der Träger des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus und der Wildtypen gefunden.

Die Patienten ohne Mutation erkrankten mit $30,9 \pm 11,7$ Jahren (SW = 9-61), die heterozygoten Träger mit $33,1 \pm 15,2$ Jahren (SW = 13-81) und die homozygoten Träger mit $30,4 \pm 12,2$ Jahren (SW = 14-75).

Krankheitsdauer

Bei Vergleich der Wildtypen mit den Trägern des CXCL16 p.Ala181Val-Polymorphismus konnten bei der Dauer der Erkrankung keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Krankheit dauerte bei den AlaAla Trägern $11,3 \pm 7,2$ Jahre (SW = 3-30), den AlaVal Trägern $9,9 \pm 7,6$ Jahre (SW = 1-34) und bei den AlaAla Trägern $11,7 \pm 8,9$ Jahre (SW = 0,5-39).

Alter

Bezüglich des Alters der Erkrankten fand man im Vergleich der Träger des Polymorphismus mit den Wildtypen keine signifikanten Diskrepanzen. Die Patienten mit dem Wildtyp waren im Durchschnitt $42,7 \pm 14,3$ Jahre alt (SW = 18-78), die heterozygoten Patienten $43,5 \pm 15,6$ Jahre (SW = 18-84) und die homozygoten Patienten $41,5 \pm 13,0$ Jahre (SW = 22-76).

Lokalisation

Auch in Hinblick auf die Lokalisation konnte bei Vergleich der Wildtypen mit den Trägern des CXCL16 p.Ala181Val-Polymorphismus kein nennenswerter Zusammenhang gefunden werden: bei 11 von 46 (23,9%) Wildtypen, 14 von 84 (16,7%) Heterozygoten und 5 von 34 (14,7%) Homozygoten konnte ein Befall des Rektums/Sigmas festgestellt werden. Ein linksseitiger Befall konnte bei 23,9% (11 von 46) der AlaAla Träger, bei 33,3% (28 von 84) der AlaVal Träger und bei 32,3% (11 von 34) der AlaAla Träger nachgewiesen werden. 24

der 46 (52,2%) Wildtypen, 42 der 84 (50,0%) heterozygoten Patienten und 18 der 34 (52,9%) der homozygoten Patienten litten an einer Pankolitis.

Immunsuppressive Therapie

Interessanterweise konnte bei den homozygoten ValVal-Trägern ein höherer Bedarf an immunsuppressiver Therapie festgestellt werden (79,4%; 27 von 34) im Vergleich zu den AlaAla-Wildtypen (60,9%; 28 von 46) und den AlaVal-Heterozygoten (76,2%; 64 von 84). Dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,051$). Der Gebrauch von Infliximab (≥ 1 Infusion) lag bei den Wildtypen bei 8 von 46 (17,4%), den Heterozygoten bei 21 von 84 (25,0%) und den Homozygoten bei 11 von 34 (32,4%).

Operation aufgrund Colitis ulcerosa

Hinsichtlich der Notwendigkeit einer Operation wegen Colitis ulcerosa konnte zwischen Trägern des Polymorphismus und Wildtypen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Die OP-Rate lag bei den AlaAla-Trägern bei 2,2% (1 von 46), bei den AlaVal Trägern bei 3,6% (3 von 84) und bei den ValVal-Trägern sogar bei 0.

Fisteln, Stenosen, Abszesse

Auch bei den Colitis ulcerosa assoziierten Komplikationen wie Fisteln, Stenosen und Abszessen konnte bei den Wildtypen verglichen mit den Trägern des Polymorphismus keine signifikante Diskrepanz nachgewiesen werden. Fisteln konnten bei 2,2% (1 von 46) der Patienten ohne Mutationen nachgewiesen werden und bei 7,1% (6 von 84) der heterozygoten Patienten. Die Anzahl bei den homozygoten Patienten war 0. 17,4% (8 von 46) der Wildtypen, 11,9% (10 von 84) der AlaVal-Träger und 8,8% (3 von 34) der ValVal-Träger

litten an Stenosen. Eine Abszessbildung trat bei 2,2% (1 von 46) der Wildtypen, bei 7,1% (6 von 84) der heterozygoten Patienten und bei 5,9% (2 von 34) der homozygoten Patienten auf.

Extraintestinale Manifestationen

Bezüglich der extraintestinalen Manifestationen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus und den Wildtypen nachgewiesen. Extraintestinale Manifestationen traten bei 21,7% (10 von 46) der Patienten ohne Mutation, bei 11,9% (10 von 84) der heterozygoten Patienten und bei 8,8% (3 von 34) der homozygoten Patienten auf.

Positive Familienanamnese

Auch die Betrachtung der Familienanamnese zeigte keine signifikanten Diskrepanzen bei den Colitis Ulcerosa-Patienten. 3 von 46 Wildtypen (6,5%), 12 von 84 AlaVal-Trägern (14,3%) und 6 von 34 ValVal-Trägern (17,6%) zeigten eine positive Familienanamnese.

Zusammenfassung der Genotyp-Phänotyp-Analyse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der *CXCL16*-Polymorphismus nicht mit einem spezifischen Phänotyp bei Colitis ulcerosa-Patienten assoziiert ist. Die durchgeführten Genotyp-Phänotyp-Analysen bei Patienten mit Colitis ulcerosa zeigten keine Unterschiede in der Verteilung männlich-weiblich, dem Body Maß Index, dem Alter, dem Zeitpunkt der Diagnose, dem Krankheitsverlauf sowie der Familienanamnese zwischen Trägern und Nicht-Trägern der p.Ala181Val-Variante. Vergleicht man die Lokalisation der Krankheit (Pankolitis, linksseitige Kolitis und Kolitis, die auf das Rektum begrenzt ist) oder die Colitis ulcerosa assoziierten Komplikationen wie z. B. Fisteln, Stenosen, Abszessbildungen, Operationsindikationen oder extraintestinale Manifestationen, konnten keine signifikanten

Diskrepanzen zwischen den Wildtypen und den Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus nachgewiesen werden. Interessanterweise gab es bei den homozygoten ValVal-Trägern einen höheren Bedarf an immunsuppressiver Therapie (79,4% vs 60,9% WT und 76,2% heterozygot). Dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,051$) (vergleiche Tabelle 17).

	(1) CC (n=46)	(2) CT (n=84)	(3) TT (n=34)	(1)vs(2) p Wert	(1)vs(3) p Wert	(2)vs(3) p Wert	(1)vs(2) + (3) p Wert
Männlich n=(%)	24 (52,2%)	46 (54,8%)	15 (44,1%)	p=0,855	p=0,506	p=0,316	p=1,000
				1,11 (0,54-2,28)	0,72 (0,30-1,76)	0,65 (0,29-1,45)	0,98 (0,50-1,94)
Body Maß Index (kg/m ²)							
Mittelwert ± SA	23,9 ±3,9	24,6 ±4,8	23,4 ±3,4	p=0,476	p=0,542	p=0,183	p=0,727
Spannweite	16-32	18-41	16-30				
Alter bei Diagnose (Jahre)							
Mittelwert ± SA	30,9 ±11,7	33,1 ±15,2	30,4 ±12,2	p=0,381	p=0,837	p=0,318	p=0,539
Spannweite	9-61	13-81	14-75				
Krankheitsdauer (Jahre)							
Mittelwert ± SA	11,3 ± 7,2	9,9 ±7,6	11,7±8,9	p=0,313	p=0,839	p=0,319	p=0,505
Spannweite	3-30	1-34	0,5-39				
Alter (Jahre)							
Mittelwert ± SA	42,7 ±14,3	43,5 ±15,6	41,5 ±13,0	p=0,760	p=0,700	p=0,474	p=0,921
Spannweite	18-78	18-84	22-76				
Lokalisation							
Rektum	11 (23,9%)	14 (16,7%)	5 (14,7%)	Rektum p=0,356	Rektum p=0,401	Rektum p= 1,000	Rektum p=0,265
				0,64 (0,26-1,55)	0,55 (0,17-1,76)	0,86 (0,28-2,61)	0,61 (0,27-1,41)
linksseitig	11 (23,9%)	28 (33,3%)	11 (32,3%)	linksseitig p=0,319	linksseitig p=0,454	linksseitig p= 1,000	linksseitig p=0,454
				1,59 (0,70-3,60)	1,52 (0,57-4,09)	0,96 (0,41-2,24)	1,57 (0,72-3,42)
Pankolitis	24 (52,2%)	42 (50,0%)	18 (52,9%)	Pankolitis p=0,856	Pankolitis p= 1,000	Pankolitis p=0,840	Pankolitis p= 1,000
				0,92 (0,45-1,88)	1,03 (0,42-2,51)	1,13 (0,51-2,50)	0,95 (0,48-1,88)
Immunsuppressive Therapie	28 (60,9%)	64 (76,2%)	27 (79,4%)	p=0,073	p=0,092	p=0,812	p=0,051
				2,06 (0,95-4,47)	2,48 (0,89-6,88)	1,21 (0,46-3,18)	2,17 (1,04-4,50)
Gebrauch von Infiximab (≥ 1 Infusion)	8 (17,4%)	21 (25,0%)	11 (32,4%)	p=0,382	p=0,183	p=0,494	p=0,228
				1,58 (0,64-3,93)	2,27 (0,80-6,48)	1,44 (0,60-3,43)	1,77 (0,74-4,19)

OP aufgrund CU	1 (2,2%)	3 (3,6%)	0	p= 1,000			
					p=1,000	p=0,556	p= 1,000
				1,67 (0,17-16,50)			1,17 (0,12-11,58)
Fisteln	1 (2,2%)	6 (7,1%)	0	p=0,420			p=0,674
					p=1,000	p=0,180	
				3,46 (0,40-29,67)			2,41 (0,28-20,59)
Stenosen	8 (17,4%)	10 (11,9%)	3 (8,8%)	p=0,431	p=0,338	p=0,755	p=0,302
				0,64 (0,23-1,76)	0,46 (0,11-1,88)	0,72 (0,18-2,78)	0,59 (0,23-1,53)
Abszesse	1 (2,2%)	6 (7,1%)	2 (5,9%)	p=0,420	p=0,572	p=1,000	p=0,447
				3,46 (0,40-29,67)	2,81 (0,24-32,36)	0,81 (0,16-4,24)	3,27 (0,40-26,92)
Extraintestinale Manifestationen	10 (21,7%)	10 (11,9%)	3 (8,8%)	p=0,202	p=0,140	p=0,755	p=0,085
				0,49 (0,19-1,27)	0,35 (0,09-1,38)	0,72 (0,18-2,78)	0,45 (0,18-1,10)
Positive Familienanamnese	3 (6,5%)	12 (14,3%)	6 (17,6%)	p=0,255	p=0,159	p=0,778	p=0,193
				2,39 (0,64-8,95)	3,07 (0,71-13,30)	1,29 (0,44-3,76)	2,58 (0,72-9,22)

Tabelle 17: Assoziation zwischen dem *CXCL16* Polymorphismus und Colitis ulcerosa-Charakteristiken (CU=Colitis ulcerosa).

3.4. Kombinierte Genotyp-Phänotyp-Analyse unter Berücksichtigung des *CXCL16*+/*NOD2*-Genotyps

In den letzten Jahren wurden bestimmte M. Crohn-Phänotypen bei mehreren *NOD2/CARD15*-Varianten beschrieben. Deshalb wurde alle M. Crohn-Patienten auf das Vorhandensein der drei M. Crohn assoziierten *NOD2/CARD15*-Varianten p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 hin untersucht und die phänotypischen Konsequenzen bei Trägern analysiert, die kombiniert sowohl das Val-Allel des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus als auch eine der drei *NOD2/CARD15*-Hauptvarianten besaßen. Es wurden die demographischen Charakteristika Geschlecht, Body Maß Index, Alter bei Diagnose, Krankheitsdauer, Alter, Alter bei Diagnose (Vienna), Lokalisation, Krankheitsverhalten, immunsuppressive Therapie, Operation wegen MC, Komplikationen (Fisteln, Stenosen Abszesse), extraintestinale Manifestationen sowie eine positive Familienanamnese untersucht. Das Kollektiv umfasste die 201 M. Crohn-Patienten (siehe Tabelle 18). Das kombinierte Vorhandensein der drei Varianten in der M. Crohn Gruppe lag bei 36,8%. Es gab keinen signifikanten Unterschied in ihrem Vorhandensein zwischen der AlaAla Wildtyp Gruppe und den Patienten, die das Val Allel tragen.

Geschlecht

Die Untergruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Geschlechts auf: 38,6% (17 von 44) aus der *CXCL16*-/*NOD2*- Gruppe, 48,2% (40 von 83) aus der *CXCL16*+/*NOD2*- Gruppe und 43,1% (22 von 51) aus der *CXCL16*+/*NOD2*+ Gruppe waren männlich. Interessanterweise waren 60,9% (14 von 23) in der *CXCL16*-/*NOD2*+ Gruppe männlich.

Body Maß Index

Auch in Bezug auf den Body Maß Index (BMI) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Untergruppen nachgewiesen werden. Die *CXCL16-/NOD2-* Gruppe zeigte einen BMI von $23,2 \pm 4,4$ kg/m² (SW = 17-40), die *CXCL16-/NOD2+* Gruppe einen Wert von $23,3 \pm 3,6$ kg/m² (SW = 18-32), die *CXCL16+/NOD2-* Gruppe $23,6 \pm 4,3$ kg/m² (SW = 16-37) und die *CXCL16+/NOD2+* Gruppe einen BMI von $22,6 \pm 3,3$ kg/m² (SW = 17-31).

Alter bei Diagnose

Das Alter bei Diagnosestellung zeigte keine nennenswerten Diskrepanzen: man unterschied $28,1 \pm 10,7$ Jahre (SW = 12-58) für *CXCL16-/NOD2-*, $30,9 \pm 14,3$ Jahre (SW = 15-66) für *CXCL16-/NOD2+*, $29,0 \pm 12,2$ Jahre (SW = 13-71) für *CXCL16+/NOD2-* sowie $26,1 \pm 11,1$ Jahre (SW = 7-61) für *CXCL16+/NOD2+*.

Krankheitsdauer

Betrachtet man die Dauer der Erkrankung wurden keine nennenswerten Unterschiede zwischen den vier Gruppen festgestellt. Es fanden sich $13,2 \pm 8,6$ Jahre (SW = 1-32) in der *CXCL16-/NOD2-* Gruppe, $10,8 \pm 8,1$ Jahre (SW = 2-34) in der *CXCL16-/NOD2+* Gruppe, $10,9 \pm 7,0$ Jahre (SW = 2-32) in der *CXCL16+/NOD2-* Gruppe sowie $13,3 \pm 9,6$ Jahre (SW = 3-43) in der *CXCL16+/NOD2+* Gruppe.

Alter

Das Alter der erkrankten Patienten zeigte keine signifikanten Diskrepanzen: in der *CXCL16-/NOD2-* Gruppe waren die Patienten $41,3 \pm 11,5$ Jahre (SW = 19-69) alt, in der *CXCL16-/NOD2+* Gruppe $41,8 \pm 13,3$ Jahre (SW = 20-68), in der *CXCL16+/NOD2-* Gruppe $39,9 \pm$

12,1 Jahre (SW = 18-75) sowie in der *CXCL16+/NOD2+* Gruppe $39,4 \pm 11,5$ Jahre (SW = 19-71).

Alter bei Diagnose (Vienna A)

In den beiden Gruppen Vienna A1 (≤ 40 Jahre) und Vienna A2 (> 40 Jahre) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der A1 Gruppe waren 86,4% (38 von 44) der *CXCL16-/NOD2-* Träger, 83,1% (69 von 83) der *CXCL16+/NOD2-* Träger und 86,3% (44 von 51) der *CXCL16+/NOD2+* Träger. Die A2 Gruppe bestand aus 13,6% (6 von 44) der *CXCL16-/NOD2-* Träger, 16,9% (14 von 83) der *CXCL16+/NOD2-* Träger und 13,7% (7 von 51) der *CXCL16+/NOD2+* Träger. Interessanterweise war der Prozentsatz der *CXCL16-/NOD2+* Träger für A1 etwas niedriger (73,9%; 17 von 23) und für A2 etwas erhöht (26,1%; 6 von 23).

Lokalisation

In der *CXCL16+/NOD2+* Gruppe konnte mit 76,4% die höchste Rate an ilealem Befall (L1: 13,7% + L3: 62,7%) im Vergleich zu *CXCL16-/NOD2-* mit 47,7 % (L1: 4,5% + L3: 43,2%), *CXCL16-/NOD2+* mit 60,9% (L1: 17,4% + L3: 43,5%) und *CXCL16+/NOD2-* mit 56,6% (L1: 3,6% + L3: 53,0%) nachgewiesen werden. In der *CXCL16+/NOD2+* Gruppe konnte auch die niedrigste Anzahl (11,8%) an Manifestationen im Kolon (L2) aufgefunden werden im Unterschied zu *CXCL16-/NOD2-* mit 29,5%, *CXCL16-/NOD2+* mit 34,8% und *CXCL16+/NOD2-* mit 16,9%. Der Befall des oberen Gastrointestinaltrakts (L4) zeigte einen kleinen Unterschied zwischen der *CXCL16+/NOD2-* Gruppe mit 26,5% und *CXCL16-/NOD-* mit 22,7%, *CXCL16-/NOD2+* mit 4,3% und *CXCL16+/NOD2+* mit 11,8%. Der Wert erreichte jedoch kein signifikantes Niveau.

Krankheitsverhalten

Die *CXCL16+/NOD2+* Gruppe zeigte im Vergleich zur *CXCL16-/NOD2+* Gruppe eine höhere Anzahl eines stenosierenden oder penetrierenden Phänotyps (B2 + B3: 86,3% vs 60,8%). Die *CXCL16-/NOD2-* Gruppe wies interessanterweise 88,7% und die *CXCL16+/NOD2-* Gruppe 77,1% auf. Beim nicht-stenosierenden, nicht-penetrierenden Verhalten (B1) war die Verteilung folgendermaßen: *CXCL16-/NOD2-*: 11,4%, *CXCL16-/NOD2+*: 39,1%, *CXCL16+/NOD2-*: 22,9% und *CXCL16+/NOD2+*: 13,7%.

Immunsuppressive Therapie

Bei der Verwendung immunsuppressiver Medikamente konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den vier Untergruppen festgestellt werden. Die Verwendung in der *CXCL16-/NOD2-* Gruppe war etwas höher (93,2%) im Vergleich zu der *CXCL16-/NOD2+* Gruppe mit 73,9%, der *CXCL16+/NOD2-* Gruppe mit 80,7% und der *CXCL16+/NOD2+* Gruppe mit 72,5%.

Operation wegen MC

Bei den Operationsraten wurde keine nennenswerte Diskrepanz in den vier Gruppen nachgewiesen: 30 von 44 Operationen (68,2%) für *CXCL16-/NOD2-*, 11 von 23 Operationen (47,8%) für *CXCL16-/NOD2+*, 41 von 83 Operationen (49,4%) für *CXCL16+/NOD2-* und 37 von 51 Operationen (72,5%) für *CXCL16+/NOD2+*.

Fisteln, Stenosen, Abszesse

Die *CXCL16+/NOD2+* Gruppe zeigte eine höhere Anzahl (78,4%) an stenosierenden Komplikationen im Vergleich zu der *CXCL16-/NOD2+* Gruppe (47,8%) (siehe Abbildung 21). Bei der *CXCL16-/NOD2-* Gruppe lag der Wert für Stenosen bei 77,3% und für die

CXCL16+/NOD2- Gruppe bei 65,1%. Bei der Fistel- und Abszessbildung konnten keine nennenswerten Unterschiede in den vier Gruppen gezeigt werden. Die Gruppe *CXCL16-/NOD2-* zeigte 61,4% und 47,7%, die *CXCL16-/NOD2+* Gruppe 47,8% und 30,4%, die Gruppe *CXCL16+/NOD2-* 49,4% und 34,9% sowie die *CXCL16+/NOD2+* Gruppe 60,8% und 37,2%.

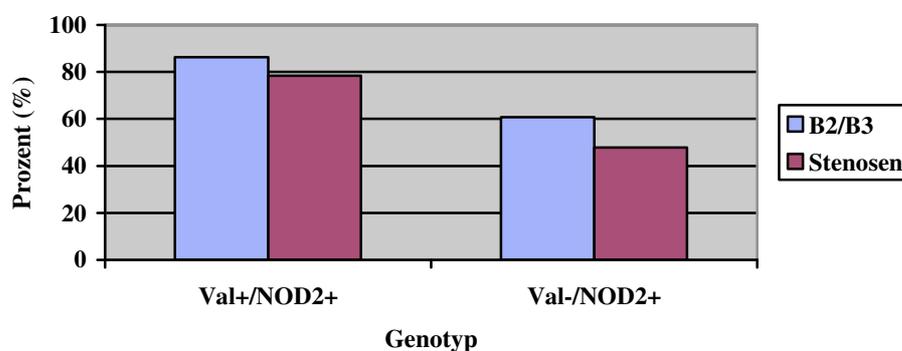


Abbildung 21: Der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus erhöht bei gleichzeitigem Auftreten mit den *CARD15*-Mutationen das Risiko für stenotische Komplikationen.

($p = 0,030$ für Vienna B2/B3 vs B1; OR 4,04; CI 1,27-12,85 vs Val-/NOD2+; $p = 0,014$ für Stenosen; OR 3,97; CI 1,38-11,40 vs Val-/NOD2+; OR = odds ratio; CI = confidence interval)

Extraintestinale Manifestationen

Interessanterweise konnte die höchste Rate an extraintestinalen Manifestationen bei der *CXCL16-/NOD2-* Gruppe gefunden werden (86,4%) im Unterschied zu *CXCL16-/NOD2+* mit 69,6%, *CXCL16+/NOD2-* mit 73,5% und *CXCL16+/NOD2+* mit 62,7%.

Positive Familienanamnese

Auch bei der Familienanamnese wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen festgestellt. Die prozentuale Aufteilung war folgendermaßen: 9,1% für die *CXCL16-/NOD2-* Gruppe, 17,4% für die *CXCL16-/NOD2+* Gruppe, 8,4% für *CXCL16+/NOD2-* sowie 19,6% für *CXCL16+/NOD2+*.

Zusammenfassung der kombinierten Genotyp-Phänotyp-Analyse

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass das kombinierte Vorhandensein des Val-Allels des *CXCL16*-Polymorphismus und der *NOD2/CARD15*-Varianten ein stenosierendes/penetrierendes Verhalten und stenosierende Komplikationen beinhaltet (siehe Tabelle 18). Analysiert man die demographischen Charakteristika, so zeigten sich bei der Genotyp-Phänotyp-Analyse in den vier Untergruppen (*CXCL16-/NOD2-*, *CXCL16-/NOD2+*, *CXCL16+/NOD2-*, *CXCL16+/NOD2+*) keine Unterschiede im Geschlecht, dem Body Maß Index, dem Alter bei Diagnose, der Krankheitsdauer, dem Alter, der immunsuppressiven Therapie, den OP-Raten sowie der Familienanamnese. Vergleicht man jedoch die M. Crohn-Patienten, die beide Val-Allele und nur eines der *NOD2/CARD15*-Hauptmutationen tragen (*CXCL16+/NOD2+*) mit den Patienten, die nur eine *NOD2/CARD15*-Variante tragen (*CXCL16-/NOD2+*), konnte eine signifikant höhere Anzahl eines stenosierenden oder penetrierenden Phänotyps (Vienna B2/B3 vs B1; $p = 0,030$) sowie stenosierender Komplikationen (78,4%; $p = 0,014$) in der *CXCL16+/NOD2+*-Gruppe im Vergleich mit der *CXCL16-/NOD2+*-Gruppe, gefunden werden. Zusätzlich zeigte die *CXCL16+/NOD2+* Gruppe die höchste Rate an ilealem Befall (L1 + L3: 76,4%) und die niedrigste Anzahl an Manifestationen im Kolon (11,8%; $p = 0,027$) verglichen mit der *CXCL16-/NOD2+* Gruppe. Interessanterweise wurde die höchste Zahl an extraintestinalen Manifestationen in der *CXCL16-/NOD2-* Gruppe gefunden (86,4%; $p = 0,011$)

	(1) <i>CXCL16- / NOD2-</i> (n=44)	(2) <i>CXCL16- / NOD2+</i> (n=23)	(3) <i>CXCL16+ / NOD2-</i> (n=83)	(4) <i>CXCL16+ / NOD2+</i> (n=51)
Männlich n= (%)	17 (38,6%)	14 (60,9%)	40 (48,2%)	22 (43,1%)
Body Maß Index (kg/m ²)				
Mittelwert ± SA	23,2 ± 4,4	23,3 ± 3,6	23,6 ± 4,3	22,6 ± 3,3
Spannweite	17-40	18-32	16-37	17-31
Alter bei Diagnose (Jahre)				
Mittelwert ± SA	28,1 ± 10,7	30,9 ± 14,3	29,0 ± 12,2	26,1 ± 11,1
Spannweite	12-58	15-66	13-71	7-61
Krankheitsdauer (Jahre)				
Mittelwert ± SA	13,2 ± 8,6	10,8 ± 8,1	10,9 ± 7,0	13,3 ± 9,6
Spannweite	1-32	2-34	2-32	3-43
Alter (Jahre)				
Mittelwert ± SA	41,3 ± 11,5	41,8 ± 13,3	39,9 ± 12,1	39,4 ± 11,5
Spannweite	19-69	20-68	18-75	19-71
Alter bei Diagnose (Vienna A)				
< 40 Jahre (A1)	38 (86,4%)	17 (73,9%)	69 (83,1%)	44 (86,3%)
> 40 Jahre (A2)	6 (13,6%)	6 (26,1%)	14 (16,9%)	7 (13,7%)
Lokalisation				
terminales Ileum (L1)	2 (4,5%)	4 (17,4%)	3 (3,6%)	7 (13,7%)
Kolon (L2)	13 (29,5%)	8 (34,8%)	14 (16,9%)	6 (11,8%); p=0,027 vs (2)
Ileokolon (L3)	19 (43,2%)	10 (43,5%)	44 (53,0%)	32 (62,7%)
oberer GIT (L4)	10 (22,7%)	1 (4,3%)	22 (26,5%); p=0,023 vs (2)	6 (11,8%)
Krankheitsverhalten				
nicht-verschließend, nicht-penetrierend (B1)	5 (11,4%)	9 (39,1 %); p=0,012 vs (1)	19 (22,9%)	7 (13,7%); p=0,030 vs (2)
verschließend (B2)	12 (27,3%)	3 (13,0%)	23 (27,7%)	13 (25,5%)
penetrierend (B3)	27 (61,4%)	11 (47,8%)	41 (49,4%)	31 (60,8%)
Immunsuppressive Therapie	41 (93,2%)	17 (73,9%)	67 (80,7%)	37 (72,5%); p=0,014 vs (1)

OP wegen MC	30 (68,2%)	11 (47,8%)	41 (49,4%); p=0,011 vs (4)	37 (72,5%)
Fisteln	27 (61,4%)	11 (47,8%)	41 (49,4%)	31 (60,8%)
Stenosen	34 (77,3%)	11 (47,8%); p=0,027 vs (1)	54 (65,1%)	40 (78,4%); p=0,014 vs (2)
Abszesse	21 (47,7%)	7 (30,4%)	29 (34,9%)	19 (37,2%)
Extraintestinale Manifestationen	38 (86,4%); p=0,011 vs (4)	16 (69,6%)	61 (73,5%)	32 (62,7%)
Positive Familiengeschichte bei CED	4 (9,1%)	4 (17,4%)	7 (8,4%)	10 (19,6%)

Tabelle 18: Assoziation zwischen *CXCL16*, *NOD2/CARD15* Mutation und M. Crohn-Charakteristiken

4. DISKUSSION

Da die Pathogenese von CED nach aktuellem Wissensstand noch nicht in allen Einzelheiten verstanden ist, stellt die Überaktivierung des mukosalen Immunsystems gegenüber luminalen Antigenen bei genetisch vorbelasteten Individuen einen der wesentlichen Pathomechanismen bei CED dar (Podolsky, 2002, Shi et al., 2006). Seit der Erstbeschreibung von *NOD2/CARD15* als erstes Suszeptibilitätsgen bei M. Crohn (Ogura et al., 2001, Hugot et al., 2001) konnten verschiedene Arbeitsgruppen weltweit insbesondere durch genomweite Assoziationsstudien weitere Gen-Varianten wie z.B. *ATG16L1*, *IRGM* und *TLR4*, die bei der Akute-Phase Antwort bei Entzündungen und bakterieller Wirtsabwehr sowie der Autophagie eine Rolle spielen, als phänotypisch bedeutsame Suszeptibilitätsgene bei M. Crohn identifizieren. Die große Rolle der Genetik bei der Pathophysiologie der CED konnte zudem durch die Entdeckung der IL-23/Th17-Entzündungskaskade (Iwakura et al., 2006) und deren genetische Korrelate bei CED (Duerr et al., 2007, Dubinsky et al., 2007, Tremelling et al., 2007) in den letzten Jahren untermauert werden. Basierend auf strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten des Chemokins CX3CL1 (Fraktalkine) und der immunologischen Schlüsselfunktion von CXCL16 bei der T-Zell-vermittelten Immun-Antwort wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert, ob der kürzlich identifizierte *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus, der mit koronarer Herzerkrankung in Verbindung gebracht wird (Lundberg et al., 2005), auch mit CED assoziiert sein könnte. Im Gegensatz zu *CX3CL1* (Fraktalkine), dessen Assoziation mit einem veränderten Krankheitsphänotypen in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde (Brand et al., 2006), wurde der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus hinsichtlich seiner Rolle in der Pathogenese der CED noch nicht untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die Anzahl an heterozygoten AlaVal- und homozygoten ValVal-Trägern nicht signifikant zwischen Patienten mit CED und der gesunden Kontrollgruppe unterscheidet und entsprechend der Hardy-Weinberg-Verteilung auftritt. Somit konnte der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus nicht als ein CED-Suszeptibilitätsgen identifiziert werden. Dies wird durch neueste genomweite Assoziationsstudien bestätigt (Barrett et al., 2008). Interessanterweise konnte jedoch bei homozygoten Trägern des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus ein signifikant jüngeres Alter zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns von M. Crohn sowie eine ileale Beteiligung verglichen mit dem Wildtyp AlaAla beobachtet werden. Dies deutet auf eine signifikante Rolle des CXCL16-Signalwegs in der intestinalen Entzündung bei M. Crohn hin, die in weiteren funktionellen Studien untersucht wird. Die höhere Anzahl von ValVal-Trägern mit ilealer Beteiligung und strikturierendem/penetrierendem Krankheitsverlauf könnte bedeuten, dass dieser Aminosäureaustausch zu einer Beeinträchtigung der Erkennung von intestinalen Bakterien führt. Das membrangebundene CXCL16 vermittelt die Adhäsion und die Phagozytose von gram-positiven und gram-negativen Bakterien durch die menschlichen Antigen-präsentierenden Zellen (Shimaoka et al., 2003). Daher ist anzunehmen, dass CXCL16 eine wichtige Rolle bei der erleichterten Aufnahme von verschiedenen intestinalen Pathogenen spielt. Zusätzlich vermittelt CXCL16 die Chemotaxis von T-Zellen und NKT-Zellen und ist an der lymphozytären Unterteilung im GALT beteiligt (Hase et al., 2006). Die phänotypischen Konsequenzen des *CXCL16*-Polymorphismus für die M. Crohn-Patienten stimmen mit früheren Beobachtungen überein, in denen Genvarianten verschiedener Proteine mit Defiziten bei der bakteriellen Erkennung assoziiert sind (Brand et al., 2005, Brand et al., 2006, Seiderer et al., 2006, Thalmaier et al., 2006) und eine überwiegend ileale Krankheitsmanifestation voraussagen, die durch den 10^3 bis 10^4 fachen Anstieg der

mikrobiellen Dichte vom terminalen Ileum bis zum Kolon ausgelöst wird (Savage, 1977). Interessanterweise konnte vor kurzem gezeigt werden, dass der p.Thr280Met-Polymorphismus am Rezeptor (*CX3CR1*) des strukturell ähnlichen Chemokins CX3CL1 (Fraktalkine) auch mit einer vorwiegend ilealen Krankheitsmanifestation und einem verschließenden Phänotyp assoziiert ist (Brand et al., 2006). Ein möglicher Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse könnte daher sein, dass der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus zu einer beeinträchtigten Erkennung der Bakterien führt und hierdurch die phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen Trägern dieses Polymorphismus und denen der 1007fs *NOD2/CARD15*-Varianten oder des p.Thr280Met *CX3CR1*-Austauschs zu erklären sind (Brand et al., 2006, Seiderer et al., 2006).

Das *NOD2/CARD15*-Gen wird bis heute als eines der wichtigsten Suszeptibilitätsgene für M. Crohn angesehen (Hampe et al., 2001, Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001, Hugot, 2006). In unserer Patientenkohorte konnte bei homozygoten Trägern der 1007fs Mutation des *NOD2/CARD15*-Gens eine deutliche Assoziation mit frühzeitigem Krankheitsbeginn, signifikant häufigerem Befall des terminalen Ileums sowie stenotische Komplikationen nachgewiesen werden (Seiderer et al., 2006). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch untersucht, ob das gemeinsame Vorhandensein eines der drei wichtigsten *NOD2/CARD15*-Varianten (p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008) mit dem *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus zu einer Verstärkung des ilealen Phänotyps führt. Hierbei fand sich eine starke Assoziation eines strikturierenden/penetrierenden Krankheitsverlauf und stenosierender Komplikationen für die Träger beider Val Allele und der *NOD2/CARD15*-Mutationen. Ein möglicher funktioneller Erklärungsansatz hierfür könnte die Störung der intestinalen epithelialen Wiederaufnahme, die durch Chemokine, eingeschlossen CXCL16 (Brand et al., 2002), vermittelt wird, sein.

Die funktionellen Konsequenzen des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus sind bisher noch nicht geklärt. Das membrangebundene *CXCL16* wird für die chemotaktische Aktivität proteolytisch gespalten. Dies ist ein Prozess, der durch verschiedene Proteasen, wie z. B. die disintegrin-like Metallopeptidase ADAM10 und das Tumor Nekrose Faktor-Alpha Converting Enzym (TACE), vermittelt wird (Wilbanks et al., 2001, Abel et al., 2004). Aufgrund der Lokalisation des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus, codiert auf dem Exon 4, innerhalb der Spacer Region zwischen der Chemokinregion und der transmembranen Region, die an der Chemokin-Spaltung durch TACE beteiligt sind, sind weitere Studien über den Einfluss dieses Polymorphismus auf die *CXCL16* Spaltung und Funktion *in vivo* von großem Interesse.

Im Gegensatz zu M. Crohn wurde keine signifikante Assoziation des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus und einem Colitis ulcerosa-Phänotypen gefunden. Dies steht in Übereinstimmung mit der immunologischen Datenlage, die zeigen konnte, dass der *CXCL16* Rezeptor CXCR6 ein weiterer Marker der Th1-vermittelten Entzündungsreaktion ist (Kim et al., 2001). Während M. Crohn eine vorwiegend durch Th1 ausgelöste Entzündungsreaktion ist, ist Colitis ulcerosa eine modifizierte Th2-vermittelte Reaktion (Bouma et al., 2003). Diese Ergebnisse unterstützen deshalb die Bedeutung des *CXCL16*-CXCR6 Liganden-Rezeptor-Systems bei der Th1-vermittelten Entzündungsreaktion.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit analysierte in Form einer detaillierten Genotyp-Phänotyp-Analyse erstmals die Rolle des *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Genomische DNA von 574 Individuen (M. Crohn: n=201, Colitis ulcerosa: n=164, gesunde Kontrollgruppe: n=209) wurde hierzu auf das Vorhandensein des p.Ala181Val-Polymorphismus, kodiert im Exon 4 des *CXCL16*-Gens, untersucht. Zusätzlich wurde der Genotyp der drei *NOD2/CARD15*-Varianten p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 analysiert.

Zusammenfassend wurde der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus mit einer ähnlichen Häufigkeit bei Patienten mit CED und den gesunden Kontrollpersonen beobachtet und konnte daher nicht als signifikantes CED-Suszeptibilitätsgen identifiziert werden. Die Genotyp-Phänotyp-Analyse zeigte jedoch, dass der *CXCL16* p.Ala181Val-Polymorphismus bei homozygotem Vorliegen (ValVal-Genotyp) mit einem schwereren Phänotyp der Krankheit M. Crohn in Form eines frühen Krankheitsbeginns ($p = 0,016$) mit ilealer Beteiligung ($p = 0,024$) assoziiert ist. Zudem zeigte sich beim zusätzlichen Vorhandensein einer *NOD2/CARD15*-Variante ein erhöhtes Risiko des Auftretens von Stenosen. Bei Patienten, die nur ein Val-Allel sowie eine *NOD2/CARD15*-Variante tragen, wurden im Vergleich zu Patienten, welche nur *NOD2/CARD15*-Varianten tragen eine höhere Häufigkeit eines strikturierenden oder penetrierenden Phänotyps, sowie stenosierende Komplikationen festgestellt ($p = 0,014$). Die Untersuchung der Patienten mit C. ulcerosa zeigte keinen signifikanten Einfluss der *CXCL16*-Gen-Region auf Krankheitssuszeptibilität und Phänotyp. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Genvarianten der *CXCL16*-Region den phänotypischen Schweregrad der Erkrankung M. Crohn beeinflussen und in der Identifikation

potentieller Risikopatienten mit einer erhöhten Inzidenz von ilealem Befall und Stenosen von Bedeutung sein können. Dies legt eine Schlüsselfunktion von CXCL16 in der intestinalen Immunantwort und chronischen Entzündung bei CED nahe, die in weiteren funktionellen Studien untersucht werden soll. Es ist zu erwarten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von CED und der Identifikation möglicher therapeutischer Angriffspunkte beitragen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A. The transmembran CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* 2004; 172: 6362-72.
2. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn`s disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 679-88.
3. Agace WW, Amara A, Roberts AI, Pablos JL, Thelen S, Uguccioni M, Li XY, Marsal J, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Ebert EC, Moser B, Parker CM. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 2000; 10: 325-328.
4. Agostini C, Cabrelle A, Calabrese F, Bortoli M, Scquizzato E, Carraro S, Miorin M, Beghe B, Trentin L, Zambello R, Facco M, Semenzato G. Role for CXCR6 and its ligand CXCL16 in the pathogenesis of T-cell alveolitis in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1290-8.
5. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular

classification of the clinical manifestations of Crohn`s disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854-66.

6. Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Lin XY, Zhou Z, Daly M, Katz S, Levine J, Present D, Gelb B, Desnick R, Mayer L, Silver J. The IBD1 locus for susceptibility to Crohn`s disease has a greater impact in Ashkenazi Jews with early onset disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1127-32.

7. Alawi F. Granulomatous diseases of the oral tissue: differential diagnosis and update. *Dent Clin North Am* 2005; 49: 203-221.

8. Aslanian AM, Charo IF. Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerate atherosclerosis. *Circulation* 2006; 114: 583-90.

9. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 1067-8.

10. Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568.

11. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D,

Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* 2008; 40: 955-62.

12. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-40.

13. Baumgart DC. Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 123-33.

14. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A and Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997; 385: 640-4.

15. Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Kontinen YT. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 425-31.

16. Bork K, Burgdorf W, Hoede N. Mundschleimhaut- und Lippenkrankheiten. Klinik und Therapie. Atlas und Handbuch. *Schattauer Verlag* 2008; 3. Auflage: 264-266, 405-407.

17. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-33.
18. Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn`s disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease phenotype. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 99-106.
19. Brand S, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Expression of a novel chemokine ligand-receptor pair in intestinal epithelial cells (IEC): CXCL16 induced signals regulate epithelial restitution (abstract). *Gastroenterology* 2002; 122: A73.
20. Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crispin A, Göke H, Lohse P, Ochsenkühn T. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn´s disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 645-52.
21. Brand S, Olszak T, Beigel F, Diebold J, Otte JM, Eichorst ST, Göke B, Dambacher J, Cell differentiations dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 2006; 97: 709-23.

22. Brand S, Sakaguchi T, Gu X, Colgan SP, Reinecker HC. Fractalkine-mediated signals regulate cell-survival and immune-modulatory responses in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002; 122: 166-177.
23. Brand S, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichorst ST. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005; 310: 117-30.
24. Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger S, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease phenotyp. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 99-106.
25. Brand S. Signaltransduktion und Funktionen intestinal exprimierter Rezeptoren für Chemokine und IL-10-ähnliche Zytokine. *Habilitationsschrift LMU München* 2005: 4-7.
26. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009; 58: 1152-1167.
27. Brandzaeg P. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and periodontal disease have similar immunopathogeneses? *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 235-43.

28. Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 1-6.
29. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7.
30. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005; 54: 1182-93.
31. Caye-Thomasen P, Nielsen TR, Petri NE. Primary oral manifestation of Crohn's disease. *Ugeskr Laeger* 2002; 164: 3363-4.
32. Charo IF and Ransohoff R. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621.
33. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7502-7.

34. Coenen C, Börsch G, Müller KM, Fabry H. Oral inflammatory changes as an initial manifestation of Crohn's disease antedating abdominal diagnosis. Report of a case. *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 548-52.
35. Crohn DB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932; 99: 1323-1329.
36. Cummings JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barrett JC, Beckly J, Geremia A, Hancock L, Guo C, Ahmad T, Cardon LR, Jewell DP. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 941-6.
37. Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, McPherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 1998; 115: 1066-71.
38. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations on the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 867-74.

39. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. Increased interleukin-8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38: 216-222.
40. Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, Sisic Z, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Konrad A, Tillack C, Otte JM, Diebold J, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Brand S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF)-173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 71-82.
41. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferrì F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7227-36.
42. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, Belaiche J, Vermeire S, Farwell L, Goris A, Libioulle C, Jani N, Dassopoulos T, Bromfield GP, Dubois B, Cho JH, Brant SR, Duerr RH, Yang H, Rotter JJ, Silverberg MS, Steinhardt AH, Daly MJ, Podolsky DK, Louis E, Hafler DA, Rioux JD; Quebec IBD Genetics Consortium; NIDDK IBD Genetics Consortium. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 2007; 8: 387-97.
43. Diegelmann J, Seiderer J, Niess JH, Haller D, Göke B, Reinecker HC, Brand S. Expression and regulation of the chemokine CXCL16 in Crohn's disease and models of

intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2010. Online First May 10, 2010; DOI: 10.1002/ibd.21306.

44. Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, Wrobel I, Katzir L, Quiros A, Dutridge D, Wahbeh G, Silber G, Bahar R, Mengesha E, Targan SR, Taylor KD, Rotter JI. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 511-5

45. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolea DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gen. *Science* 2006; 314: 1461-3.

46. Durst J, Rohen J. Bauchchirurgie: Operationslehre mit topographischer Anatomie. *Schattauer Verlag* 1998; 134-135.

47. Dwinell MB, Eckmann L, Leopard JD, Varki NM, Kagnoff MF. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1999; 117: 359-67.

48. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2393-404.

49. Ehlers MR, Schwager SL, Scholle RR. Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence. *Biochemistry* 1996; 35: 9549-59.
50. Engel LD, Pasquinelli KL, Leone SA, Moncla BJ, Nielson KD, Rabinovitch PS. Abnormal lymphocyte profiles and leukotriene B4 status in a patient with Crohn`s disease and severe periodontitis. *J Periodontol* 1988; 59: 841-847.
51. Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 1980; 19: 271-7.
52. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
53. Folwaczny M, Glas J, Török 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.
54. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, Limbersky O, Folwaczny C. Polymorphism of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 530-4.
55. Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, Yonehara S. Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and

oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004; 173: 1620-7.

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

57. Glas J, Török HP, Tonenchi L, Kasper J, Schiemann U, Müller-Myhsok B, Folwaczny M, Folwaczny C. Association of polymorphisms in the interleukin-18 gene in patients with Crohn`s disease depending on the CARD15/NOD2 genotyp. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 1031-7.

58. Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, Wetzke M, Roeske D, Török HP, Tonenchi L, Pfennig S, Haller D, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Mussack T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. 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.

59. Greenstein AJ, Sachar DB, Gibas A, Schrag D, Heimann T, Janowitz HD, Aufses AH Jr. Outcome of toxic dilatation in ulcerative and Crohn`s colitis. *J Clin Gastroenterol* 1985; 7: 137-43.

60. Göke B, Beglinger C (Hrsg.). Gastroenterologie systematisch. *UNI-MED*, Bremen 2007; 2. Auflage.

61. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999a; 64: 808-16.

62. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn`s disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357: 1925-8.

63. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Brigs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics* 2007; 39: 207-11.

64. Hara T, Katakai T, Lee JH, Nambu Y, Nakajima-Nagata N, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node

fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion. *Int Immunol* 2006; 18: 301-11.

65. Harty S, Fleming P, Rowland M, Crushell E, McDermott M, Drumm B, Bourke B. A prospective study of the oral manifestation of Crohn`s disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 886-91.

66. Hase K, Murakami T, Takatsu H, Shimaoka T, Iimura M, Hamura K, Kawano K, Ohshima S, Chihara R, Itoh K, Yonehara S, Ohno H. The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT. *J Immunol* 2006; 176: 43-51.

67. Heydtmann M, Lalor PF, Eksteen JA, Hubscher SG, Briskin M, Adams DH. CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver. *J Immunol* 2005; 174: 1055-62.

68. Holden W, Orchard T, Wordsworth P. Enteropathic arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29: 513-30, viii.

69. Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J* 1997; 321: 265-279.

70. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-3.
71. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
72. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 2003; 362: 2012-5.
73. Hugot JP. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1072: 9-18.
74. Hutchinson R, Tyrell PN, Kumar D, Dunn JA, Li JK, Allan RN. Pathogenesis of gall stones in Crohn's disease: an alternative explanation. *Gut* 1994; 35: 94-7.
75. Huthöfer B, Driemel O, Reichert TE. Differentialdiagnose von ulzerierenden Mundschleimhautläsionen: Orale Manifestation eines Morbus Crohn. *ZM* 2006; 96: 50-51.

76. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem.* 1999; 274: 14560-7.
77. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116: 1218-22.
78. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-95.
79. Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: 710-719.
80. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Carcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 2008; 28: 559-70.
81. Jacobsen BA. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 601-6.

82. Jiang X, Shimaoka T, Kojo S, Harada M, Watarai H, Wakao H, Ohkohchi N, Yonehara S, Taniguchi M, Seino K. Cutting edge: Critical role of CXCL16/CXCR6 in NKT cell trafficking in allograft tolerance. *J Immunol* 2005; 175: 2051-5.
83. Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, Yoshie H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 398-402.
84. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn`s disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2925-31. Epub 2008 Sep 4.
85. Keshavarzian A, Fusunyan RD, Jacyno M, Winship D, MacDermott RP, Sanderson IR. Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 704-712.
86. Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest* 2001; 107: 595-601.
87. Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 12099-104.

88. 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.
89. Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992; 102: 1940-8.
90. Laine ML, Murillo LS, Morre SA, Winkel EG, Pena AS, van Winkelhoff AJ. CARD15 gene mutations in periodontitis. *J Clin Periodontol* 2004; 30: 890-3.
91. Lakatos L, Lakatos PL. Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Orv Hetil* 2007; 148: 223-8.
92. Lamster I, Sonis S, Hannigan A, Kolodkin A. An association between Crohn's disease, periodontal disease and enhanced neutrophil function. *J Periodontol* 1978; 49: 475-479.
93. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989; 170: 2-6.
94. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP, EPWG-IBD Group, EPIMAD Group,

GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-57.

95. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-17.

96. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn`s disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001; 49: 777-82.

97. Lundberg GA, Kellin A, Samnegard A, Lundman P, Tornvall P, Dimmeler S, Zeiher AM, Hamsten A, Hansson GK, Eriksson P. Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene. *J Intern Med* 2005; 25: 415-422.

98. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445.

99. Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JJ, Yang H. A genomewide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn`s disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 271-8.

100. Mac Dermott RP. Chemokines in the inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1999; 19: 266-72.

101. Massey DC, Parkes M. Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. *Autophagy* 2007; 3: 649-51.
102. Mathew CG. New links to the pathogenesis of Crohn's disease provided by genome-wide association scans. *Nat Rev Genet* 2007.
103. Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 2000; 1: 298-304.
104. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissue JA, Mueller C. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 1994; 144: 997-1007.
105. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, Rankin GB, Brooks RK. Clinical features and natural history of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1979; 77: 898-906.
106. Minami M, Kume N, Shimaoka T, Kataoka H, Hayashida K, Akiyama Y, Nagata I, Ando K, Nobuyoshi M, Hanyuu M, Komeda M, Yonehara S, Kita T. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1796-800.
107. Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, Mac Dermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and

endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 2000; 164: 3368-76.

108. Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 227-9.

109. Nanki T, Shimaoka T, Hayashida K, Taniguchi K, Yonehara S, Miyasaka N. Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3004-14.

110. Nattermann Jacob. Entry Inhibitoren, 2008, 11-16, Springer Link, Springer Berlin Heidelberg.

111. Newman B, Silverberg MS, Gu X, Zhang Q, Lazaro A, Steinhart AH, Greenberg GR, Griffiths AM, McLeod RS, Cohen Z, Fernandez-Vina M, Amos CI, Siminovitch K. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 306-15.

112. Newman B and Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005b; 21: 401-7.

113. Newman WG, Zhang Q, Liu X, Amos CI, Siminovitch KA. Genetic variants in IL-23R and ATG16L1 independently predispose to increased susceptibility to Crohn's disease in Canadian population. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 444-7.

114. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; 307: 254-8.
115. Noack B, Görgens H, Hoffmann T, Schackert HK. CARD15 gene variants in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 779-83.
116. Obialo CI, Clayman RV, Matts JP, Fitch LL, Buchwald H, Gillis M, Hruska KA. Pathogenesis of nephrolithiasis post-partial ileal bypass surgery: Case-control study. The POSCH Group. *Kidney Int* 1991; 39: 1249-54.
117. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001b; 411: 603-6.
118. Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet.* 1996; 5: 1679-83.
119. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontal disease. *J Dent Res* 2009; 88: 633-8.

120. Ojha J, Cohen DM, Islam NM, Stewart CM, Katz J, Bhattacharyya I. Gingival involvement in Crohn`s disease. *J Am Dent Assoc* 2007; 138: 1574-81; quiz 1614-5.
121. 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.
122. Ottaviani F, Schindler A, Capaccio P, Petrone M, Bianchi Porro G. New therapy for orolaryngeal manifestations of Crohn`s disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112: 37-9.
123. Palomino-Morales RJ, Oliver J, Gomez-Garcia M, Lopez-Nevot MA, Rodrigo L, Nieto A, Alizadeh BZ, Martin J. Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: a meta-analysis approach. *Genes Immun* 2009; 10: 356-64.
124. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC and Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation (published erratum appears in *Nature* 1997 Sep 4; 389: 100). *Nature* 1997; 387: 611-617.
125. Papadakis KA and Targan SR. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 303-313.
126. Papadakis KA. Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; 4: 83-9.

127. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, Mc Ardle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC, Cardon L, Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007; 39: 830-2.
128. Patel DN, Bailey SR, Gresham JK, Schuchmann DB, Shelhamer JH, Goldstein BJ, Foxwell BM, Stemerman MB, Maranchie JK, Valente AJ, Mummidi S, Chandrasekar B. TLR4-NOX4-AP-1 signaling mediates lipopolysaccharide-induced CXCR6 expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 1113-20.
129. Petrelli EA, McKinley M, Troncale FJ. Ocular manifestations of inflammatory bowel disease. *Ann Ophthalmol* 1982; 14: 356-60.
130. Pittock S, Drumm B, Fleming P, McDermott M, Imrie C, Flint S, Bourke B. The oral cavity in Crohn's disease. *J Pediatr* 2001; 138: 767-71.
131. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-29.
132. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007; 132: 1665-1671.

133. Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 106-115.
134. Rasmussen HH, Fallingborg JF, Mortensen PB, Vyberg M, Tage-Jensen U, Rasmussen SN. Hepatobiliary dysfunction and primary sclerosing cholangitis in patients with Crohn`s disease. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 604-10.
135. Reuter, P. Springer Lexikon, Diagnose und Therapie. *Springer* 2006; 219-221, 1039-1042.
136. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1863-70.
137. Roberts RL, Geary RB, Hollis-Moffatt JE, Miller AL, Reid J, Abkevich V, Timms KM, Gutin A, Lanchbury JS, Merriman TR, Barclay ML, Kennedy MA. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn`s disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2754-61.
138. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928.

139. Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 855-62.
140. Ruocco E, Cuomo A, Salerno R, Ruocco V, Romano M, Baroni A. Crohn`s disease and its mucocutaneous involvement. *Skinmed* 2007; 6: 179-85.
141. Russel RK, Wilson DC, Satsangi J. Unravelling the complex of genetics of inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2004; 89: 598-603.
142. Ruth JH, Haas CS, Park CC, Amin MA, Martinez RJ, Haines GK 3rd, Shahrara S, Campbell PL, Koch AE. CXCL16-mediated cell recruitment to rheumatoid arthritis synovial tissue and murine lymph nodes is dependent upon the MAPK pathway. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 765-78.
143. Sartor RB. Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 Suppl 3: 17-22; discussion 22-3.
144. 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 96-7.
145. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease

provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996b; 14: 199-202.

146. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 107-33.

147. Schaefer AS, Richter GM, Nothnagel M, Manke T, Dommisch H, Jacobs G, Arlt A, Rosenstiel P, Noack B, Groessner-Schreiber B, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S. A genome-wide association study identifies *GLT6D1* as a susceptibility locus for periodontitis. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 553-62

148. Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Hofbauer K, Seiderer J, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Eight novel CARD15 variants detected by DNA sequence analysis of the CARD15 gene in 111 patients with inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 2006; 58: 99-106.

149. Schwartz DA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of fistulizing Crohn`s disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002; 122: 875-80.

150. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, Hofbauer K, Dambacher J, Tillack C, Sackmann M, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn`s disease with

ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1421-32.

151. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, Schnitzler F, Hatz R, Crispin A, Pfennig S, Schoenberg SO, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. 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.

152. Seiderer-Nack J. Suszeptibilitätsgene und deren Bedeutung für Pathogenese und Phänotyp chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. *Habilitationsschrift LMU München* 2008.

153. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dielemann LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5224-31.

154. Shanahan F. Crohn`s disease. *Lancet* 2002; 359: 62-9.

155. Shi D, Das J, Das G. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. *Cell Res* 2006; 16: 70-4.

156. Shimaoka T, Nakayama T, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand

16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol* 2003; 171: 1647-51.

157. Silvennoinen JA, Karttunen TJ, Niemela SE, Manelius JJ, Lehtola JKI. A controlled study of bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37: 71-6.

158. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes J, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Pena AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36.

159. 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.

160. Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, Uchiyama T. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 777-86.

161. Thalmaier D, Dambacher J, Seiderer J, Konrad A, Schachinger V, Pfennig S, Otte JM, Crispin A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Brand S. The +1059 G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and

decreased serum CRP levels in patients with Crohn`s disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1105-15.

162. Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Göke B, Folwaczny C, Müller-Myhsok B, Brand S. 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.

163. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, Nimmo ER, Drummond H, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Bredin F, Berzuini C, Forbes A, Lewis CM, Cardon L, Deloukas P, Jewell D, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 1657-1664.

164. Tsou CL, Haskell CA, Charo IF. Tumor nekrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem* 2001; 276: 44622-6.

165. 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.

166. van der Voort R, van Lieshout AW, Toonen LW, Sloetjes AW, van den Berg WB, Figdor CG, Radstake TR, Adema GJ. Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1381-91.

167. Vermeire S and Rutgeerts P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 2005; 6: 637-45.
168. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, Briskin M. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC and CXC3 chemokines. *J Immunol* 2001; 166: 5145-5154.
169. Wilks, S. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *London Medical Times & Gazette* 1859; 2: 264.
170. Xu H, Xu W, Chu Y, Gong Y, Jiang Z, Xiong S. Involvement of up-regulated CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in endotoxin-induced lethal liver injury via regulation of T-cell recruitment and adhesion. *Infect Immun* 2005; 73: 4007-16.
171. Xu HB, Gong YP, Cheng J, Chu YW, Xiong SD. CXCL16 participates in pathogenesis of immunological liver injury by regulating T-lymphocyte infiltration in liver tissue. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4979-85.
172. Yantiss RK, Odze RD. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. *Histopathology* 2006; 48: 116-32.
173. Zhang H, Massey D, Tremelling M, Parkes M. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *British Medical Bulletin* 2008; 87: 17-30.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATG16L1	autophagy-related 16-like 1
APCs	antigen presenting cells
BMI	Body Maß Index
Bp	Basenpaare
ca	circa
CARD	caspase activating recruitment domain
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CU	Colitis ulcerosa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleid acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DR3	death receptor 3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOXP	forkhead box P3
GALT	gut associated lymphoid tissue
GATA	GATA binding protein
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
IBD	Inflammatory Bowel Disease
ICOS	inducible co-stimulating molecule
ICOSL	ligand for inducible co-stimulatory molecule
IFN	Interferon

IL	Interleukin
IRGM	Immunity-related GTPase family, M
MC	Morbus Crohn
min	Minute
MIP-3 α	Macrophage inflammatory protein 3alpha
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Na	Natrium
NKT	Natürliche Killer Zellen
NOD	Nucleotid binding oligomerization domain
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRR	Pattern recognition receptors
PTGER4	prostaglandin receptor EP4
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotation per minute
RUNX	runt-related transcription factor
SD	Standard Abweichung
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SNP	Single nucleotid polymorphism
sog	sogenannt
STAT	signal transducer and activator of transcription

SW	Spannweite
TACE	Tumor Nekrose Faktor- Alpha Converting Enzym
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
T-bet	T box expressed in T cells
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper cell
TL1A	TNF-like molecule 1A
TLR	Toll-like-receptors
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFRSF 25	TNF receptor superfamily 25
Treg	Regulatory T cell
UV	Ultraviolett
°C	Grad Celcius
z. B.	zum Beispiel

8. ANHANG

Anamnesefragebogen für Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa:

Name

Vorname

Adresse

Datum

1.	Wann sind Sie geboren?
	Wie alt sind Sie?Jahre

2.	Geschlecht	
	Männlich	<input type="checkbox"/>
	Weiblich	<input type="checkbox"/>
Geschlecht		
1=Männlich	<input type="checkbox"/>	
2=Weiblich	<input type="checkbox"/>	

3.	Wie groß sind Sie? cm
	Wie viel wiegen Sie? kg
Größe cm	BMI
Gewicht kg	

4.	Wie alt waren Sie, als das erste Mal bei Ihnen M. Crohn oder Colitis ulcerosa diagnostiziert wurde? Jahre
	Seit wie langer Zeit leiden Sie unter dieser Krankheit? Jahre
Geburtsdatum	
Alter Jahre	
1=0-16	<input type="checkbox"/>	A1
2=17-40	<input type="checkbox"/>	A2
3=>40	<input type="checkbox"/>	A3

5.	Kreuzen Sie jene an, die Sie mal genommen haben oder zur Zeit noch nehmen:	
	Azathioprin (Imurek, Azafalk, Zytrim, Imuran)	<input type="checkbox"/>
	6-Mercaptopurin (Puri-Nethol, 6-MP)	
	6-Thioguanin (Thioguanin, Lanvis)	
	Methotrexat (Lantarel, MTX, Metex, Farmitrexat)	
	Infliximab (Remicade)	
	Adalimumab (Humira)	
	Certolizumab (Cimzia)	
	Natalizumab (Tysabri)	

Immunsuppressive Medikamente	
0=nein <input type="checkbox"/>	
1=ja <input type="checkbox"/>	
Infliximab	0=nein <input type="checkbox"/> ; 1=ja <input type="checkbox"/>
Humira	0=nein <input type="checkbox"/> ; 1=ja <input type="checkbox"/>
0=keine sonstige Anti-TNF-Therapie	<input type="checkbox"/>
1=Certolizumab	<input type="checkbox"/>
2=Natalizumab	<input type="checkbox"/>

5a. Wann haben Sie das erste Mal eines dieser Medikamente
genommen?

Datum: _____

6.	Wurden Sie schon mal am Magen-Darm-Trakt wg. MC/CU operiert?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Wenn ja, was, wo, wann?	
	Wurde Ihnen der Blinddarm entfernt?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

Chirurgischer Eingriff am Magen-Darm-Trakt	1=Ja <input type="checkbox"/>	0=Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, was, wie, wo, wann?	
Appendektomie	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

7.	Kreuzen Sie an, was Sie <u>haben</u> oder je <u>hatten</u> :		
	Fisteln (allgemein)	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Perianale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Entero-enterale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Entero-vesikale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Entero-vaginale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Entero-kutane	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	

Komplikationen		
Fisteln (allgemein)	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Perianale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Entero-enterale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Entero-vesikale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Entero-vaginale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Entero-kutane	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

8.	Haben oder hatten Sie je Stenosen?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	-Wenn ja, wo? -Wann kam es zur 1. Stenose? -Waren Sie zu diesem Zeitpunkt bereits seit 3 Monaten unter Immunsuppression (siehe Frage 5.)? Datum:..... nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>	
-Wenn ja, wo? -Wann kam es zur 1. Stenose? -Waren Sie zu diesem Zeitpunkt bereits seit 3 Monaten unter Immunsuppression ?		 Datum:..... 0=nein <input type="checkbox"/> 1=ja <input type="checkbox"/>

Stenosen	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, wo?	

9.	Haben Sie Abszesse?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Wenn ja, wo?	
Abszesse		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, wo?		

10.	Leiden Sie unter:		
	Gelenkschmerzen	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Augenbeteiligung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Hautbeteiligung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Nicht-medikamentoes induzierte Gallenkrankheit	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Extraintestinale Manifestationen			
Arthropathien		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Augenbeteiligung		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Hautbeteiligung		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Gallenkrankheit		Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

11.	Rauchen Sie?	
	Ja	<input type="checkbox"/>
	Nein	<input type="checkbox"/>
	Ich habe geraucht	<input type="checkbox"/>
	Wieviele Jahre?.....Wieviele Packung pro Tag?	
Raucheranamnese		
1=Ja		<input type="checkbox"/>
0=Nein		<input type="checkbox"/>
2=Ex		<input type="checkbox"/>
Pack years		

12.	Leidet oder hat jemand in Ihrer Familie an M. Crohn oder Colitis ulcerosa gelitten?	Ja	Nein
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Wenn ja, wer? (Mutter, Vater, ...)	
Familienanamnese		1=Ja <input type="checkbox"/>	0=Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, wer?		

NUR AUSFÜLLEN, WENN SIE AN COLITIS ULCEROSA ERKRANKT SIND:

13.	Welche Abschnitte Ihres Darmes sind bei der Colitis ulcerosa befallen?	
	Proktitis	<input type="checkbox"/>
	Linksseitige Colitis	<input type="checkbox"/>
	Pancolitis	<input type="checkbox"/>
Krankheitslokalisation		
Proktitis	<input type="checkbox"/>	L1
Linksseitige Colitis	<input type="checkbox"/>	L2
Pancolitis	<input type="checkbox"/>	L3

NUR AUSFÜLLEN, WENN SIE AN MORBUS CROHN ERKRANKT SIND:

13.	Welche Abschnitte Ihres Darmes sind beim Morbus Crohn befallen?	
	Terminales Ileum	<input type="checkbox"/>
	Colon	<input type="checkbox"/>
	Ileocolon	<input type="checkbox"/>
	Oberer Magen-Darm-Trakt (bitte genaue Lokalisation)	<input type="checkbox"/>
Krankheitslokalisation		
Terminales Ileum	<input type="checkbox"/>	L1
Colon	<input type="checkbox"/>	L2
Ileocolon	<input type="checkbox"/>	L3
(alleiniger Befall nur L4 ankreuzen) Upper GI	<input type="checkbox"/>	L4

14.	Welche Komplikationen sind bei Ihnen aufgetreten?	
	Keine Stenosen, keine Fisteln	<input type="checkbox"/>
	Stenosen	<input type="checkbox"/>
	Fisteln	<input type="checkbox"/>
	Perianale Fistel	<input type="checkbox"/>
Krankheitsverhalten		
Ø Stenosen, Ø Fisteln	<input type="checkbox"/>	B1
Stenosen	<input type="checkbox"/>	B2
Fisteln	<input type="checkbox"/>	B3
Perianale Fistel	<input type="checkbox"/>	p

9. DANKSAGUNG

Herrn **Prof. Dr. med B. Göke** als Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II am Klinikum Großhadern danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Institut.

Herrn **PD Dr. med Stephan Brand** möchte ich meinen Dank für die hervorragenden Arbeits- und Rahmenbedingungen während der Forschungsarbeiten, für die Bereitstellung des Forschungslabors sowie für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit aussprechen.

Mein größter und allerherzlichster Dank gilt meiner Doktormutter Frau **PD Dr. med Julia Seiderer-Nack** für die kompetente Anleitung, die unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit und der Überlassung dieses Forschungsthemas.

Herrn **Prof. Dr. med Dr. med habil. Peter Lohse** danke ich für die Nutzung seines Forschungslabors.

Danken möchte ich auch Frau **Dr. Julia Diegelmann** für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei allen Laborangelegenheiten während der Forschungszeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Frau **Simone Pfennig**, Frau **Z. Sisic** und Herrn **Benjamin Kühnlein** für ihre Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung.

10. LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Name:	Dorothea Leistner
Geburtstag:	18.11.1981
Geburtsort:	Salzburg/Österreich
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildung

09/1988 – 07/1992	Grundschule Laufen
09/1992 – 06/2001	Rottmayr-Gymnasium Laufen
WS 2001 – WS 2003	Vorklinisches Studium an der LMU München
SS 2004 – SS 2006	Klinisches Studium an der LMU München

Abschlüsse

06/2001	Abitur
09/2002	Vorphysikum
01/2004	Physikum
12/2006	Staatsexamen
01/2007	Approbation zur Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

04/2007 – 03/2009	Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis Dr. Schloßer, Kolbermoor
Seit 04/2009	Zahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dres. Leistner, Laufen

Publikationen

1. Seiderer J, Dambacher J, **Leistner D**, Tillack C, Glas J, Niess JH, Pfennig S, Jürgens M, Müller-Myhsok B, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Reinecker HC, Brand S. Genotype-phenotype analysis of the CXCL16 p.Ala181Val polymorphism in inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2008; 127: 49-55
2. Seiderer J, Dambacher J, **Leistner D**, Niess JH, Pfennig S, Diebold J, Haller D, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Reinecker HC, Brand S. Enhanced expression of the chemokine CXCL16 in intestinal inflammation and association of the CXCL16 pAla181val polymorphism with early disease onset and ileal involvement in patients with CD: Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 19-24th 2007, Washington DC, USA.
Gastroenterology 2007, 132: Suppl. 2-A457