

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

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Analyse der IL-17F-Expression und des *IL17F* p.His161Arg-
Polymorphismus bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen:
Auswirkungen auf die Krankheitssuszeptibilität und den Phänotyp**

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

vorgelegt von
Ira Hummel geb. Elben
aus Kulmbach

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Julia Seiderer-Nack

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Prof. Dr. Matthias Siebeck

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2012

Teile dieser Dissertation wurden vorab mit Genehmigung des Dekanats publiziert:

Seiderer J*, **Elben I***, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Lohse P, Brand S: The role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): Upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(4):437-45.

*geteilte Erstautorenschaft

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	3
1.2	Morbus Crohn	5
1.2.1	Klinik, Befallmuster, Klassifikation und Komplikationen	5
1.2.2	Diagnostik und Therapie	7
1.3	Colitis ulcerosa	10
1.3.1	Klinik, Befallmuster, Klassifikation und Komplikationen	10
1.3.2	Diagnostik und Therapie	11
1.4	Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	12
1.4.1	Einfluss exogener Faktoren	12
1.4.1.1	Mikroorganismen	13
1.4.1.2	Rauchen	14
1.4.1.3	Appendektomie	14
1.4.1.4	Nutritive Faktoren	15
1.4.1.5	Endogene Faktoren	15
1.4.2	Genetische Grundlagen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	16
1.4.2.1	Das <i>NOD2/CARD15</i> -Gen	17
1.4.2.2	Weitere Suszeptibilitätsgene	19
1.5	Bedeutung der IL-23/IL-17-Achse	22
1.5.1	Das Th-17-zelldifferenzierende IL-23	22
1.5.2	Die IL-17-Familie	24
1.5.3	IL-17F und der <i>IL17F</i> p.His161Arg-Polymorphismus	25
1.6	Zielsetzung der Arbeit	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Studienpopulation	28
2.2	Verwendete Materialien und Laborgeräte	28
2.2.1	Extraktion der DNA	28
2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	29
2.2.3	Enzymatischer Verdau	29
2.2.4	Agarosegel-Elektrophorese	30
2.2.5	Extraktion der mRNA	31
2.2.6	Zusammengesetzte Reagenzien	31
2.2.7	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	32
2.3	Quantitative Bestimmung der RNA in den Gewebeproben	33
2.4	Methoden der Genotyp-Phänotyp-Analyse	34
2.4.1	Extraktion der DNA	34
2.4.2	Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.4.3	Sequenzierung der DNA	37
2.4.4	Gelelektrophorese	38
2.4.5	Genotypisierung des <i>IL17F</i> p.His161Arg-Polymorphismus	39
2.4.6	Phänotypisierung der Studienpopulation	41
2.4.7	Genotyp-Phänotyp-Analyse der typischen Krankheitsmerkmale	41

2.5	Analyse bezüglich der Epistasis zwischen <i>IL17F</i>-, <i>IL23R</i>- und <i>NOD2</i>-Genen bei Patienten mit CED	42
2.6	Entnahme von Biopsien der Darmschleimhaut	43
2.7	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Demographische Daten der Studienpopulation	45
3.2	Analyse der Genotypen: Verteilung der Häufigkeit der <i>IL17F</i>-Allele	46
3.3	Vergleich zwischen den Varianten des <i>IL17F</i> p.His161Arg-Polymorphismus und den phänotypischen Merkmalen	47
3.3.1	Genotyp-Phänotyp-Analyse bei Patienten mit M. Crohn	47
3.3.2	Genotyp-Phänotyp-Analyse bei Patienten mit C. ulcerosa	52
3.4	Analyse auf Epistasis zwischen <i>IL17F</i>, <i>IL23R</i> und <i>NOD2</i>-Genen bei Patienten mit CED	56
3.5	Analyse der intestinalen IL-17F-mRNA-Expression bei CED	56
4	Diskussion	59
4.1	Analyse des <i>IL17F</i> p.His161Arg-Polymorphismus bezüglich Krankheitssuszeptibilität von M. Crohn und C. ulcerosa	59
4.2	Analyse des <i>IL17F</i> p.His161Arg-Polymorphismus in Hinblick auf die CED-Krankheitsphänotypen	62
4.3	Epistasis zwischen dem <i>IL17F</i> p.His161Arg-Polymorphismus und den mit CED-assoziierten Genvarianten des <i>IL23R</i>	63
4.4	Analyse der intestinaler IL-17F-mRNA-Expression bei Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa	66
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	73
7	Anhang	95
7.1	Abkürzungsverzeichnis	95
7.2	Fragebogen	100
7.3	Abbildungsverzeichnis	101
7.4	Tabellenverzeichnis	102
8	Danksagung	104
9	Lebenslauf	105

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa (C. ulcerosa), stellen in Schüben verlaufende und exazerbierende Entzündungen des Gastrointestinaltraktes dar, die durch eine Störung der intestinalen Barriere der Darmschleimhaut und eine Dysregulation der mukosalen Immunantwort gekennzeichnet sind [Podolsky a 1991, Podolsky b 2002, Mathew 2008, Hanauer 2006, Baumgart 2007, Danese 2009, Noble 2010, Leshed 2010, Wei 2010].

Die Prävalenz der CED in Europa stieg seit 1960 stetig an und wird aktuell auf 160 von 100.000 Einwohnern (M. Crohn) und 250 von 100.000 Einwohnern (C. ulcerosa) geschätzt [Shivananda 1996, Timmer a, Timmer b]. Der erste ausgeprägte Häufigkeitsgipfel der CED wird im 20.-35. Lebensjahr beobachtet, ein weiterer, weniger ausgeprägter Gipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr [Karlinger 2000] ist umstritten.

Trotz der ausgeprägten Forschung auf dem Gebiet der CED ist die Ätiologie und Pathogenese noch nicht abschließend geklärt. Intensive Forschungen lassen einen genetischen Einfluss vermuten. Grund für diese Annahme stellt ein familiär gehäuftes Auftreten und Vorkommen der Erkrankung bei monozygoten Zwillingen und innerhalb der Ashkenazi-Juden dar [Kurata 1992]. Konkordanzanalysen bei monozygoten Zwillingen ergaben eine 35 %-ige Konkordanz bei M. Crohn und 16 % bei C. ulcerosa [Spehlmann 2008]. Des Weiteren erkrankt die weiße Bevölkerung häufiger als die schwarze oder asiatische Bevölkerung an einer CED. Im Vergleich zu anderen ethnischen Gruppen zeigen die Ashkenazi-Juden eine 2- bis 4-fach erhöhte Prävalenz [Ahmad 2002]. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass neben endogener auch exogene Faktoren an der Entstehung von CED beteiligt sind. Diese Vermutung wird durch epidemiologische Studien gestützt, die ein weltweit unterschiedliches Auftreten der Erkrankung belegen. Die Inzidenz für CED weist ein signifikantes Nord-Süd-Gefälle auf, wobei die höchsten Inzidenzraten in Nord-Amerika und Nord-Europa festgestellt wurden [Loftus 2004].

Durch die beobachteten Unterschiede innerhalb verschiedener Rassen und Ethnien kann auf genetische, vererbte und von der Umgebung sowie dem Lebensstil abhängige Faktoren für die Entstehung von CED geschlossen werden [Karlinger 2000]. Sind Personen entsprechend genetisch prädisponiert, wird die Erkennung der Antigene und die lokale Immunantwort der Darmmukosa dysreguliert, so dass dieser Vorgang zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. Interleukin- (IL-)1 β , IL-23, IL-17, Interferon- (IFN-) γ , Tumornekrosefaktor (TNF-) α führt [Baumgart 2007, Hanauer 2006, Hume 2002, Podolsky 2002].

Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über das multifaktorielle Modell, das die Entstehung von CED erklären könnte. Der bisherige Stand der Forschungsergebnisse wird im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt.

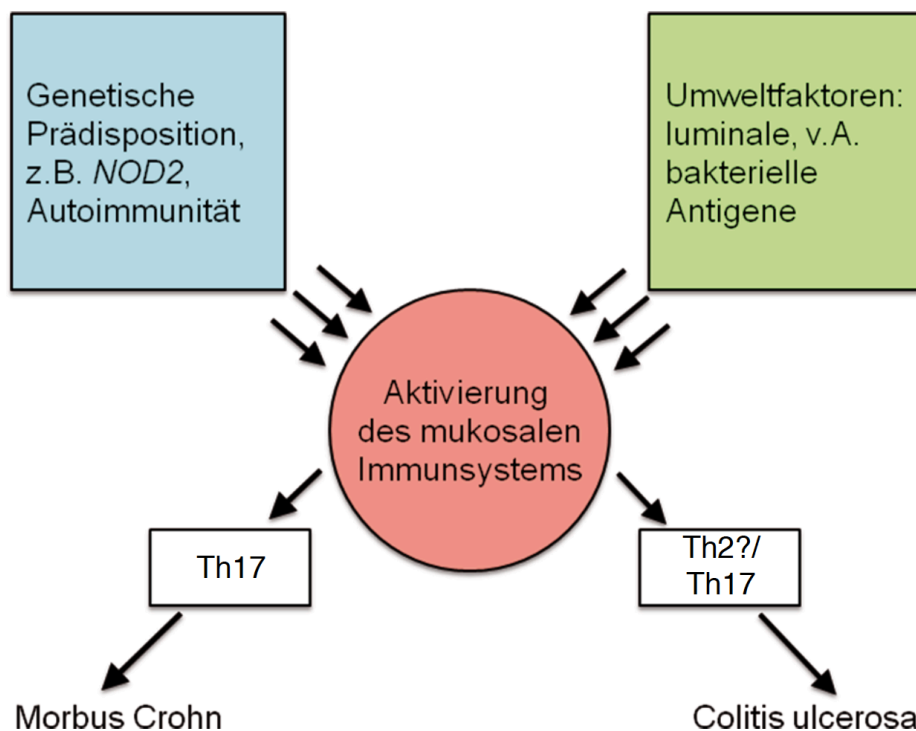


Abbildung 1: Zusammenspiel der Faktoren bei der Pathogenese der CED. Sowohl durch die genetische Prädisposition (z.B. das NOD2-Gen oder durch Autoimmunität verursacht) als auch durch entsprechende Umweltfaktoren (hier vor Allem die luminalen und bakteriellen Antigene) wird das mukosale Immunsystem aktiviert [nach: Hoffmann 2009]. Dies führt bei M. Crohn zu einer chronischen Entzündung, die durch Zytokine über Aktivierung der Th-17-Zellen ausgelöst wird. Zur Entstehung von C. ulcerosa werden zusätzlich vermutlich noch Th-2-zytokinvermittelte Entzündungen ausgelöst.

Im Folgenden wird die Klinik der beiden Krankheitsbilder M. Crohn und C. ulcerosa dargestellt, so wie die typische Lokalisation, die notwendige Diagnostik und Therapie beschrieben.

1.2 Morbus Crohn

1.2.1 Klinik, Befallmuster, Klassifikation und Komplikationen

Das Krankheitsbild des M. Crohn zeichnet sich durch eine diskontinuierliche, in Schüben verlaufende, unspezifische Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes vom Mund bis zum Anus aus. Der Verdauungstrakt kann an unterschiedlichen Stellen betroffen sein. Die Entzündung beginnt häufig schleichend und manifestiert sich klinisch durch Allgemeinbeschwerden wie Gewichtsverlust, Schwäche und Fieber. Die diffusen, vom Befall der entsprechenden Darmsegmente abhängigen Bauchschmerzen sind häufig im rechten Unterbauch lokalisiert und können bei bis zu zwei Drittel der Patienten beobachtet werden [Farmer 1975]. Leitsymptom der Erkrankung stellen Durchfälle dar, die bei Befall des Kolons auftreten und nur in seltenen Fällen blutig sind. Meist sind jedoch okkulte Blutbeimengungen nachweisbar [Sandborn 2002]. Bei etwa 30% der Patienten treten extraintestinale Manifestationen des M. Crohn auf, die im Rahmen der Schübe (z.B. Erythema nodosum), oder davon unabhängig (z.B. Typ-II-Arthritis) auftreten [Greenstein 1976]. Extraintestinal manifestiert sich die Erkrankung bei über 50% aller Patienten unter anderem durch den Befall des peripheren und axialen Skelettsystems. Bei 15% der Patienten kann eine Gelenkbeteiligung beobachtet werden. Des Weiteren leiden die Patienten häufig an HLA-B27-assoziiierter ankylosierender Spondylarthritis (M. Bechterew), oligoartikulärer peripherer Arthritis, Episkleritis, Iridozyklitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum und ulzeröser Stomatitis [Farmer 1975, Juillerat 2007]. Nach langjähriger Krankheitsdauer ist das Risiko, an einem Karzinom des Dünndarmes [Canavan 2006] oder des Dickdarmes [Ekbohm 1990, Bernstein 2001] zu erkranken, erhöht.

Bei M. Crohn ist zu 30% das Ileum und zu 25% das Kolon jeweils isoliert betroffen. Der gemeinsame Befall von Ileum und Kolon beträgt 40%, ein isolierter Befall des oberen Gastrointestinaltraktes oder des Rektums findet nur in 5% aller Fälle statt. Eine rektale Beteiligung, wie bei der C. ulcerosa, ist nicht obligat. Die Entzündung zeichnet sich durch einen disseminierten und segmentalen Befall aus, der sich zum gesunden Gewebe hin scharf abgrenzt und als so genannte „skip lesions“ bezeichnet wird. Im Darm sind Mukosa, Submukosa, Muskularis und Serosa und damit alle Wandschichten befallen. Die Ausbildung epitheloidzelliger Granulome, die durch eine Ansammlung von mehr als fünf transformierter Makrophagen mit oder

ohne Begleitung von mehrkernigen Riesenzellen gebildet werden, stellt einen hohen diagnostischen Stellenwert dar [Shepherd 2002].

Um bei einer allgemeingültigen Klassifizierung den unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen des M. Crohn gerecht zu werden, wurde das Alter der Patienten bei Erstmanifestation (Kategorie A), die unterschiedlichen Lokalisationen der Entzündungen (Kategorie L) und die unterschiedlichen Krankheitsverläufe (Kategorie B) in der Montreal-Klassifikation erfasst [Silverberg 2005]. Fließende Übergänge innerhalb der einzelnen Kategorien sind jedoch nicht ausgeschlossen. Stenosierendes Verhalten beginnt zunächst mit entzündlichen Schwellungen der Schleimhaut. Bei rezidivierenden Krankheitsschüben können diese Entzündungen narbig abheilen und Stenosen bilden, die chirurgisch und endoskopisch behandelt werden müssen. Aufgrund von transmuralen Entzündungen können Fisteln auftreten. Sie finden sich häufig im Perianalbereich, können aber auch zwischen entzündeten Darmschlingen (entero-enteral), zwischen Darm und anderen Organen (entero-kutan, entero-vesikal, entero-vaginal) aufgetreten [Louis 2003]. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Kategorien der Montreal-Klassifikation:

Kategorie A (Alter)	
A1	≤16 Jahre
A2	17-40 Jahre
A3	≥ 40 Jahre
Kategorie L (Lokalisation)	
L1	Terminales Ileum
L2	Kolon
L3	Ileokolon
L4	Oberer Gastrointestinaltrakt (kann mit L1-L3 gemeinsam auftreten)
Kategorie B (Behaviour)	
B1	Entzündlicher, nicht- stenosierender, nicht penetrierender Phänotyp
B2	Stenosierender Phänotyp
B3	Penetrierender/fistulierender Phänotyp

Tabelle 1: Die Klassifikation des M. Crohn anhand der Montreal-Klassifikation [Satsangi 2006]

Im Verlauf der Erkrankung können Komplikationen entstehen. Zunächst treten durch die transmurale Entzündung makroskopisch kleine, aphtenartige, oberflächliche Ulzerationen auf. Mikroskopisch zeichnen sich diese Areale durch eine Entzündung der Krypten aus, die sich zu Kryptenabszessen entwickeln und in Geschwüre übergehen können. Diese Geschwüre wachsen im Verlauf der Erkrankung zu tiefen Fissuren an, die sich als Fistelgänge in das umliegende Gewebe oder in die Haut fortsetzen. Transversale und longitudinale Fistelgänge verschmelzen miteinander und lassen „pflastersteinartig“ gesundes Gewebe stehen. Stenosen entstehen durch entzündliche Konglomerattumoren in Folge einer Abszessbildung. Ein Jahr nach der Krankheitsdiagnose sind 12%, nach fünf Jahren 15%, nach zehn Jahren 21% und nach 20 Jahren 26% der Patienten von Fisteln, Abszessen und intestinalen oder kolorektalen Stenosen betroffen [Hellers 1997].

Kennzeichen eines akuten Schubes sind die Verdickung und das Lymphödem des Mesenteriums durch die transmurale Ausbreitung bis hin zur Fibrose, sowie die Vergrößerung der mesenterialen Lymphknoten. Bei einer Ausweitung der Entzündung lockt die Kryptitis Makrophagen und andere Entzündungszellen an, die in 50 % der Fälle nichtverkäsende Granulome mit vielkernigen Riesenzellen bilden. Granulome und Epitheloidzellen können dann entweder in der Lamina propria, der Submukosa, der Muskularis oder der Subserosa nachgewiesen werden [Mahadeva 2002].

1.2.2 Diagnostik und Therapie

Die Ausprägung des M. Crohn ist durch einen sehr heterogenen Phänotyp gekennzeichnet. Für die Diagnosestellung existiert kein Goldstandard. Häufig kann die Diagnose erst nach der Zusammenstellung und Auswertung der Daten zu Anamnese, Klinik, biochemischen, sonographischen, endoskopischen, histologischen und radiologischen Befunden belegt werden. Die Laborbefunde sind dabei unspezifisch, da sie nur das Entzündungsgeschehen widerspiegeln und nur für eine Verlaufskontrolle verwendbar sind [Mylonaki 2004]. Mit Hilfe der abdominalen Sonographie können Entzündungen im Dünn- und Dickdarm und Abszesse diagnostiziert werden [Pascu 2004, Parente 2003, Maconi 2003]. Durch Doppler-sonographische Flussmessungen kann das Ausmaß entzündlicher Veränderungen im Darm oder ein damit verbundener Therapieerfolg beim Einsatz

von z.B. Steroiden oder Azathioprin besser beurteilt werden [Ludwig 1999, Homann 2005].

Die Endoskopie bietet die Möglichkeit einer spezifischeren Zuordnung [Geboes 1998, Coremans 1984]. Dabei werden bei einer Koloskopie aus dem Dünn- und Dickdarm Biopsien entnommen, deren histologische Befunde hinsichtlich M. Crohn-typischer Merkmale verglichen werden. Dazu zählen der diskontinuierliche transmurale Befall der Schleimhaut und tiefe longitudinale Ulzerationen.

Im MRT des Dünndarms können das „Pflastersteinrelief“, das durch Stenosen im ulzerierten Schleimhaurelief entsteht, entero-enterale Fisteln, „skip lesions“ und Pseudodivertikel nachgewiesen werden [Schreyer 2004]. Des Weiteren ist es möglich, narbige von entzündlichen Veränderungen zu unterscheiden [Di Sabatino 2002].

Eine kausale Therapie des M. Crohn ist im Moment weder durch Medikamente noch durch chirurgische Maßnahmen möglich. Ziel einer medikamentösen Therapie kann jedoch die Verbesserung der klinischen Symptomatik durch Senkung der Entzündungsaktivität darstellen. Bei der Auswahl der Therapie ist die Aktivität der Krankheit, das individuelle Befallmuster, extraintestinale Manifestationen, Nebenwirkungen der eingesetzten Medikamente und bereits bewährte Medikamente zu berücksichtigen. Des Weiteren muss der aktuelle Ernährungszustand und eventuell aufgetretene Mangelzustände mit berücksichtigt werden [Jeejeebhoy 1990, Lochs 2006].

Gemäß der Leitlinien der European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) 2010, sollte eine Langzeittherapie mit dem Ziel, eine klinische Remission und damit das Fehlen klinischer Zeichen und Symptome der aktiven Erkrankung zu erreichen, durchgeführt werden. Die folgenden Ausführungen zur Therapie des M. Crohn orientieren sich an den ECCO-Leitlinien [Dignass 2010].

Vor Therapiebeginn ist abzuklären, welche Teile des Gastrointestinaltraktes von der Entzündung betroffen sind, um die Therapie dementsprechend einzuleiten. Unterschieden werden der Ileozökalbefall mit leichter, mäßiger oder hoher Entzündungsaktivität, eine Colitis Crohn, ein ausgedehnter Dünndarmbefall und/oder ein Befall des Magens und des Ösophagus.

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die aktuell empfohlene Therapie laut ECCO-Leitlinien:

Ileozökalbefall mit leichter Entzündungsaktivität
<p>9 mg Budesonid [Otley 2005]</p> <p>symptomatische Therapie mit z. B. Analgetika (Paracetamol, Metamizol), Spasmolytika und niedrig dosierten Antidiarrhoika [Su 2006]</p> <p>Ernährungstherapie (insbesondere bei Kindern) [Lochs 2006]</p>
Ileozökalbefall mit mäßiger Entzündungsaktivität
<p>Budesonid oder systemische Steroidtherapie (1 mg/kg KG/Tag) [Otley 2005]</p> <p>Enterale Ernährungstherapie [Lochs 2006, Zachos 2007, Lochs 1991]</p> <p>Antibiotika bei Verdacht auf infektiöse Komplikationen [Steinhart 2002]</p>
Ileozökalbefall mit hoher Entzündungsaktivität
<p>Systemische Glucocorticoide [Benchimol 2008]</p> <p>Inkomplettes Ansprechen: Immunsuppressiva: Azathioprin, 6- Mercaptopurine (MP), Methotrexat (bei Unverträglichkeiten bzw. Nebenwirkungen)</p> <p>Nichtansprechen auf o.g.: TNFα- Antikörper (zugelassen: Infliximab, Adalimumab)</p>
Crohn Colitis
<p>leichte bis mäßige Aktivität: systemische Glukokortikoide</p> <p>distaler Befall: begleitend Suppositorien, Klysmen oder Schäume (5-ASA, Steroide)</p> <p>hohe Krankheitsaktivität: siehe Therapie bei Ileozökalbefall</p> <p>Frührezidiv: zusätzlich Azathioprin, 6-MP oder Methotrexat</p>
ausgedehnter Dünndarmbefall
<p>systemische Glukokortikoide</p> <p>mäßige - schwere Krankheitsaktivität: Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-MP oder Methotrexat)</p>

Nichtansprechen auf o.g.: TNF α - Antikörper (zugelassen: Infliximab, Adalimumab) cave Mangelernährung: frühzeitig enterale Ernährungstherapie
Befall des Magens und des Ösophagus
systemische Glukokortikoide in Kombination mit Protonenpumpeninhibitoren [Miehslers 2001]

Tabelle 2: Therapieoptionen bei M. Crohn [www.ecco-ibd.eu]

1.3 Colitis ulcerosa

1.3.1 Klinik, Befallmuster, Klassifikation und Komplikationen

Das Krankheitsbild der C. ulcerosa zeichnet sich durch eine chronische und rezidivierende Entzündung der kolorektalen Schleimhaut aus. Im Vergleich zum M. Crohn kann durch eine operative Resektion des befallenen Darmabschnittes eine komplette Remission erreicht werden. Da die Entzündung im Gegensatz zum M. Crohn nur auf die Schleimhaut (Mukosa und Submukosa) und meist auf einzelne Dickdarmabschnitte beschränkt ist, werden die klinischen Symptome hauptsächlich durch die vorherrschende Entzündung und die eventuell auftretenden extraintestinalen Manifestationen geprägt. Durch die Entzündung treten auch bei der Colitis Allgemeinbeschwerden wie z.B. Gewichtsverlust, Schwäche und Fieber auf. Typisch für die C. ulcerosa können schleimige, blutige Diarrhoen, eine erhöhte Stuhlfrequenz, vermehrter Stuhldrang, nächtliche Defäkation und Tenesmen sein [Rao 1988, Both 1983]. Als Folge kann eine blutungsbedingte Anämie auftreten, die die Allgemeinbeschwerden verstärken kann [Edwards 1964].

Die C. ulcerosa befällt obligat das Rektum und breitet sich in 45% aller Fälle nicht weiter aus. Bei 15 % der Patienten ist das Rektum und das Kolon ascendens betroffen, bei 40 % das Rektum und das gesamte Kolon. Der Dünndarm ist praktisch nie befallen, mit Ausnahme der sogenannten „backwash“-Ileitis. Diese tritt bei ca. 10-20 % der Patienten auf und befällt die ersten 1-2 cm des terminalen Ileums [Jewell 1998]. Abhängig von dem Kolonabschnitt, der von der Entzündung betroffen ist, kann in Anlehnung an die Montreal Klassifizierung folgende Einteilung der C. ulcerosa vorgenommen werden [Silverberg 2005]:

Code	Bedeutung	Erklärung
E1	Proktitis	Solitärer Befall des Rektums
E2	Linksseitige C. ulcerosa	Befall des Rektums und des Kolons bis zur linken Kolon-Flexur
E3	Ausgedehnte C. ulcerosa	Befall des Rektums und des gesamten Kolons

Tabelle 3: Einteilung der C. ulcerosa nach der Montreal-Klassifikation [Silverberg 2005]

Eine Komplikation der C. ulcerosa stellt bei 6-14 % der Patienten die Entstehung eines toxischen Megakolons dar. Die Mortalitätsrate beträgt 20-32 % [Halpert 1987]. Durch die Entzündung der Nerven bzw. des Plexus können Lähmungen einzelner Darmabschnitte auftreten. Die Krankheitssymptome sind die plötzlich starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes, ein durch den Meteorismus stark geblähtes Abdomen und hohes Fieber mit starken Entzündungszeichen im Blut. Röntgenologisch ist das Kolon erweitert und die Haustrierung ist nicht mehr zu erkennen.

Die Ausbildung einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) ist eine weitere Komplikation der C. ulcerosa. Das Risiko, an einem Cholangiokarzinom zu erkranken, steigt um ein Drittel [Worthington 2005]. Bei drei Vierteln der nordeuropäischen Bevölkerung tritt die PSC in Kombination mit C. ulcerosa auf [Aadland 1987], 4,0-7,5 % der Patienten, die an einer C. ulcerosa leiden, erkranken auch an einer PSC [Broome 2006]. Auch bei der C. ulcerosa können extraintestinale Manifestationen auftreten. Diese sind häufig mit den Genotypen *HLA-DRB1*0103*, *B-27* und *B-58* verbunden, die die Gelenke, die Haut und die Augen befallen [Roussomoustakaki 1997, Orchard 2000, Orchard 2002].

1.3.2 Diagnostik und Therapie

Die Diagnostik der C. ulcerosa beginnt, wie beim M. Crohn, mit einer ausführlichen Anamnese und einer körperlichen Untersuchung. Initial sollte unabhängig vom Befallmuster immer eine Ileo-Koloskopie erfolgen, da gelegentlich ein diskontinuierlicher Befall bzw. eine Backwash-Ileitis möglich ist [D'Haens, 1997, Hill

2002, Heuschen 2001]. Zusätzlich sollten aus allen Abschnitten des Ileokolons Biopsien entnommen werden, da es möglich ist, dass sich in makroskopisch unauffälligen Abschnitten des Darmes histologische Veränderungen befinden [Lee 2002, Floren 1987]. Typische Zeichen stellen die Störung der Kryptenarchitektur, Kryptenatrophie, kontinuierliche Verteilung der Schleimreduktion bei aktiver Colitis und kontinuierliche und transmukosale Infiltration der Mukosa durch Lymphozyten und Plasmazellen dar [Tanaka, Riddel et al. 1999].

Laborchemisch sind häufig die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Leukozyten, Thrombozyten und das C-reaktive Protein (CRP) verändert. Es besteht meist eine Dysproteinämie und eine Anämie. Bei 70% der Patienten lassen sich Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (pANCA) nachweisen [Rao 1988, Both 1983].

Um beurteilen, bzw. einschätzen zu können, um welche Krankheitsschwere es sich handelt, wurde der Klinische Aktivitätsindex (CAI) nach Rachmilewitz [Rachmilewitz 1989] entwickelt.

Im Unterschied zum M. Crohn kann die C. ulcerosa durch eine Kolektomie mit einer kontinenzerhaltenden ileoanalen Pouchanlage kurativ geheilt werden. Bei der medikamentösen Behandlung richtet sich die Therapie nach der Lokalisation und nach der Aktivität der C. ulcerosa im jeweiligen Darmabschnitt. Es werden sowohl 5-ASA und Steroide verwendet, als auch Immunsuppressiva, Cyclosporin und TNF- α -Antikörper (z.B. Infliximab) eingesetzt.

1.4 Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

1.4.1 Einfluss exogener Faktoren

Den Einfluss exogener Faktoren auf die Pathogenese der CED legen verschiedene Studien nahe. Einerseits wurde bei der Untersuchung monozygoter Zwillinge in Dänemark von Spehlmann [Spehlmann 2008] eine Konkordanzrate von 35 % bei M. Crohn und 16 % bei C. ulcerosa beschrieben. Andererseits wurde von Shanahan [Shanahan 2002] ein unterschiedliches Krankheitsrisiko bei gleichen ethnischen Gruppen, die in verschiedenen Regionen lebten, publiziert. Zusätzlich wurde in epidemiologischen Studien ein signifikantes Nord-Süd-Gefälle der Erkrankung mit den höchsten Erkrankungsraten in Nord-Amerika und –Europa festgestellt [Loftus 2004]. Pränatale Ereignisse, Erkrankungen in der Kindheit und die Einnahme von Antikontrazeptiva werden des Weiteren mit der Entstehung von CED in Verbindung

gebracht [Koutrobakis 1996]. Ferner gelten Ernährungsfaktoren [Riordan 1998, Geerling 2000], sozioökonomische Faktoren, hygienische Verhältnisse [Desai 2005, Gent 1994], Nikotinkonsum [Cosnes 2004], gastrointestinale Infekte [Garcia Rodriguez 2006], Appendektomie in der Vergangenheit [Radford-Smith 2002] und der protektive Effekt durch das Stillen [Klement 2004] als weitere exogene Faktoren, die an der Entstehung der CED beteiligt sind.

1.4.1.1 Mikroorganismen

Als wichtigster exogener Faktor sind Bakterien zu nennen. Die Ätiologie für die Entstehung der CED ist nach wie vor wenig verstanden, aber es ist davon auszugehen, dass das angeborene Immunsystem in einem ausgewogenen Verhältnis zwischen der Darmflora und der intestinalen Mukosa stehen muss. Ein Ungleichgewicht in der immunologischen Reaktion auf persistierende Infektionen durch intrazelluläre Bakterienpathogene kann zu einer herabgesetzten Abwehrreaktion gegen diese Keime führen. Als wichtigste intrazelluläre Bakterienpathogene sind das *Mycobacterium avium paratuberculosis* und das adhärent-invasive *Escherichia coli* zu nennen [Glasser 2008, Thomas 2008].

Als weiteres Virus ist die Rolle des Masernvirus in Bezug auf die Entstehung von CED untersucht. Ob eine frühe Infektion mit dem Masernvirus im späteren Leben für die Entstehung des M. Crohn prädisponiert, ist noch nicht abschließend geklärt. In der Studie von Lavy et. al waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr Patienten ($p < 0,05$), die unter M. Crohn litten, in ihrer Kindheit an Masern erkrankt und auch das Ausmaß der Darmerkrankung war in der Gruppe mit Masern in der Kindheit tendenziell höher als bei der Vergleichsgruppe, jedoch nicht signifikant ($p < 0,085$) [Lavy 2001].

Unlängst wurde der Einfluss einer Infektion mit dem Norovirus auf die Entstehung von M. Crohn untersucht [Cadwell 2010]. Von Cadwell et al. wurden Mäuse mit dem Norovirus infiziert. Bei denjenigen, bei denen eine Mutation im *Atg16L1*-Gen vorlag, wurde eine Veränderung der Paneth-Körnerzellen und eine Darminfektion ausgelöst. Jedoch wird M. Crohn nicht einzig und alleine durch das Norovirus oder einen anderen Mikroorganismus ausgelöst, sondern Umweltfaktoren führen zu einer Prädisposition oder schützen vor der Erkrankung [Cadwell 2010].

1.4.1.2 Rauchen

Des Weiteren ist der Umweltfaktor Rauchen zu erwähnen, dessen Einfluss auf die Entstehung von M. Crohn als gesichert gilt [Calkins 1989]. Prinzipiell führt dies bei Patienten mit M. Crohn zu einem zweifach erhöhten Krankheitsrisiko und bei Patienten, die an einer C. ulcerosa leiden, wirkt es eher protektiv [Evans 1997]. In zahlreichen Studien konnte die erhöhte Inzidenz für M. Crohn bei Rauchern, sowie das umgekehrte Verhalten bei C. ulcerosa reproduziert werden [Bidger 2002, Sicilia 2001, Smith 1988]. Vergleichbar mit dem erhöhten Auftreten von Asthma bronchiale unter Kindern, die Zigarettenrauch ausgesetzt sind [Kuchta 1989, Przybylski 2007], erkranken auch Kinder, die von Geburt an „Passivrauch“ bzw. dem Rauch der Mutter ausgesetzt sind, häufiger an M. Crohn, aber seltener an einer C. ulcerosa [Lashner 1993].

Das Risiko, an M. Crohn zu erkranken, verdoppelt sich unter den aktiven Rauchern. Aktive Raucher erkranken jedoch weniger häufig an C. ulcerosa als Nichtraucher [Lindberg 1988].

1.4.1.3 Appendektomie

Die im Kindes- und Jugendalter durchgeführte Appendektomie scheint ebenfalls positiv mit dem Risiko, an M. Crohn zu erkranken, assoziiert zu sein [Dijkstra 1999]. In einer 2008 veröffentlichten Metaanalyse wurde beschrieben, dass das Risiko, nach einer Appendektomie an M. Crohn zu erkranken, ein Jahr nach der Operation erhöht ist (RR 6.69, 95% CI 5.42-8.25) und ein bis vier Jahre nach einer Operation signifikant erhöht ist (RR 1.99, 95% CI 1.66- 2.38). Nach fünf oder mehr Jahren fällt das Risiko auf den Ausgangspunkt zurück (RR 1.08, 95% CI 0.99-1.18) [Kaplan 2008]. Hinter dem Ansteigen des Risikos für die Entstehung eines M. Crohn nach einer Appendektomie, das nach einigen Jahren wieder fällt, werden von Kaplan et al. Probleme bei der Diagnostik eines beginnenden M. Crohn vermutet. Für die C. ulcerosa wurde ein protektiver Zusammenhang mit einer stattgehabten Appendektomie publiziert. Der systematische Überblick von Gardenbroek [Gardenbroek 2011] ergab in einen nachweisbaren positiven Effekt der Appendektomie auf den Krankheitsverlauf bei C. ulcerosa.

1.4.1.4 Nutritive Faktoren

Die Rolle, die die Ernährung bei der Entstehung von CED spielt, ist noch nicht abschließend geklärt und bedarf noch weiterer Untersuchungen. In der Publikation von Lee [Lee 2008] wird vor allem ballaststoffarme, zuckerreiche Ernährung und der häufige Verzehr tierischer Fette als Risikofaktor für die Entstehung von CED verantwortlich gemacht. Diese Ergebnisse werden durch die Studie von D'Souza et al. [D'Souza 2008] bestätigt. Die Gruppe derer, die sich vor allem von Fleisch, fettreichem Essen und Süßspeisen ernährte, litt häufiger an M. Crohn. Bei der Vergleichsgruppe, die sich hauptsächlich von Gemüse, Obst, Olivenöl, Fisch, Getreide und Nüssen ernährte, zeigte sich kein Zusammenhang mit M. Crohn.

1.4.1.5 Endogene Faktoren

Neben den vermuteten exogenen Faktoren, die für die Entstehung von CED verantwortlich sind, werden zusätzliche endogene Faktoren vermutet. Die Störung des intestinalen Immunsystems und der damit verbundene anhaltende Entzündungsprozess ist ein wichtiger Baustein in der Pathogenese der CED. Die Schleimhautoberfläche des Darmes stellt mit 300m² die größte Kontaktfläche des Körpers mit der Umwelt dar. Pro Gramm Fäzes sind im Kolon 10¹² Bakterien enthalten, die einen sehr großen Antigenpool bilden. Die gastrointestinale Mukosa nimmt zwei gegensätzliche Aufgaben wahr: einerseits nimmt sie Nahrungsbestandteile und Flüssigkeiten auf und sezerniert eine Reihe von Enzymen, Salzen und Antikörpern. Andererseits stellt sie eine Barriere zu den pathogenen endoluminalen Keimen und Antigenen dar [Glasser 2008].

Bei Infektionen des Gastrointestinaltraktes wird das Darm-assoziierte Lymphgewebe (gut-associated lymphoid tissue, GALT) kontrolliert aktiviert und die oben beschriebene Barrierefunktion wiederhergestellt. Sowohl die Antigene, die in der Nahrung enthalten sind, als auch die kommensale Darmflora, lösen durch die so genannte „orale Toleranz“ keine Immunantwort aus. Diese „orale Toleranz“ wird durch die Hemmung der Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine aufrechterhalten [Shi 2004].

Die intakte mechanische und immunologische Barrierschicht ist für bakterielle Erkennung von Antigenen und der Autophagie durch das mukosale Immunsystem von großer Bedeutung [Swidsinski 2002, Irvine 2000]. Die optimale Aufrechterhaltung dieser Funktion verhindert eine Zunahme der Permeabilität für

luminale Antigene und verhindert die Entstehung eines Entzündungsprozesses, wie er bei den CED auftritt [Chichlowski 2008].

In genetisch prädisponierten Personen kann die Dysregulation der Erkennung von Antigenen und der lokalen intestinalen Immunantwort zu einer überschießenden Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-1 β , IL-23, IL-17, IFN- γ , führen [Hanauer 2006, Hume 2002; Podolsky 2002; Baumgart 2007]. Die Regulation der proinflammatorischen T-Zell-Antwort scheint immunologisch durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC) zu erfolgen [Chieppa 2006, de Baey 2003, Hart 2005, Leon 2006]. Die DC scheinen als Mediator zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem zu agieren. Nach der Erkennung bakterieller Substanzen (z.B. Lipopolysaccharide) aktivieren sie die Th1-, Th2- und Th17- Immunantworten und könnten damit eine zentrale Funktion bei der Entstehung von CED darstellen [Niess Science 2005, Niess Curr Opin Gastroenterol 2005].

Die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und die DC scheinen durch die Regulation der proinflammatorischen Antwort der T-Zellen eine wichtige Aufgabe bei der Immunantwort zu übernehmen [Chieppa 2006, de Baey 2003, Hart 2005, Leon 2006]. Die DC scheinen alleine durch ihre Stellung als Mediator zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem und durch die Möglichkeit der direkten Immunantwort nach Aktivierung von Th1-, Th2- und Th17 -Zellen, an der Regulation der Pathogenese von CED beteiligt zu sein [Niess 2005, Niess 2005 a]. Die Bedeutung der Erkennung bakterieller Antigene und die Autophagie der Darmmukosa durch das Immunsystem gewinnt in aktuellen Untersuchungen immer mehr an Bedeutung und verdeutlicht, dass ein intaktes intestinales Epithel als mechanische und immunologische Barriere im Kontakt mit der bakteriellen Besiedelung des Darmes von großer Wichtigkeit ist [Irvine 2000, Swidsinski 2002, Yu 2008].

1.4.2 Genetische Grundlagen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

In verschiedenen Studien der letzten Jahre wurde der genetische Einfluss auf die Pathogenese der CED untersucht. Innerhalb verschiedener Bevölkerungen wurden unterschiedliche Inzidenzen und Prävalenzen für die Krankheit erforscht, die unter dem Gliederungspunkt 1.1 bereits ausführlich dargelegt wurden. Eine rein

genetische Ursache der CED konnte nicht bewiesen werden und die Zusammenschau aller bisher untersuchten Komponenten zeigt, dass eine multifaktorielle Genese der CED am wahrscheinlichsten ist. Durch die beobachteten Unterschiede bezüglich der Rassen- und ethnischen Zugehörigkeit kann auf genetische, vererbare und von der Umgebung sowie dem Lebensstil abhängige Faktoren für die Entstehung von CED geschlossen werden [Karlinger 2000].

Es wird davon ausgegangen, dass die CED durch eine überschießende Immunantwort der Mukosa auf bakterielle Antigene bei genetisch anfälligen Patienten verursacht wird [Xavier 2007, Sartor 2006]. Familiäre Häufungen traten bei Verwandten ersten Grades auf, deren Risiko 4- bis 20-mal höher als das der Normalbevölkerung ist, an einer CED zu erkranken. Die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen beträgt hier bis zu 45% [Tysk 1988].

1.4.2.1 Das *NOD2/CARD15*-Gen

Der erste Genlocus, der als Risikomarker mit dem Auftreten des M. Crohn in Zusammenhang gebracht wurde, befindet sich auf dem Chromosom 16q12 in der Perizentromerregion und wird IBD1 genannt [Hugot 2001, Ogura, Inohara et al. 2001]. Innerhalb dieser Kopplungsregion wurde das erste Suszeptibilitäts-gen, *NOD2*, identifiziert, das für die Erkrankung an M. Crohn maßgeblich entscheidend ist [Hugot 2001, Ogura, Bonen et al. 2001]. Später wurde das Gen in *CARD15* umbenannt, die derzeit gültige Nomenklatur bezeichnet es erneut als *NOD2*.

Das *NOD2*-Gen kodiert für das zytoplasmatische NOD2-Protein (12 Exons, 116kDa, 1040 Aminosäuren), das vor allem in Makrophagen exprimiert wird. NOD2 ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems, das als Frühwarnsystem zur Erkennung bakterieller Krankheitserreger dient. N-terminal trägt es zwei Apoptosegene, die CARD-Domänen, zentral die Nukleotidbindungsstelle, die NOD-Domäne und am Carboxy-Ende die aus 10 leucinreichen Wiederholungen bestehende LRR (Leucin-rich repeat)-Region [Ogura, Inohara et al. 2001]. Die Abbildung 2 zeigt eine schematische Struktur des NOD2-Proteins:

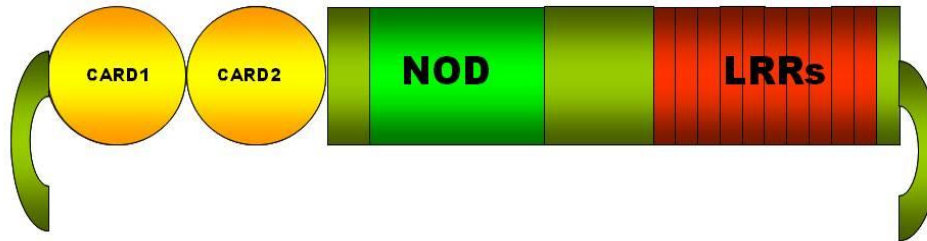


Abbildung 2: Struktur des NOD2-Proteins. Die zwei CARD-Domänen N-terminal (in der Abbildung links, gelbe Kreise) stellen jeweils ein Apoptosegen dar, zentral (mittig, grün) befindet sich die Nucleotid-Bindungsstelle (NOD-Domäne) und am Carboxy-Ende (in der Abbildung rechts, rot) liegt eine besonders an Leucin-reiche Region (LRR, Leucin-rich-repeat) [Ogura, Inohara et al. 2001].

Es wurden bisher drei Einzelbasenpolymorphismen entdeckt, die mit M. Crohn und nicht mit *C. ulcerosa* assoziiert sind (SNP8, SNP12 und SNP13). Die Insertionsmutation 3020insC p.(Leu1007fsX1008) führt durch das Einfügen eines vorzeitigen Stoppcodons zu einem verkürzten Protein. Die Punktmutationen C2104T p.(Arg702Trp) und G2722C p.(Gly908Arg) führen zu einem Aminosäureaustausch. Allen drei Mutationen ist gemeinsam, dass sie bei heterozygoten Trägern ein 2-4-faches Risiko, bei homozygoten Trägern ein 20- bis 40-faches Risiko für die Erkrankung an M. Crohn mit sich führen. Bei 10-15 % der Crohn-Patienten lässt sich die *NOD2*-Mutation nachweisen [Hampe 2001, Hugot 2001, Hugot 1996, Ogura, Bonen et al. 2001].

Durch die Mutationen werden vor allem die Leucin-reichen Regionen des *NOD2*-Proteins verändert und dies führt zum Verlust einer effektiven und gezielten Erkennung bakterieller Bestandteile wie z.B. Peptidoglykane [Watanabe 2004, Maeda 2005, Inohara 2003]. Für T-Lymphozyten werden fehlerhafte Signale induziert und als Folge eine proinflammatorische Immunantwort generiert. Bisher fehlen jedoch Studien, wie sich der Krankheitsverlauf anhand der *NOD2*-Mutation vorhersagen bzw. beeinflussen lässt.

Die Übersichtsskizze in Abbildung 3 zeigt die mukosale Immunantwort von gesunden Individuen und Crohn-Patienten mit defekter *NOD2*-Funktion im Vergleich:

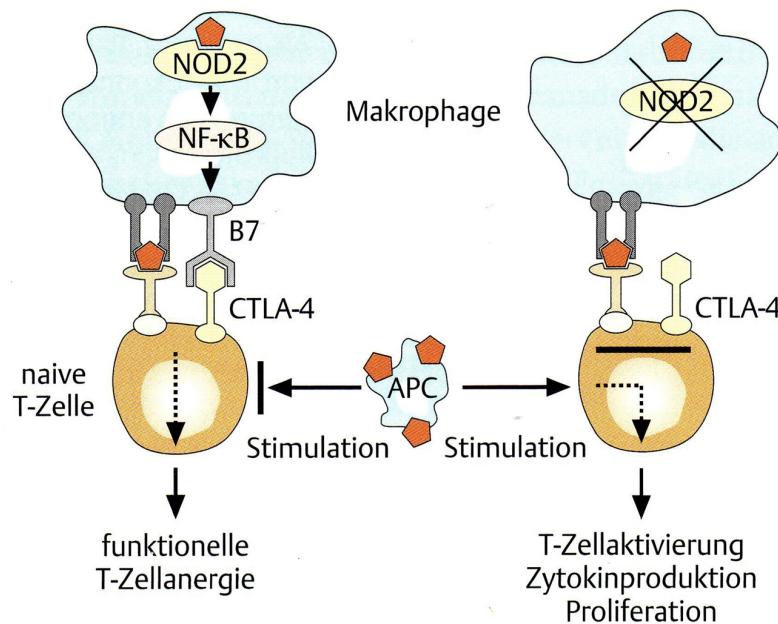


Abbildung 3: Mukosale Immunantwort von gesunden Individuen und Crohn-Patienten mit defekter NOD2-Funktion [Hoffmann 2009]. Im linken Teil der Abbildung sind die dendritischen Zellen (blau) gezeigt, in denen die korrekte Erkennung der bakteriellen Bestandteile (MDP, rotes Fünfeck) durch NOD2 stattfindet. Mittels der Aktivierung von NF- κ B und der sich daraus anschließenden Regulation der T-Zellen (braun) wird die entsprechende Immunantwort mittels IL-12 und IL-23 generiert. Rechts wird die Situation für einen Crohn-Patienten skizziert. Durch den mit einem Kreuz markierten Defekt im NOD2-Protein werden die Bakterienbestandteile fehlerhaft erkannt, proinflammatorische Zytokine wie IL-12, IL-23, IL-17 und IFN- γ werden überschießend produziert und antibakterielle Defenseine werden vermindert gebildet [Watanabe 2004].

1.4.2.2 Weitere Suszeptibilitätsgene

Aufgrund der technischen Durchführbarkeit großer, genomweiter Assoziationsstudien und mit Hilfe der Genchip-Technologie, konnte nach der Identifikation des *NOD2*-Gens nach weiteren Genvarianten geforscht werden. Hiermit konnten weitere Genvarianten gefunden werden, die auf die Pathogenese der CED einen Einfluss haben könnten. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die bisher mit *M. Crohn* und *C. ulcerosa* in Verbindung gebrachten Suszeptibilitätsgene. Es wird eine Übersicht über die Bezeichnung des Gens bzw. des Lokus, den zugeordneten Chromosomenabschnitt, die Funktion bzw. das Gen des betroffenen Abschnitts und die im Vordergrund stehende Assoziation mit *M. Crohn* oder *C. ulcerosa* gegeben.

Gen oder Locus	Chromosom	Funktion/Gene im betroffenen Abschnitt	Assoziation
<i>NOD2</i>	16q12	Intrazellulärer Sensor für Peptidoglykane	M. Crohn
<i>IL23R</i>	1p31	IL-23-Rezeptor	M. Crohn C. ulcerosa
<i>ATG16L1</i>	2q37	Autophagozytose	M. Crohn
Intergenic-Region	5p13	? <i>PTGER4</i> ; <i>CARD6</i>	M. Crohn
<i>IBD5</i>	5q31	? <i>SLC22A4</i> ; ? <i>SLC22A5</i> , ? <i>IRF1</i>	M. Crohn C. ulcerosa
MHC-Region	6p21	MHC-Komplex	M. Crohn C. ulcerosa
<i>PTPN2</i>	18p11	T-Zell-Protein-Thyrosin-Phosphatase	M. Crohn
<i>IL12B</i>	5q33	Interleukin-12/23 p40-Untereinheit	M. Crohn
<i>NKX2-3</i> -Region	10q24	Immunentwicklung im GI-Trakt	M. Crohn
Intergenic Region	10q21	? <i>ZNF365</i> ; ? <i>EGR2</i>	M. Crohn
Gene-rich Region	3p21	sehr viele	M. Crohn
<i>IRGM</i> gene Region	5q33	Autophagozytose	M. Crohn

Tabelle 4: Überblick über die bisher mit M. Crohn und C. ulcerosa in Verbindung gebrachten Suszeptibilitätsgene [Cho 2007]

Parallel zur Identifikation der weiteren Suszeptibilitätsgene lassen sich Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der CED ziehen. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die bisher identifizierten Genvarianten und dem damit verbundenen und vermuteten pathogenetischen Prozess:

Genvariante	vermuteter pathogenetischer Prozess	Literaturangabe
<i>NOD2</i>	Erkennung und Prozessierung bakterieller Strukturen	Hugot 2006, Hugot 2001 Nature, Ogura, Inohara et al. 2001
<i>SLC22A4/5</i>		Peltekova 2004, Török 2005
<i>TLR4</i>		Arnott 2005, Brand 2005
<i>ATG16L1</i>	Bedeutung bei der Autophagozytose	Cummings 2007, Prescott 2007
<i>IRGM</i>		Massey 2007, Parkes 2007
<i>IL23R</i>	Regulation der Entzündungsreaktion durch IL-23 und IL-17	Dubinsky 2007, Duerr 2006, Tremelling 2007

Tabelle 5: Übersicht über CED-assoziierte Genvarianten und deren zugrundeliegende Pathogenese [Cho 2007]

Durch die Identifikation dieser Gene können die pathogenetischen Grundlagen der Krankheitsentstehung besser verstanden werden. Diese gliedern sich in die Bereiche Erkennung und Prozessierung bakterieller Antigene durch das angeborene Immunsystem, Autophagie und damit verbunden die Kontrolle intrazellulärer Bakterien und die Regulation der proinflammatorischen Immunreaktion durch Aktivierung des IL-23/IL-17-Systems [Mathew 2008].

Die entdeckten Suszeptibilitätsgene wie z.B. *IL23R* [Duerr 2006, Glas 2007], *ATG16L1* [Hampe 2007, Rioux 2007, Glas 2008] und *IRGM* [Parkes 2007] finden sich in der Tabelle 5 wieder. In weiteren Studien wurden zusätzliche Suszeptibilitätsgene wie z.B. *SLC22A4* und die Genloci *IBD2-9* identifiziert [Török 2005, Peltekova 2004, Satsangi 1996, Duerr 1998, Hampe 1999, Decjaorp 2001, Mah 1999, Duerr 2000, Rioux 2000, Rioux 2001, Cho 1998, Cho 2000]. Auch die Genregion 5p13.1, welche die Expression von PTGER4 moduliert, wurde auf diesem

Weg entdeckt [Libioulle 2007]. Zusätzlich existieren weitere Gene, die den Phänotyp des M. Crohn verändern. Beispielsweise sind die Varianten in den Genen des Toll-like Rezeptors (TLR) [Brand 2005], des Fraktalkin-Rezeptors [Brand 2006], der Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) [Dambacher 2007] und des C-reaktive Proteins (CRP) [Thalmaier 2006] zu nennen. Die genannten Gene verändern die Suszeptibilität und den Phänotyp des M. Crohn. Für das *IL23R*-Gen wurde zusätzlich eine Assoziation mit dem Krankheitsbild der C. ulcerosa festgestellt [Duerr 2006, Glas 2007].

Um das Vorkommen der neu identifizierten Genvarianten innerhalb verschiedener ethnischen Kohorten und damit zuverlässig innerhalb der CED-Population zu bestätigen, sind weitere Replikationsstudien nötig. Außerdem ist es wichtig, die Interaktionen zwischen den verschiedenen Genvarianten, die sogenannte Epistasie, zu erforschen. Um aus den genotypischen Daten eine verbesserte Diagnostik und Therapie ableiten zu können, ist das Wissen um die Rückschlüsse des Genotyps auf die funktionellen und nicht zuletzt phänotypischen Merkmale der CED-Population essentiell.

1.5 Bedeutung der IL-23/IL-17-Achse

1.5.1 Das Th-17-zelldifferenzierende IL-23

Das Zytokin IL-23 gehört zur IL-12-Familie, es wird hauptsächlich von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie z.B. durch aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen produziert und stellt eine Verbindung des angeborenen und dem erworbenen Immunsystems dar. Im terminalen Ileum von M. Crohn-Patienten wird eine große Menge IL-23 produziert [Becker 2003]. Eine Mutation im IL23-Rezeptor scheint die Ausbildung eines M. Crohn zu verhindern [Duerr 2006]. IL-23 aktiviert und differenziert Th-17-Zellen, welche die proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-6, TNF- α , IL-21, IL-22 und IL-26 induzieren [Aggarwal 2003, Liang 2006, Yen 2006, Zheng 2007, Dambacher 2009]. Die Mechanismen, die an der IL-23-induzierten Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen zu IL-17-produzierenden Th-17-Zellen beteiligt sind, unterscheiden sich von der klassischen T-Helfer-Zell Antwort vom Typ 1 und 2 (Th-1, Th-2) [Aggarwal 2003, Steinman 2007, Hue 2006].

Gleichzeitig besitzt IL-23-blockierende Eigenschaften gegenüber den regulatorischen T-Zellen (Treg). Diese produzieren nach Aktivierung durch IL-2 das antiinflammatorische Zytokin IL-10 und den transformierenden Wachstumsfaktor- β

(TGF- β). Die Treg-Zellen tragen physiologischerweise zu einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei. Durch die Aktivierung der IL-23/IL-17-Achse wird die akute und chronische Entzündungsreaktion durch die Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen, Metalloproteinasen und Chemokinen hochreguliert [Hwang 2004, Kolls 2004]. Das Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ist in der folgenden Abbildung anschaulich dargestellt [Brand 2009]:

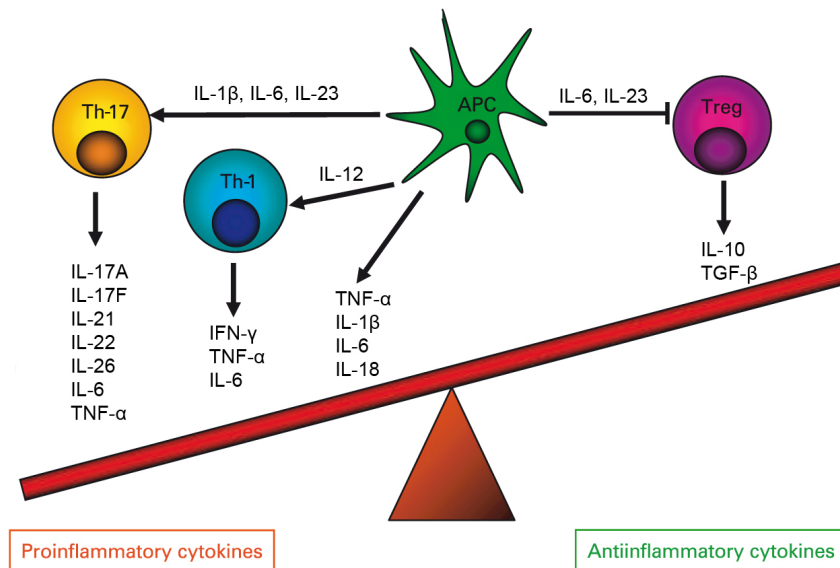


Abbildung 4: Das Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei Aktivierung der IL-23/Th-17-Achse [Brand 2009]. IL-23 wird hauptsächlich von den antigenpräsentierenden Zellen im terminalen Ileum produziert. Es übt einerseits eine Blockierung der regulatorischen T-Zellen (Treg, in der Abbildung rechts, lila) aus, die physiologischer Weise nach ihrer Aktivierung antientzündliche Zytokine ausschütten würden (z.B. IL-10). Andererseits stimuliert IL-23 Th-17 (gelb) und Th-1 (blau) -Zellen zur vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Diese vermehrte Produktion und die Hemmung der Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine führt zu einem ausgeprägten Ungleichgewicht und damit zu einem Übergewicht auf der Seite der proinflammatorischen Zytokine.

Die durch IL-23/IL-17 vermittelte Entzündungskaskade [Iwakura 2006] spielt auch bei weiteren T-Zell-vermittelten Erkrankungen eine wichtige Rolle. Als Beispiel sind die rheumatoide Arthritis, der Diabetes mellitus, die Autoimmunenzephalitis und die ankylosierende Spondylitis zu nennen [Miossec 2004, Wendling 2007, Lohr 2006, Mensah-Brown 2006, Kikly 2006].

Es liegt nahe, dass der IL-23/IL-17-Achse eine zentrale Bedeutung bei der Immunregulation der CED zukommt, die bei der Entwicklung therapeutischer Biologika als mögliche Zielstruktur dienen könnte [McGovern 2007, Zhang 2007].

1.5.2 Die IL-17-Familie

Bislang wurden sechs Mitglieder der IL-17-Familie identifiziert [Huang 2004, Gaffen 2006]. Allen Mitgliedern der IL-17-Familie ist eine Proteinstruktur gemeinsam, die sich durch vier sehr stark gebundene Cystein-Reste auszeichnet. Diese Struktur hat in Bezug auf die Sequenz jedoch keine Gemeinsamkeit mit den anderen bekannten Zytokinen. Exemplarisch ist in der folgenden Abbildung die Proteinstruktur des IL-17F dargestellt.

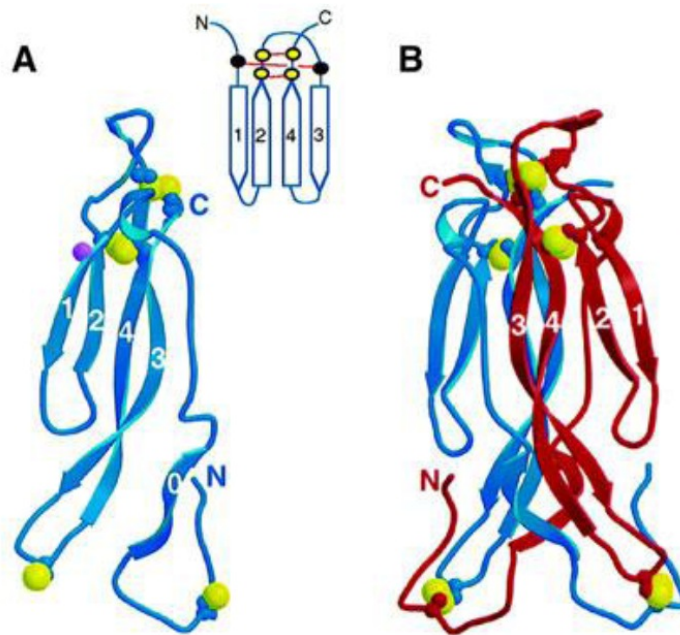


Abbildung 5: Struktur des IL-17F. A: Proteinfaltung des IL-17F-Monomer mit nummerierten Schleifen. Die Disulfidbrücken sind durch die gelben Kreise (Sulfide) und die Glycosylierung ist an der Stelle Asn53 durch einen lila Kreis markiert. B: Proteinfaltung des IL-17F-Dimers. Die Markierung der Disulfidbrücken entspricht der unter Punkt A [Wiesmann 2001].

IL-17A trägt vor allem zu der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Entzündungen und Tumoren bei und spielt bei der Bekämpfung von Bakterien und Pilzinfektionen eine wichtige Rolle. IL-17F ist hauptsächlich an der mukosa-assoziierten Abwehrreaktion beteiligt und IL-17E fördert die Th-2-vermittelte Immunantwort. Über die IL-17B, IL-17C und IL-17D ist bisher nur sehr wenig bekannt [Iwakura 2011].

IL-17A und F haben 50% der Aminosäuren gemeinsam, wohingegen IL-17E im Vergleich zu IL-17A mit nur 16% Übereinstimmung der Aminosäuren am unterschiedlichsten ist [Gerhardt 2009, Hymowitz 2011]. Es wird vermutet, dass IL-17A und IL-17F nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere, als IL17-A/F

bezeichnet, bilden [Wright 2007, Chang 2007]. Beide Interleukine sind sehr homolog, binden am selben Rezeptor und verfügen über eine ähnliche biologische Aktivität [Iwakura 2008]. IL-17A und F unterscheiden sich in der Regulation, darin dass IL-17F früher als IL-17A exprimiert wird [Lee 2009]. Neutrophile, Monozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und lymphoid tissue inducer (LTi)-ähnliche Zellen können IL-17A und F sehr schnell produzieren [Cua 2010]. Zusätzlich wird IL-17A von Paneth-Zellen gebildet [Takahashi 2009], und die IL-17F mRNA kann auch von Epithelzellen des Kolons gebildet werden [Ishigame 2009].

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die IL-17-Familie, die alternativen Bezeichnungen der Interleukine, den Namen des Gens, das Chromosom, auf dem es lokalisiert ist, sowie die Ursprungszellen und die Rezeptoren.

Bezeichnung	Alternative Bezeichnung	Gen Name	Chromosom	Ursprungszelle	Rezeptor (alternativer Name)
IL-17A	IL-17, CTLA-8	<i>IL17A</i>	1 A4	Th17, CD8, NK, Neutrophile Zellen	IL17RA (IL17R)
IL-17B	CX1, NERF	<i>IL17B</i>	18 D3	?	IL17RB (IL17RH1, IL-5R)
IL-17C	CX2	<i>IL17C</i>	8 E1	?	IL17RE
IL-17D		<i>IL17D</i>	14 C3	?	?
IL-17E	IL25	<i>IL25</i>	14 C2	Th2, Eosinophile, Mastzellen	IL17RB (IL17RH1, IL25R)
IL-17F	IL1	<i>IL17F</i>	1 A4	Th17, CD8, NK, Neutrophile Zellen	IL17RA IL17RC (IL17RL)

Tabelle 6: Übersicht der IL-17 Familie [Weaver 2007, Kolls 2004]

1.5.3 IL-17F und der *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus

Das Gen für *IL17F* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (p12.2) [Gerhardt 2009, Hymowitz 2011]. IL-17F, das IL-17RC und IL-17RA [Huang 2004, Gaffen 2009] bindet, zeigt vor allem in Bezug auf die Immunantwort auf bakterielle Antigene eine starke proinflammatorische Aktivität [Starnes 2001, Numasaki 2004, Oda 2005].

Oda et. al und Mc Allistar et. al weisen IL-17F eine Hauptrolle bei chronisch entzündlichen und allergischen Lungenkrankheiten zu, die durch die Induktion von CXC-Chemokinen und die sich anschließende chemotaktische Auswirkung auf die neutrophilen Granulozyten vermutet wird [Oda 2005, Mc Allister 2005]. Eine japanische Fall-Kontroll-Studie zeigte, dass homozygote Träger einer Aminosäuresubstitution von Histidin zu Arginin an der Stelle 161 p.(His161Arg), die auf dem dritten Exon des Gens für IL-17F verschlüsselt ist, ein geringeres Risiko für das Auftreten von Asthma haben [Kawaguchi 2006]. Funktionsgemäß kann die Variante *IL17F* p.His161Arg die Bildung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine nicht induzieren und antagonisiert damit die Aktivität des Wildtyps für IL17F [Kawaguchi 2006]. Zusätzlich wurde die Interaktion der Gene zwischen *IL17A*, *IL17RA* und dem für die Prädisposition des CED-Suszeptibilitätsgens *IL23R* beschrieben [Papadakis 2007, Mei 2007].

Sowohl die beschriebenen Forschungsergebnisse, die Bedeutung der IL-23/IL-17-Achse bei CED, als auch die Identifikation von *IL23R*, das durch die Regulierung der Th17-Zytokinexpression als Gen zur Prädisposition von CED beschrieben wurde [Schmechel 2008], legen eine wichtige Rolle von IL-17F bei CED nahe. Bislang wurde IL-17F als mögliches Suszeptibilitätsgen bei CED jedoch noch nicht untersucht.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Ergebnisse von Oda et. al und Mc Allistar et. al weisen IL-17F eine Hauptrolle bei chronisch entzündlichen und allergischen Lungenkrankheiten zu [Oda 2005, Mc Allister 2005]. Zudem konnten Kawaguchi et al. [Kawaguchi 2006] einen Zusammenhang zwischen der Substitution einer Aminosäure auf dem Gen für IL-17F und einem geringeren Risiko für das Auftreten von Asthma zeigen. Als Prädisposition für CED wurde die Interaktion der Gene *IL17A*, *IL17RA* und *IL23R* beschrieben [Papadakis 2007, Mei 2007].

Sowohl die aktuellen Forschungsergebnisse zu IL-17F, die funktionell nachgewiesene Bedeutung der IL-23/IL-17-Achse bei CED und die Identifikation von *IL23R* als Suszeptibilitätsgen geben Anlass, *IL17F* in der vorliegenden Arbeit erstmals als mögliches Suszeptibilitätsgen bei CED zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

1. einen möglichen Zusammenhang des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus mit dem Auftreten eines M. Crohn oder einer C. ulcerosa an einer großen Patientenkohorte und Kontrollen zu untersuchen und hierdurch erstmals die Bedeutung von *IL17F* als mögliches CED-Suszeptibilitätsgen in einer großen Patientenkohorte zu bestimmen,
2. im Rahmen einer detaillierten Genotyp-Phänotyp-Analyse mögliche Einflüsse des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus auf Krankheitsverlauf und Phänotyp von CED-Patienten zu untersuchen,
3. die genetischen Interaktionen zwischen den drei hauptsächlich mit M. Crohn assoziierten Gen-Loci, den *NOD2* Mutationen p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 und 10 ebenfalls mit M. Crohn assoziierten *IL23R*-Varianten und dem *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus zu überprüfen und
4. Gewebeproben auf eine veränderte Regulation der intestinale Genexpression der IL-17F-mRNA hin zu untersuchen.

Durch die Analyse lassen sich wichtige Erkenntnisse über die genetischen Hintergründe der Bedeutung der IL-23/IL-17-Achse bei CED und potentiell neue Therapieansätze erwarten.

2 Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation umfasst insgesamt 1682 Probanden (M. Crohn: 499 Patienten, C. ulcerosa: 216 Patienten, Kontrollen: 967 Personen), bei denen die genomische DNA auf die Anwesenheit des *IL17F*-p.His161Arg-Polymorphismus hin untersucht wurde. Alle Patienten wurden im Zentrum für CED am Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität in München / Standort Großhadern behandelt und für diese Studie rekrutiert. Von allen Teilnehmern wurde eine unterschriebene Einverständniserklärung abgegeben und die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Die Kontrollgruppe besteht aus gesunden Blutspendern, die mit der Patientengruppe nicht verwandt sind. In Bezug auf das Alter wurde eine Paarbildung durchgeführt. Von jedem Studienpatienten wurde 10 ml Vollblut entnommen und bei -80°C eingefroren. Zur Verschlüsselung der Daten und Pseudonymisierung erhielten die Patienten eine laufende Nummer, die auch auf den Blutproben notiert ist.

Die demographischen und klinischen Daten wurden den Krankenakten entnommen und anhand eines detaillierten Erhebungsbogens erfasst [siehe 7.2 dieser Arbeit].

2.2 Verwendete Materialien und Laborgeräte

Um die im folgenden Kapitel beschriebenen Versuchsreihen durchzuführen, wurden die unten genannten Chemikalien, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

2.2.1 Extraktion der DNA

Zur Extraktion der DNA aus den Blutproben wurden folgende Substanzen verwendet:

Substanz	Herkunft
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Ethanol 97 %	Merck (Darmstadt)

Tabelle 7: Verwendete Substanzen zur Extraktion der DNA

2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden folgende Substanzen benötigt:

Substanz	Herkunft
Nukleasefreies Wasser	Promega (Mannheim)
DMSO	Merck (Darmstadt)
dNTP (20 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Primer IL-17F vorwärts	MWG Biotech (Ebersberg)
Primer IL-17F rückwärts	MWG Biotech (Ebersberg)
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR-Puffer 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
MgCl ₂	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 8: Verwendete Substanzen zur Durchführung der PCR

2.2.3 Enzymatischer Verdau

Der enzymatische Verdau des Produktes der PCR wurde mit folgenden Substanzen durchgeführt:

Substanz	Herkunft
Nukleasefreies Wasser	Promega (Mannheim)
Enzym NlaIII	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
BSA (Bovine Serum Albumin)	New England BioLabs (Frankfurt am Main)

Tabelle 9: Verwendete Substanzen für den enzymatischen Verdau des PCR-Produktes

2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Durchführung der Elektrophorese auf Agarosegel wurden folgende Substanzen verwendet:

Substanz	Herkunft
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
100 bp DNA-Längenstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
Destilliertes Wasser	Milli-Q Reagent Water Systems (Millipore / Schwalbach)
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Bio-Rad (München)
Tris	Fischer (Schwerte)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Bio-Rad (München)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)

Tabelle 10: Verwendete Substanzen zur Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese

2.2.5 Extraktion der mRNA

Zur Extraktion der mRNA aus den Gewebeproben wurden folgende Substanzen verwendet:

Substanz	Herkunft
Trizol	Invitrogen (Karlsruhe)
Omniscript reverse transcriptase	Qiagen (Hilden)
ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Forster City, USA
Quantitect SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Primer IL-17F vorwärts	MWG Biotech (Ebersberg)
Primer IL-17F rückwärts	MWG Biotech (Ebersberg)
Beta-actin vorwärts	MWG Biotech (Ebersberg)
Beta-actin rückwärts	MWG Biotech (Ebersberg)

Tabelle 11: Verwendete Substanzen zur Extraktion der mRNA

2.2.6 Zusammengesetzte Reagenzien

Der TE-Puffer wurde aus folgenden Substanzen hergestellt:

TE-Puffer
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

Tabelle 12: Herstellung des TE-Puffers

Der Ladepuffer wurde aus folgenden Substanzen hergestellt:

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

Tabelle 13: Herstellung des Ladepuffers

Der TAE-Puffer wurde aus folgenden Substanzen hergestellt:

TAE-Puffer
40mM Tris-Acetat
1 mM EDTA

Tabelle 14: Herstellung des TAE-Puffers

2.2.7 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien wurden zur Durchführung der oben beschriebenen Methoden verwendet:

Laborgeräte	Hersteller
Waage PL200	Mettler-Toledo (Gießen)
Vortex Typ REAX 1D	Heidolph (Kehlheim)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler PTL-200, MJ-Research	Biozym (Hamburg)
Gelkammer	Bio-Smart (Bern)
Stromgeber der Kammer Modell 1000/500	Bio-Rad (München)

UV-Transilluminator MultiDoc-It	UVP (Cambridge)
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG (Zürich)
Zentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Kapillarsequenzier 3730	Applied Biosystems (Foster City/USA)

Tabelle 15: Verwendete Laborgeräte

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Filter-Pipettenspitzen	Biozym (Hamburg)
Einmalhandschuhe	Semper Care (Wien)
Reaktionsgefäße 0,5 und 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)

Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.3 Quantitative Bestimmung der RNA in den Gewebeproben

Die beschriebenen Versuchsreihen wurden in den Forschungslaboren der Medizinischen Klinik II im Universitätskrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München am Standort Großhadern durchgeführt.

Die RNA wurde mit Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Herstellerangaben aus den Biopsien extrahiert. Im Anschluss wurde die reverse Transkription von 2 µg RNA mit Hilfe der Omniscript Reverse Transkriptase (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die sich anschließende Echtzeit-PCR wurde mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Forster City, CA) unter Verwendung des Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Primer der Oligonukleotide wurden anhand der

veröffentlichten Sequenzierungen von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt:

Primer	Sequenz
IL-17F vorwärts	5'-AGCGCAACATGACAGTGAAG-3'
IL-17F rückwärts	5'-GTGTAATTCCAGGGGGAGGT-3'
beta-Aktin vorwärts	5'-GCCAACCGCGAGAAGATGA-3'
beta-Aktin rückwärts	5'-CATCACGATGCCAGTGGTA-3'

Tabelle 17: Verwendete Primer

Die Inkubation erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

PCR-Programm	Temperatur (in °C)	Zeit (in Sekunden)	Anzahl der Zyklen
Vorlauf	95	900	1
Denaturierung	95	30	40
Annealing	60	30	
Elongation	72	30	

Tabelle 18: Zyklen im Thermocycler

Jede mRNA wurde anhand der Standardkurve des entsprechenden Primerpaares berechnet.

2.4 Methoden der Genotyp-Phänotyp-Analyse

2.4.1 Extraktion der DNA

Um die Untersuchungen an der genomischen Erbsubstanz durchführen zu können, muss sie aus den kernhaltigen Zellen des zur Verfügung stehenden Vollblutes isoliert werden. Durch Zugabe von Na₂EDTA wird die Gerinnung des Vollblutes verhindert. Nach der enzymatischen Zerstörung der Zellmembranen wird die frei gewordene

Nukleinsäure durch die Ionenaustauschchromatographie auf einem Filtermembransystem von Proteinen und Verunreinigungen getrennt. Die gesamte Extraktion der DNA wird mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die in der Monovette eingefrorene Vollblutprobe wird bei Raumtemperatur erwärmt und kurz auf dem Vortex-Gerät gemischt.

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß werden 20 µl vorgefertigte Proteinaselösung, 200 µl Vollblut und 200 µl Puffer AL gegeben. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird gut durchmischt und zehn Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend werden die Proben kurz zentrifugiert, 200 µl Ethanol (96%) dazu pipettiert, gemischt und wieder kurz zentrifugiert.

Eine zentrifugierbare Chromatographiesäule wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß gesteckt und die Mischung aus dem 1,5 ml Reaktionsgefäß dort hinein überführt. Mit geschlossenem Deckel wird die Säule 60 Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert. In diesem Vorgang wird die DNA von weiteren Bestandteilen des Blutes gereinigt. Die Säule wird in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit jeweils 200 µl Waschpuffer AW1 bzw. AW2 60 Sekunden bei 8000 UpM bzw. 180 Sekunden bei 14000 UpM gewaschen.

Es wird ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem Namen der Blutprobe versehen und auf die Säule aufgesteckt. Nach der Zugabe von 200 µl Puffer AE wird 60 Sekunden bei 8000 UpM zentrifugiert und damit die gereinigte DNA von der Membran der Chromatographiesäule in das Aufbewahrungsgefäß gespült. Durch diesen Schritt erhält man 3 bis 12 µg isolierte DNA, die anschließend bei 4 °C aufbewahrt wird.

2.4.2 Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die PCR kann ein kurzer und genau definierter Abschnitt der DNA *in vitro* vervielfältigt werden. Durch dieses Verfahren ist es möglich, den Genabschnitt mit dem zu untersuchenden Polymorphismus *IL17F* p.His161Arg gezielt zu vervielfältigen und nachzuweisen.

Der Vorgang der Polymerase-Ketten-Reaktion wird in drei Schritte unterteilt: die Denaturierung, das Annealing und die Elongation.

Bei der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch die Erhöhung der Temperatur auf etwa 95 °C in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Beim Annealing lagern sich durch Absenkung der Temperatur die im Überschuss zugegebenen Oligonucleotid-Primer an die komplementären Fragmente der DNA an. Anschließend erfolgt die Replikation zweier neuer Doppelstranghelices durch eine hitzestabile DNA-Polymerase des thermostabilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) (Elongation). Durch die Wiederholung von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation kann eine kleine Menge einer definierten DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert werden.

Für die Genotypisierung des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus (rs763780) werden zwei Primer verwendet, von denen je 0,4 µl bzw. 0,8 µl eines Gemisches dem Mastermix zugesetzt werden. Dies entspricht einer Konzentration von 0,4 µM.

Primer	Sequenz
IL-17F vorwärts	5'-GTTCCCATCCAGCAAGAGAC-3'
IL-17F rückwärts	5'-AGCTGGGAATGCAAACAAAC-3'

Tabelle 19: Verwendete Primer

Der Mastermix, der alle Zutaten für die Amplifikation bis auf die DNA enthält, wird in einem 1 ml Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt. Es werden pro Reaktion 12,6 µl nukleasefreies Wasser, 2 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl MgCl₂ (50mM), 0,4 µl dNTP (20 mM), 0,8 µl Primer-Mix, 1 µl DMSO (5%) und 0,2 µl Taq DNA-Polymerase (1 Unit/µl) gemischt. Dem Mastermix werden 2 µl genomische DNA zugesetzt und der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird vorsichtig auf dem Vortex-Rüttler gemischt. Um Verunreinigungen in den Proben zu erkennen, wurde zusätzlich für jeden PCR-Ansatz eine Negativkontrolle hergestellt, die anstatt der DNA der Patienten nur nukleasefreies Wasser enthielt.

Das Gesamtvolumen des Ansatzes beläuft sich auf 20 µl.

Die Inkubation erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

PCR-Programm	Temperatur (in °C)	Zeit (in Sekunden)	Anzahl der Zyklen
Vorlauf	95	180	1
Denaturierung	94	30	40
Annealing	60	30	
Elongation	72	30	
Elongation am Ende	72	300	1

Tabelle 20: Zyklen im Thermocycler

2.4.3 Sequenzierung der DNA

Um zu kontrollieren, ob die Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenz erfolgreich war, wurde das PCR-Produkt mit der Didesoxymethode (Kettenabbruch-Synthese von Sanger et al. 1977) sequenziert und mit der erwarteten Nucleotidfolge verglichen. Die Sequenzierung sowohl des Basenstrangs als auch des komplementären Basenstranges wurde am Institut für Klinische Chemie am Universitätskrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München, Standort Großhadern (Prof. Dr. med. P. Lohse, Leitung der Abteilung für molekulargenetische Diagnostik und Forschung) durchgeführt.

Durch die DNA-Polymerase wird der komplementäre Basenstrang von der bekannten Primer-Sequenz aus ergänzt. Dem Ansatz werden zusätzlich Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) zugegeben, die keine 3'-OH-Gruppe besitzen und als sogenannte „Stoppnukleotide“ bezeichnet werden. Kommt es zu einem Einbau dieser Stoppnukleotide in die DNA, kann die DNA-Polymerase aufgrund der fehlenden OH-Gruppe den Strang nicht fortsetzen, der Strang bricht an dieser Stelle ab und als Produkt entstehen DNA-Stränge unterschiedlicher Länge. Da die ddNTPs jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, können die Stoppnukleotide der einzelnen Kettenabbrüche sichtbar gemacht und analysiert werden. Die somit erhaltene Sequenz der abgebrochenen DNA-Ketten entspricht denen des zu sequenzierenden DNA-Stranges und die Basensequenz kann mit der erwarteten Sequenz verglichen werden.

2.4.4 Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese ist es möglich, die PCR-Produkte nach ihrer Größe aufzutrennen und sie anschließend im UV-Licht sichtbar zu machen.

In der vorliegenden Arbeit wird ein 1,5 %-iges Agarosegel verwendet, dass aus 3,75 g Agarose, 250 ml TAE-Puffer und 12,5 µl des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (10 mg/ml) hergestellt wird.

4 µl des PCR-Ansatzes werden mit 1 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Der Ladepuffer besteht aus Glycerin und dem Farbstoff Bromphenolblau, der in der Lichtkammer zu erkennen ist. Um die PCR-Produkte mit einem Längenstandard vergleichen zu können, wird in die erste Tasche des Geles entsprechend 5 µl eines DNA-Längenstandards gegeben. Nach der Füllung aller Taschen mit den PCR-Produkten wird für 20 Minuten eine Spannung von 160 V an das Agarosegel angelegt und dieses anschließend in der UV-Lichtkammer fotografiert. Die Banden der PCR-Produkte sollten bei 412 Basenpaaren (bp) liegen. Sollte dies nicht der Fall sein oder lagen Verunreinigungen vor, musste der Vorgang der PCR erneut durchgeführt werden. Bei der erfolgreichen Amplifikation sieht das Ergebnis wie folgt aus:

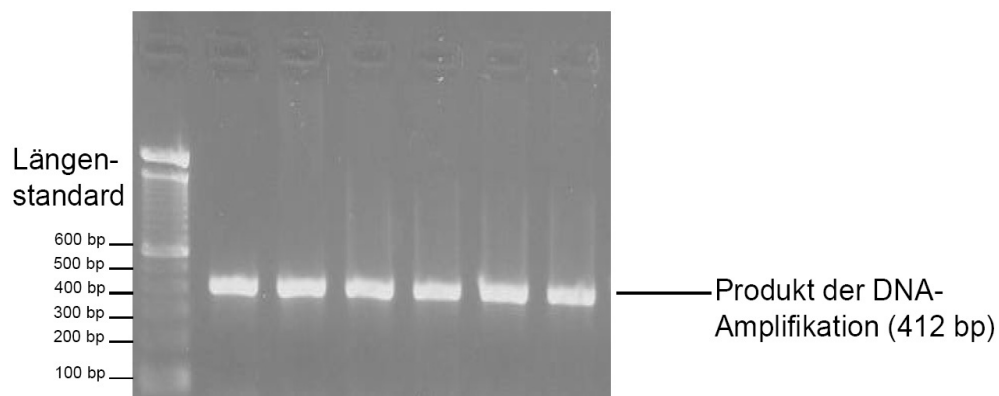


Abbildung 6: Gelelektrophorese nach erfolgreicher Amplifikation der DNA. Links ist der DNA-Längenstandard aufgetragen, der zur Messung der Fragmentlänge der PCR-Produkte dient. Die entsprechende Anzahl der bp ist markiert. Die Markierungen auf Höhe von 412 bp zeigen die Banden der DNA-Fragmente, die nach der DNA-Fragmentation entstanden sind.

Links ist der DNA-Längenstandard aufgetragen, der zur Messung der Fragmentlänge der PCR-Produkte dient. Die entsprechende Anzahl der bp ist markiert. Die Markierungen auf Höhe von 412 bp zeigen die Banden der DNA-Fragmente, die nach der DNA-Fragmentation entstanden sind.

2.4.5 Genotypisierung des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus

Für die Genotypisierung des Austausches der Base C->T, die die Grundlage des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus' bildet, wurde die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-(RFLP)-Analyse nach Lundberg et al. angewendet. Durch die Mutation von C->T geht die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NlaIII (New England BioLabs, Frankfurt) verloren und es entstehen je nach Genotyp unterschiedlich lange Restriktionsfragmente. Besitzt nur ein Chromosom die C->T Mutation, wird der Genotyp als heterozygot bezeichnet (CT), kommt die Mutation auf beiden Chromosomen vor, so ist die Zelle homozygot (TT). Liegt keine Mutation der Chromosomen vor, wird dies als Wildtyp (CC) bezeichnet.

Für den Verdau wird, ebenfalls wieder auf Eis, die Mischung folgender Reagenzien in ein 1 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

nukleasefreies Wasser	12,7 µl
NEB - Puffer 4	2 µl
BSA	0,2 µl
NlaIII	0,1 µl
PCR-Ansatz	5 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	20 µl

Das Restriktionsenzym NlaIII wird in einer Gesamtkonzentration von 1 U/ml eingesetzt und schneidet die DNA nach der Erkennungssequenz CATG. Der Verdau wird im Thermocycler bei 37 °C über Nacht, mindestens aber sechs Stunden, inkubiert.

Danach werden für die Gelelektrophorese 2 µl Ladepuffer zu dem Verdau gegeben und 10 µl davon werden in die Taschen eines 1,5 %-igen Agarosegeles pipettiert. Nach der Füllung aller Taschen wird für 20 Minuten eine Spannung von 160 V an das Agarosegel angelegt und dieses anschließend in der UV-Lichtkammer fotografiert.

Nach dem Verdau der PCR-Produkte sind durch die Gelelektrophorese drei unterschiedliche Ergebnisse möglich:

Handelt es sich um einen Wildtyp mit intakter NlaIII-Schnittstelle, so sind zwei Banden bei 288 und bei 124 bp sichtbar. Bei der heterozygoten Mutation werden bei 412, 288 und 124 bp insgesamt drei Banden deutlich und bei der homozygoten Chromosomenveränderung kann das Restriktionsenzym das DNA-Fragment nicht schneiden und das PCR-Produkt bleibt unverdaut. Es wird nur eine Bande bei 412 bp sichtbar. Die Abbildung 7 gibt das Bild der Gelelektrophorese in der UV-Lichtkammer wieder:

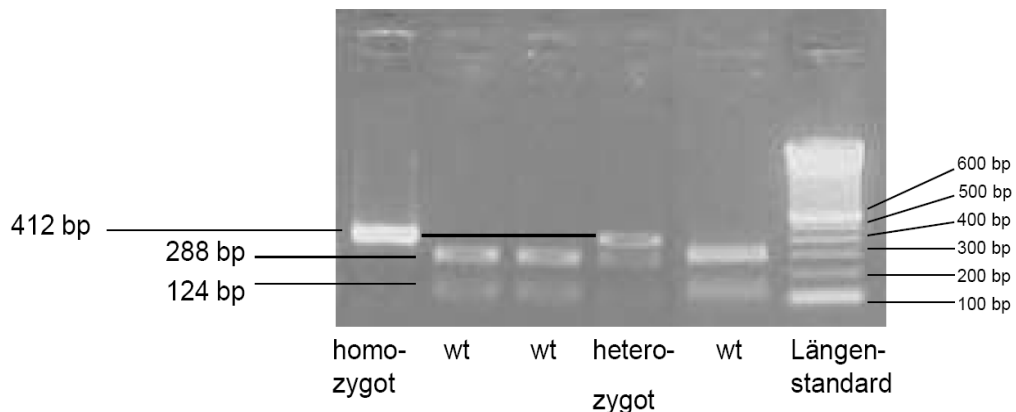


Abbildung 7: Gelelektrophorese der Genotypisierung. Rechts ist der DNA-Längenstandard aufgetragen, der zur Messung der Fragmentlänge der PCR-Produkte dient. Die entsprechende Anzahl der bp ist markiert. Bei der homozygoten Genvariante ist eine einzige Bande bei 412 bp sichtbar, beim Wildtyp (wt) sind zwei Banden bei jeweils 288 und 124 bp sichtbar, das Ergebnis bei einer heterozygoten Genvariante zeigt drei Banden bei 412, 288 und 124 bp.

Rechts ist der DNA-Längenstandard aufgetragen, der zur Messung der Fragmentlänge der PCR-Produkte dient. Die entsprechende Anzahl der bp ist markiert. Bei der homozygoten Genvariante ist eine einzige Bande bei 412 bp sichtbar, beim Wildtyp (wt) sind zwei Banden bei jeweils 288 und 124 bp sichtbar, das Ergebnis bei einer heterozygoten Genvariante zeigt drei Banden bei 412, 288 und 124 bp.

Die drei wichtigsten Varianten des *NOD2*-Gens p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 wurden durch eine direkte Sequenzanalyse der DNA von Schnitzler 2006 beschrieben [Schnitzler 2006]. Die Daten für die hauptsächlich mit M. Crohn assoziierten Varianten des *IL23R*-Gens (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026 = p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965) wurden von Duerr et al. 2006 beschrieben und sind für alle Patienten der vorhergehenden Studie verfügbar [Duerr 2006, Glas 2007].

2.4.6 Phänotypisierung der Studienpopulation

Anhand eines Erhebungsbogens in Kapitel 7.2 wurden die phänotypischen Merkmale der Patienten aufgenommen. Die Diagnose M. Crohn oder C. ulcerosa wurde anhand der gängigen Leitlinien getroffen, die auf endoskopischen, histopathologischen und radiologischen Kriterien [Lennard-Jones 1989] basieren. Die M. Crohn-Patienten wurden entsprechend der Montreal-Klassifikation [Satsangi 2006] eingeteilt, die auf folgenden Kriterien beruht: Alter bei Diagnosestellung (A), Lokalisation des Befalls (L) und Verhalten der Erkrankung (B).

Bei den C. ulcerosa-Patienten wird ebenfalls nach der Montreal-Klassifikation in die ulzerierende Proktitis (E1), auf das linke Kolon beschränkte C. ulcerosa (distale C. ulcerosa, E2) und in die ausgedehnte C. ulcerosa (Pancolitis, E3) unterschieden. Patienten mit einer Colitis indeterminata wurden von der Studie ausgeschlossen.

Von der untersuchten Kontrollgruppe sind lediglich die Angaben über das Geschlecht und das Alter bekannt.

Weitere, für die Auswertung relevante phänotypische Merkmale, wurden ebenfalls mit dem Erhebungsbogen erfasst:

- Geschlecht
- Alter zum Studienzeitpunkt
- BMI (errechnet aus Körpergröße und Körpergewicht)
- Raucher (ja/nein/Ex-Raucher)
- Verwendung von Immunsuppressiva und Biologika
- Operationen aufgrund der Erkrankung
- Auftreten von Fisteln, Stenosen, Abszessen
- Extraintestinale Manifestationen
- Positive Familienanamnese

Im nächsten Schritt wurden die genotypischen Ausprägungen mit dem Auftreten phänotypischer Patientenmerkmale korreliert.

2.4.7 Genotyp-Phänotyp-Analyse der typischen Krankheitsmerkmale

Für die Genotyp-Phänotyp-Analyse der allgemeinen Krankheitsmerkmale wurden folgende Merkmale der Studienpopulation herangezogen:

- Anzahl der männlichen Patienten

- BMI
- Alter der Patienten bei Diagnosestellung (A1-A3 nach Montreal-Klassifikation)
- Dauer der Erkrankung
- Alter der Patienten

Diese Merkmale wurden mit dem Vorkommen der Genotypen Wildtyp, Heterozygot oder Homozygot korreliert und der Signifikanzwert mittels der Berechnung des p-Wertes sowie der Odds Ratio (OR) zwischen dem Wildtypen und den Heterozygoten bzw. zwischen dem Wildtypen und der Summe aus Hetero- und Homozygoten berechnet.

Zur Erhebung der Genotyp-Phänotyp-Analyse der charakteristischen Krankheitsmerkmale wurden folgende charakteristischen Krankheitsmerkmale mit Hilfe des Fragebogens und anhand der Patientenakten [siehe Kapitel 7.2] korreliert:

- Alter bei Diagnosestellung nach Montreal-Klassifikation [Satsangi 2006]
M. Crohn / C. ulcerosa: A1 = <16 Jahre, A2 = 17-40 Jahre, A3 = > 40 Jahre
- Lokalisation der Erkrankung nach Montreal-Klassifikation
M. Crohn: L1= Terminales Ileum, L2= Kolon, L3= Ileocolon, L4= Oberer GI
- C. ulcerosa: E1= Proctitis, E2= linksseitige C. ulcerosa, E3= ausgedehnte C. ulcerosa)
Ausprägungen der Erkrankung nach Montreal-Klassifikation
- Nicht strikturierend, B1= nicht penetrierend, B2= strikturierend, B3= penetrierend
- Verwendung von immunsuppressiven Medikamenten

Diese Merkmale wurden mit dem Vorkommen der Genotypen Wildtyp, Heterozygot oder Homozygot korreliert und der Signifikanzwert, der p-Wert, sowie die zwischen dem Wildtypen und den Heterozygoten bzw. zwischen den Wildtypen und der Summe aus Hetero- und Homozygoten berechnet.

2.5 Analyse bezüglich der Epistasis zwischen *IL17F*-, *IL23R*- und *NOD2*-Genen bei Patienten mit CED

Für die Beurteilung der Epistasis wurden folgende drei Hauptvarianten von *NOD2* durch eine direkte DNA-Sequenzierung detektiert: p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008. Die Methode wurde bereits oben beschrieben. Von den von Duerr et al. [Duerr 2006] beschriebenen 10 häufigsten mit M. Crohn assoziierten

IL23R-Varianten (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026 = p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965) waren bereits Daten aus einer vorhergehenden Studie verfügbar [Glas 2007].

2.6 Entnahme von Biopsien der Darmschleimhaut

Die Untersuchung des Darmgewebes wurde nach vorheriger schriftlicher Einverständniserklärung an den Probanden mit M. Crohn und C. ulcerosa vorgenommen. Es wurden insgesamt vier Biopsien entnommen, davon zwei an makroskopisch nicht-entzündeten Stellen und zwei an makroskopisch sichtbaren Entzündungen der Darmschleimhaut. In jeder der Biopsie wurde die Menge an IL-17F getrennt erfasst. Für die Quantifizierung wurde die durchschnittliche IL17-mRNA Menge der beiden nicht-entzündlichen Stellen mit der durchschnittlichen IL-17F-Expression der zwei entzündeten Stellen verglichen.

2.7 Statistische Auswertung

Die im Ergebnisteil aufgeführten Daten wurden mit Hilfe verschiedener statistischer Tests erarbeitet. Für den statistischen Vergleich zwischen den nominalen Variablen, wie z.B. das Geschlecht, wurde je nach Stichprobengröße der Fisher's Exakt-Test, oder der Chi-Quadrat χ^2 -Test, angewendet. Für den univariante allelischen Test wurde der Pearson's χ^2 -Test angewendet. Der Student t-Test wurde zur Auswertung der quantitativen Variablen angewendet. Alle Tests sind zweiseitig, unter der Annahme, dass p-Werte $<0,05$ signifikant sind. Die Odds ratio (OR) gibt an, wie hoch das Chancenverhältnis ist, dass ein Merkmal von zwei möglichen für eine der beiden Gruppen vorliegt. Für das seltene Allel und somit das heterozygote oder homozygote Vorkommen eines jeden SNPs wurde die OR berechnet. Da beim Testen von multiplen Vergleichen Fehler der 1. oder 2. Ordnung auftreten können, werden die Ergebnisse nach Bonferroni korrigiert und das globale α -Niveau gleichmäßig auf die Einzeltests verteilt. Die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Polymorphismen wurden mit der logistischen Regression in R getestet. Dazu wurde die Anzahl der seltenen Allele als Wirkungsvariable verwendet. Durch dieses Vorgehen ist die Anwendung des Armitage-Tests notwendig. Die Kontrollgruppe wurde getestet, ob sie sich in Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchten Genvarianten im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes lässt sich die Häufigkeit eines Allels in einer Population

berechnen. Dazu müssen die Häufigkeiten der jeweiligen Genotypen bekannt sein oder, bei bekannter Allelfrequenz, die Häufigkeit eines Genotyps.

Die Daten wurden mit Hilfe der Verwendung von SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) und R-2.4.1. (<http://cran.r-projekt.org>) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten der Studienpopulation

Insgesamt wurden die Blutproben von 1682 Probanden für diese Arbeit untersucht, deren demographische Daten in Tabelle 21 übersichtlich zusammengestellt sind.

Im Einzelnen wurden 499 Probanden mit M. Crohn, 216 mit C. ulcerosa und 967 Kontrollpatienten untersucht. Diese waren im Mittel 39,5, 42,6 und 47,4 Jahre (M. Crohn, C. ulcerosa, Kontrollen) alt. Der BMI betrug im Mittel 23,2 und 23,9 (M. Crohn, C. ulcerosa). Das Alter bei Diagnosestellung betrug im Durchschnitt 27,7 und 31,1 Jahre (M. Crohn, C. ulcerosa) und die Dauer der Erkrankung betrug 11,8 bzw. 10,5 Jahre (M. Crohn, C. ulcerosa). Eine positive Familienanamnese war bei jeweils 15,9% der Erkrankten zu erheben.

	Patienten mit M. Crohn (n=499)	Patienten mit C. ulcerosa (n=216)	Gesunde Kontrollgruppe (n=967)
Geschlecht			
männlich (%)	47,7	50,9	63,0
weiblich (%)	52,3	49,1	37,0
Alter (in Jahren)			
Mittelwert ± SD	39,5 ± 13,0	42,6 ± 14,8	47,4 ± 11,3
Spannweite	10-80	17-85	
BMI (in kg/m²)			
Mittelwert ± SD	23,2 ± 4,2	23,9 ± 4,1	Keine Angaben
Spannweite	13-40	15-41	
Alter bei Diagnosestellung	(in Jahren)		gesund
Mittelwert ± SD	27,7 ± 11,9	31,1 ± 13,0	
Spannweite	1-78	9-81	

	Patienten mit M. Crohn (n=499)	Patienten mit C. ulcerosa (n=216)	Gesunde Kontrollgruppe (n=967)
Dauer der Erkrankung	(in Jahren)		
Mittelwert \pm SD	11,8 \pm 8,4	10,5 \pm 7,9	gesund
Spannweite	0-40	1-40	
Positive CED- Familienanamnese (%)	15,9	15,9	gesund

Tabelle 21: Demographische und klinische Charakterisierung der CED Studienpopulation

3.2 Analyse der Genotypen: Verteilung der Häufigkeit der *IL17F*-Allele

Im nächsten Schritt wurde der mögliche Zusammenhang des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus mit der Prävalenz für das Auftreten eines M. Crohn oder einer C. ulcerosa untersucht.

Insgesamt wurden 1682 Patientenproben auf das Vorliegen des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus untersucht. Von den 967 Patienten der Kontrollgruppe trugen insgesamt 876 Personen (90,5 %) den Wildtyp. Heterozygot waren 88 Individuen (9,2 %) und 3 (0,3 %) waren homozygote Träger des Polymorphismus.

Von den 499 Patienten, die an M. Crohn erkrankt waren, trugen 454 (91,0 %) den Wildtyp, 42 (8,4 %) waren heterozygot und 3 Patienten (0,6 %) trugen die homozygote Variante des Polymorphismus [zur Übersicht siehe Tabelle 22].

190 (88,0 %) der insgesamt 216 an C. ulcerosa erkrankten Patienten trugen den Wildtyp, 26 (12,0 %) waren heterozygot und keiner der Patienten trug die homozygote Variante des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus.

Im Vergleich der Patienten, die an einer CED litten und der gesunden Kontrollgruppe, konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus verzeichnet werden.

Die oben beschriebenen Ergebnisse sind in Tabelle 22 übersichtlich zusammengefasst.

<i>IL17F</i> Genotyp	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
p.His161Arg	His/His	His/Arg	Arg/Arg
Polymorphismus			
Kontrollen (n=967)	876 (90,5%)	88 (9,2%)	3 (0,3%)
M. Crohn (n=499)	454 (91,0%)	42 (8,4%)	3 (0,6%)
C. ulcerosa (n=216)	190 (88,0%)	26 (12,0%)	0 (0,0%)
n _{gesamt} = 1682			

Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus in der Studienpopulation (Kontrollgruppe, M. Crohn, C. ulcerosa)

3.3 Vergleich zwischen den Varianten des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und den phänotypischen Merkmalen

Im nächsten Schritt wurden die genotypischen Eigenschaften mit den phänotypischen Merkmalen der Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa verglichen.

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

Zusammenfassend zeigte die Genotyp-Phänotyp-Analyse bei Patienten mit M. Crohn, dass in Bezug auf die allgemeinen Merkmale keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Genotyp-Phänotyp-Analyse auftraten.

Innerhalb der männlichen Gruppe trat der Wildtyp nicht signifikant häufiger als der heterozygote ($p=0,075$) oder hetero- und homozygote Typ zusammen auf (0,163).

Der BMI war weder innerhalb der Ausprägung eines Wildtyps im Vergleich zu einem Heterozygoten ($p=0,776$) noch im Vergleich zu den Hetero- und Homozygoten gemeinsam ($p=0,960$) signifikant verändert.

Das Alter bei Diagnosestellung ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Wildtypen mit den Heterozygoten ($p=0,863$) und im Vergleich der Wildtypen mit den Hetero- und homozygoten ($p=0,665$) Trägern des Polymorphismus. Die Dauer der Erkrankung und das Alter bei der Erstmanifestation eines M. Crohn variierte im Vergleich der Wildtypen mit den Heterozygoten ($p=0,613$ bzw. 0,443) und den Hetero- und Homozygoten gemeinsam ($p=0,540$ bzw. 0,578), nicht signifikant.

Die Tabelle 23 gibt eine detaillierte Übersicht über die allgemeinen phänotypischen Merkmale und die dazugehörigen Signifikanzwerte in Bezug auf das Auftreten eines Polymorphismus.

	(1)	(2)	(3)	(1) vs (2)	(1) vs (2)+(3)
	Wildtyp His/His	Heterozygot His/Arg	Homozygot Arg/Arg	p-Wert OR	p-Wert OR
Merkmale	<i>(n=454)</i>	<i>(n=42)</i>	<i>(n=3)</i>		
Männliches Geschlecht					
n= (%)	212 / 454 (46,7%)	26 / 42 (61,9%)	0 / 3 (0,0%)	0,075 1,85 (0,97-3,55)	0,163 1,56 (0,84-2,90)
BMI (in kg/m²)					
Mittelwert ± SD	23,2 ± 4,3	23,4 ± 4,2	19,5 ± 2,1	0,776	0,960
Range	13-40	16-32	18-21		
Alter bei Diagnosestellung (in Jahren)					
Mittelwert ± SD	27,6 ± 11,7	28,0 ± 13,8	36,0 ± 20,7	0,863	0,665
Range	1-78	13-66	17-58		
Dauer der Erkrankung (in Jahren)					
Mittelwert ± SD	11,9 ± 8,4	11,2 ± 8,3	9,7 ± 8,0	0,613	0,540
Range	0-40	1-33	2-18		
Alter (in Jahren)					
Mittelwert ± SD	39,6 ± 12,9	37,9 ± 14,0	45,7 ± 12,9	0,443	0,578
Range	10-80	16-71	35-60		

Tabelle 23: Genotyp-Phänotyp-Analyse der allgemeinen Merkmale bei Patienten mit M. Crohn.

In der Genotyp-Phänotyp-Analyse konnte innerhalb der charakteristischen Krankheitsmerkmale bei M. Crohn in Bezug auf das Vorkommen des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus mit $p > 0,05$ keine Signifikanz der erhobenen Merkmale gezeigt werden.

Insgesamt wurden 381 Patienten mit dem Wildtyp, 36 mit einer heterozygoten und 3 mit einer homozygoten Variante des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus erfasst, die entsprechende Übersicht über die Ergebnisse gibt Tabelle 10.

Alter bei Diagnosestellung

Im Vergleich zwischen dem Wildtyp und den heterozygoten Trägern errechnete sich in der Gruppe A1 (<17Jahre) ein p-Wert von 0,787, in der Gruppe A2 (17-40 Jahre) ein p-Wert von 0,226 und in der Gruppe A3 (>40 Jahre) ein p-Wert von 0,196.

Im Vergleich des Wildtypen mit der Summe der hetero- und homozygoten Trägern betrug der p-Wert in der Gruppe A1 (<17 Jahre) 0,797, in der Gruppe A2 (17-40 Jahre) 0,241 und in der Gruppe A3 (> 40 Jahre) 0,136.

Lokalisation

Bei der Lokalisation wurde in folgende Kategorien unterschieden: L1 terminales Ileum, L2 Kolon, L3 Ileokolon, L4 oberer Gastrointestinaltrakt und sonstige Beteiligung des Ileums. Im Vergleich des Vorkommens des Wildtyps und der Heterozygoten Träger betrugen die p-Werte innerhalb von L1 0,634, bei L2 0,073, bei L3 0,095, bei L4 1,000 und an sonstigen Beteiligungen des Ileum 0,145. Im Vergleich des Wildtyps mit der Summe der Hetero- und Homozygoten betrugen die p-Werte bei L1 0,654, bei L2 0,090, bei L3 0,206, bei L4 1,000 und bei den sonstigen Beteiligungen des Ileums 0,169.

Ausprägung

Bei der Ausprägung wurde in B1 keine Stenosen, keine Perforation, in B2 Stenosen und in B3 Perforationen unterschieden. Die p-Werte im Vergleich von Wildtyp zu Heterozygoten waren bei B1 0,389 bei B2 0,140 und bei B3 0,282. Im Vergleich vom Wildtyp zu der Summe aus Heterozygoten und Homozygoten betrug der p-Wert bei B1 0,407, bei B2 0,100 und bei B3 0,227.

Verwendung von Immunsuppressiva

Im Vergleich von Trägern des Wildtyps mit den heterozygoten Trägern des Polymorphismus betrug der p-Wert bei der Verwendung von Immunsuppressiva 0,120 und im Vergleich des Wildtyps mit der Summe aus hetero- und homozygoten Trägern betrug $p=0,199$.

Die oben beschriebenen Ergebnisse sind in der Tabelle 24 zusammengefasst:

	(1)	(2)	(3)	(1) vs. (2)	(1) vs (2)+(3)
	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot	p-Wert	p-Wert
	His/His	His/Arg	Arg/Arg	OR	OR
	<i>(n=381)</i>	<i>(n=36)</i>	<i>(n=3)</i>		
Alter bei Diagnosestellung					
A1 <17 Jahre	45 / 381	5 / 36	0 / 3	0,787	0,797
	(11,8%)	(13,9%)	(0,0%)	1,20 (0,44-3,26)	1,10 (0,41-2,95)
A2 17-40 Jahre	290 / 381	24 / 36	2 / 3	0,226	0,241
	(76,1%)	(66,7%)	(66,7%)	0,63 (0,30-1,30)	0,63 (0,31-1,27)
A3 >40 Jahre	46 / 381	7 / 36	1 / 3	0,196	0,136
	(12,1%)	(19,4%)	(33,3%)	1,76 (0,73-4,24)	1,88 (0,81-1,27)
Lokalisation					
Terminales Ileum (L1)	60 / 379	7 / 36	0	0,634	0,654
	(15,8%)	(19,4%)	(0,0%)	1,39 (0,62-3,10)	1,16 (0,49-2,76)

Kolon (L2)	49 / 379 (12,9%)	9 / 36 (25,0%)	0 (0,0%)	0,073 2,24 (1,00-5,06)	0,090 2,02 (0,90-4,51)
Ileocolon (L3)	263 / 379 (69,4%)	20 / 36 (55,6%)	3 / 3 (100%)	0,095 0,55 (0,28-1,10)	0,206 0,63 (0,32-1,24)
Oberer Gastro-intestinal-trakt (L4)	7 / 379 (1,8%)	0 / 36 (0%)	0 (0,0%)	1,000 N/A	1,000 N/A
Sonstige Beteiligung des Ileum	323 / 379 (85,2%)	27 / 36 (75,0%)	3 / 3 (100%)	0,145 0,52 (0,23-1,169)	0,169 0,58 (0,26-1,28)
Ausprägung					
Keine Stenosen keine Perforation (B1)	72 / 361 (19,9%)	9 / 34 (26,5%)	1 / 3 (33,3%)	3 0,389 1,39 (0,62-3,10)	0,407 1,38 (0,64-2,96)
Stenosen (B2)	106 / 361 (29,4%)	4 / 34 (11,8%)	0 / 3 (0,0%)	0,140 0,44 (0,15-1,27)	0,100 0,40 (0,14-1,15)
Perforationen (B3)	183 / 361 (50,7%)	21 / 34 (61,8%)	2 / 3 (66,7%)	0,282 1,57 (0,76-3,23)	0,227 1,60 (0,80-3,20)

Verwendung von Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab)					
300 / 368	25 / 36	3	0,120	0,199	
(81,5%)	69,4%)	(100%)	0,51	0,58	
			(0,24-1,10)	(0,27-1,22)	

Tabelle 24: Zusammenhang zwischen dem *IL17F*-Genotyp und den für M. Crohn charakteristischen Krankheitsmerkmalen.

3.3.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse bei Patienten mit *C. ulcerosa*

Bei der Genotyp-Phänotyp-Analyse der Patienten mit *C. ulcerosa* konnten bei zwei Merkmalen, dem BMI und dem Alter bei Diagnosestellung, signifikante Zusammenhänge mit dem Auftreten des Polymorphismus dargestellt werden. Einer der signifikanten Unterschiede ($p=0,039$) ließ sich zwischen dem Wildtyp und dem heterozygoten Polymorphismus *IL17F* p.His161Arg innerhalb der *C. ulcerosa* Patienten finden. In dieser Population trat die Erkrankung in einem signifikant früheren Alter ($26,8 \pm 9,4$ Jahre) auf, als bei Patienten mit dem Wildtyp ($31,7 \pm 13,4$ Jahre). Des Weiteren war bei den heterozygoten Patienten mit *C. ulcerosa* ein signifikant ($p=0,009$) niedriger BMI ($22,2 \text{ kg/m}^2$) als bei den Wildtyp Patienten ($24,2 \text{ kg/m}^2$) messbar.

Die phänotypischen Merkmale derjenigen Patienten, die an einer *C. ulcerosa* erkrankt waren, wurden ebenfalls ausgewertet und hinsichtlich des Auftretens des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus untersucht.

In die Genotyp-Phänotyp-Analyse wurden insgesamt 216 Patienten mit *C. ulcerosa* eingeschlossen, deren phänotypischen Merkmale (Anzahl der männlichen Patienten, BMI, Alter der Patienten bei Diagnosestellung, Dauer der Erkrankung und Alter der Patienten) erhoben wurden. Insgesamt wurden 190 Patienten mit dem Wildtyp und 26 mit einer heterozygoten Variante des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus erfasst. Innerhalb der an *C. ulcerosa* erkrankten Patienten gab es keinen homozygoten Träger des Polymorphismus. Der Vergleich in Bezug auf das Verhältnis männlich zu weiblich, die Dauer der Erkrankung, Familienanamnese, Lokalisation der Erkrankung (Pancolitis, Befall des Kolons bis zur linken Flexur oder auf das Rektum beschränkt), *C. ulcerosa* assoziierte Erkrankungen (Stenosen, Abszesse, OP-Indikationen,

extraintestinale Manifestationen) und die Notwendigkeit, eine immunsuppressive Therapie durchzuführen, ergab in Bezug auf diese Merkmale keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit dem Wildtyp und den Heterozygoten.

Im Einzelnen wurden folgende Merkmale untersucht:

Männliches Geschlecht

Von den 190 Patienten, bei denen der Wildtyp des Polymorphismus auftrat, waren 94 männlich (49,5%) und 16 von 26 heterozygoten Trägern waren männlich (61,5%). In dem Vergleich dieser beiden Genvarianten errechnete sich ein p-Wert von 0,298 und damit kein signifikanter Unterschied.

BMI

Der BMI innerhalb der Gruppe des Wildtyps betrug 24,3 mit einer Standardabweichung von 4,2, innerhalb der heterozygoten Gruppe betrug der BMI 22,2, bei einer Standardabweichung von 2,7. Der p-Wert des Vergleichs der beiden Genotypen lag bei 0,009 und war damit signifikant.

Alter bei Diagnosestellung

Das Alter bei Diagnosestellung lag innerhalb der Gruppe der Wildtypen bei 31,7 Jahren mit einer Standardabweichung von 13,4 Jahren. Bei der heterozygoten Variante lag das Alter bei 26,8 Jahren und bei einer Standardabweichung von 9,5 Jahren. Im Vergleich der beiden genetischen Varianten wurde ein signifikanter p-Wert von 0,039 errechnet. Innerhalb der Altersgruppe A1 <17 Jahre ergab sich für den Vergleich der Wildtypen mit den Heterozygoten ein p-Wert von 0,651, innerhalb A2 17-40 Jahre der p-Wert von 0,787 und innerhalb der Gruppe A3 >40 Jahre der ebenfalls nicht signifikante p-Wert von 0,536.

Dauer der Erkrankung

Die mittlere Krankheitsdauer betrug beim Wildtyp 10,4 Jahre (Standardabweichung 8,0 Jahre) und bei den Heterozygoten bei 10,6 Jahren (Standardabweichung 7,2 Jahre). Bei dem Vergleich ergab sich ein p-Wert von 0,905.

Alter in Jahren

Das mittlere Alter betrug bei den Patienten mit der Ausprägung des Wildtyps 43,3 Jahre (Standardabweichung 15,3) und bei den Patienten mit der heterozygoten

Genvariante 37,8 Jahre (Standardabweichung). Im Vergleich des Wildtyps mit dem Heterozygoten errechnete sich ein signifikanter p-Wert von 0,015.

Lokalisation

Bei der Lokalisation der C. ulcerosa ergab sich kein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich von Wild- und Phänotyp. Der Unterschied lag bei der Gruppe E1 ulzerierende Proktitis mit $p=1,000$, bei E2 linksseitige C. ulcerosa bei $p=0,650$ und bei E3 Pancolitis mit $p=0,652$.

Verwendung von Immunsuppressiva

Insgesamt verwendeten 121 von 154 Wildtyp-Patienten und 16 von 22 der Gruppe der Heterozygoten Immunsuppressiva. In dem Vergleich der beiden Gruppen ergab sich ein nicht signifikanter p-Wert von 0,584.

Die oben ausführlich beschriebenen Ergebnisse sind in der Tabelle 25 zusammengefasst:

	Wildtyp His/His (n=190)	Heterozygot His/Arg (n=26)	p-Wert OR
Allgemeine Merkmale			
Männliches Geschlecht			
n= (%)	94 / 190 (49,5%)	16 / 26 (61,5%)	0,298 1,63 (0,71-3,78)
BMI (kg/m²)			
Mittelwert ± SD	24,2 ± 4,2	22,2 ± 2,7	0,009
Range	15-41	16-27	
Alter bei Diagnosestellung (in Jahren)			
Mittelwert ± SD	31,7 ± 13,4	26,8 ± 9,4	0,039
Range	9-81	16-47	

Dauer der Erkrankung (in Jahren)			
Mittelwert \pm SD	10,4 \pm 8,0	10,6 \pm 7,2	0,905
Range	1-40	1-24	
Alter (in Jahren)			
Mittelwert \pm SD	43,3 \pm 15,3	37,8 \pm 9,5	0,015
Range	17-85	21-56	
Lokalisation			
Ulzerierende Proktitis (E1)	14 / 153 (9,2%)	2 / 22 (9,1%)	1,000 0,99 (0,21-4,70)
Linksseitige C. ulcerosa (E2)	65 / 153 (42,5%)	8 / 22 (36,4%)	0,650 0,77 (0,31-1,95)
Pancolitis (E3)	74 / 153 (48,6%)	12 / 22 (54,6%)	0,652 1,28 (0,52-3,14)
Alter bei Diagnosestellung			
A1 <17 Jahren	10 / 152 (6,6%)	2 / 22 (9,1%)	0,651 1,42 (0,29-6,95)
A2 17-40 Jahre	116 / 152 (76,3%)	18 / 22 (81,8%)	0,787 1,40 (0,44-4,39)
A3 >40 Jahre	26 / 152 (17,1%)	2 / 22 (9,1%)	0,536 0,48 (0,11-2,20)
Verwendung von Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab)			
	121 / 154 (78,6%)	16 / 22 (72,7%)	0,58

Tabelle 25: Zusammenhang zwischen dem IL17F-Genotyp und den für C. ulcerosa charakteristischen Krankheitsmerkmalen

3.4 Analyse auf Epistasis zwischen *IL17F*, *IL23R* und *NOD2*-Genen bei Patienten mit CED

In einem letzten Schritt wurde die genetische Interaktion zwischen verschiedenen Gen-Loci untersucht. Es wurden die drei hauptsächlich mit M. Crohn assoziierten *NOD2*-Mutationen p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 und 10 ebenfalls mit dem M. Crohn assoziierte *IL23R*-Varianten auf die genetische Interaktion mit dem *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus hin überprüft. In den drei Studiengruppen (M. Crohn, C. ulcerosa und Kontrollgruppe) stimmten die Häufigkeiten der analysierten *NOD2*- und *IL23R*-Varianten mit dem Hardy-Weinberg-Equilibrium überein. Es wurde weder beim M. Crohn noch bei C. ulcerosa eine Evidenz für eine genetische Interaktion zwischen dem *IL17F*-p.His161Arg-Polymorphismus und der *IL23R*-Variante gefunden.

Eine *signifikante* Interaktion wurde zwischen dem *IL17F*-p.His161Arg-Polymorphismus und der p.Gly908Arg-*NOD2*-Variante bei Patienten mit M. Crohn entdeckt. Der p-Wert betrug 0,01, durch die Korrektur für multiples Testen lies sich dieser signifikante Unterschied aber nicht erhärten.

3.5 Analyse der intestinalen IL-17F-mRNA-Expression bei CED

Insgesamt wurden 96 Biopsien, die von jeweils 12 Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa stammten, auf die Expression intestinaler IL-17F-mRNA hin untersucht. Zwei Biopsien stammten jeweils von einer makroskopisch entzündeten Stelle der Kolonschleimhaut, zwei Proben stammten aus makroskopisch nicht entzündeten Bereichen der Darmschleimhaut. Als Kontrollmarker für eine vorliegende Entzündung wurde IL-8-mRNA verwendet. Die IL-8-Expression war in den makroskopisch entzündeten Biopsien im Vergleich zu den Biopsien aus den gesunden Bereichen der Biopsien signifikant erhöht ($p < 0,05$). Der IL-8-Spiegel war bei den Patienten mit M. Crohn um das 3,7-fache und bei Patienten mit C. ulcerosa um das 3,3-fache erhöht.

Die Expression der IL-17F-mRNA in den Biopsien aus entzündeten Geweben war bei den Patienten mit M. Crohn um das 4,4 -fache im Vergleich zu den nicht-entzündeten Biopsien signifikant erhöht ($p = 0,016$). Innerhalb der Gewebeproben bei Patienten mit C. ulcerosa ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,377$).

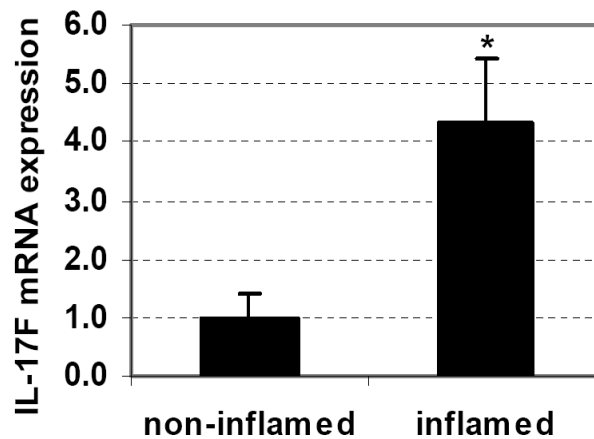


Abbildung 8: Bei den Patienten mit Morbus Crohn war die Expression der IL-17F-mRNA in den entzündeten (inflamed) Gewebeproben um das 4,4-fache (Balken rechts) im Vergleich zu den nicht-entzündeten Gewebeproben (non-inflamed, Balken links) erhöht. Der p-Wert beträgt 0,016 und der Unterschied ist damit signifikant.

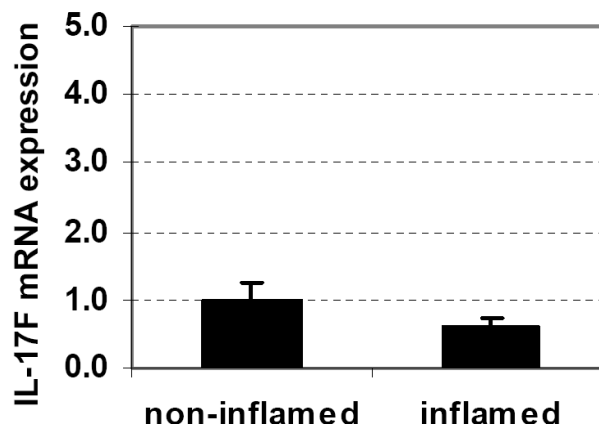


Abbildung 9: Innerhalb der Patienten mit C. ulcerosa fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der IL-17F-mRNA im Vergleich der entzündeten (inflamed) Gewebeproben mit den nicht-entzündeten (non-inflamed) Proben. Der p-Wert beträgt für diesen Vergleich 0,377.

Absolut betrachtet war die Expression der intestinalen IL-17F-mRNA bei Patienten mit C. ulcerosa (rechter Balken) signifikant höher als bei Patienten mit M. Crohn (linker Balken). Der p-Wert beträgt $p < 0,0001$.

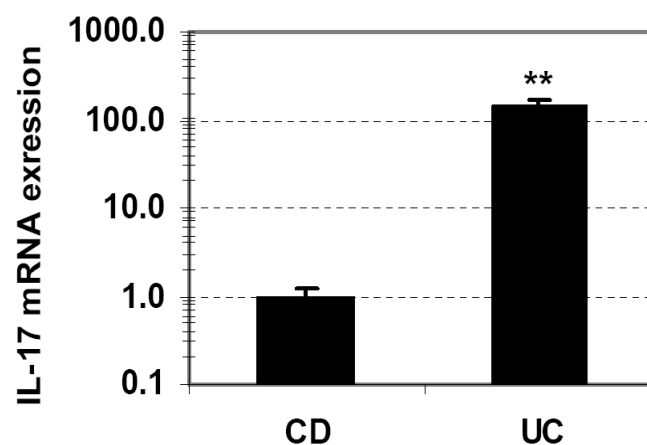


Abbildung 10: Die absolute Expression der intestinalen IL-17F-mRNA ist bei Patienten mit C. ulcerosa (UC, rechter Balken) im Vergleich zu M. Crohn (CD, linker Balken) signifikant erhöht. Der p-Wert beträgt. 0,0001.

4 Diskussion

4.1 Analyse des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus bezüglich Krankheitssuszeptibilität von *M. Crohn* und *C. ulcerosa*

Die Pathogenese der CED ist trotz intensiver Forschungsarbeit noch nicht vollständig verstanden. Neben dem Einfluss exogener Faktoren wie z.B. ein unterschiedliches Krankheitsrisiko bei gleichen ethnischen Gruppen [Shanahan 2002] und ein weltweites Nord-Süd-Gefälle [Loftus 2004] werden das Rauchen [Calkins 1989], nutritive Faktoren [D'Souza 2008] und eine Appendektomie [Kaplan 2008] genannt. Die Appendektomie gilt als Risikofaktor für die Entstehung eines *M. Crohn*, während sie bei einer *C. ulcerosa* protektiv wirkt. Bei der Pathogenese wird das Ungleichgewicht bzw. die überwiegende Überaktivierung des mukosalen Immunsystems gegenüber den luminalen Bakterienpathogenen als wesentlicher Pathomechanismus diskutiert [Podolsky 2002, Shi 2006]. Hier wurde ein Zusammenhang mit den Infektionen mit dem Norovirus [Cadwell 2010], mit dem Masernvirus [Lavy 2001], mit dem *Mycobacterium avium paratuberculosis* und dem adhärent-invasiven *Escherichia coli* [Glasser 2008, Thomas 2008] beschrieben. Außerdem sind genetische Veränderungen an der Pathogenese der CED beteiligt. 2001 wurde das *NOD2*-Gen als erstes Suszeptibilitätsgen bei *M. Crohn* entdeckt [Ogura, Inohara et al. 2001, Hugot 2001] und im Rahmen von zahlreichen genomweiten Assoziationsstudien konnten weitere phänotypisch bedeutsame Suszeptibilitätsgene wie z.B. *IRGM* [Parkes 2007], Genvarianten des Toll-like Rezeptors (TLR) [Brand 2005] und *ATG16L1* [Hampe 2007, Rioux 2007, Glas 2008] bei *M. Crohn* erkannt werden. Die Abbildung 11 stellt übersichtlich die Suszeptibilitätsgene dar, die weltweit als signifikant beschrieben wurden. Für das alleinige Vorkommen bei *M. Crohn* wurden die rot markierten Gene gefunden, die bei *C. ulcerosa* beschriebenen Suszeptibilitätsgene sind blau markiert. Suszeptibilitätsgene, die sowohl bei *M. Crohn* als auch bei *C. ulcerosa* vorkommen, sind schwarz markiert. Herauszuheben ist hier die Gruppe der Gene, die bei der Th-17-Zelldifferenzierung eine wesentliche Rolle spielt. Diese Gruppe stellt das stärkste überlappende Cluster dar und ist übersichtlich in Abbildung 11 aufgezeichnet [Lees 2011].

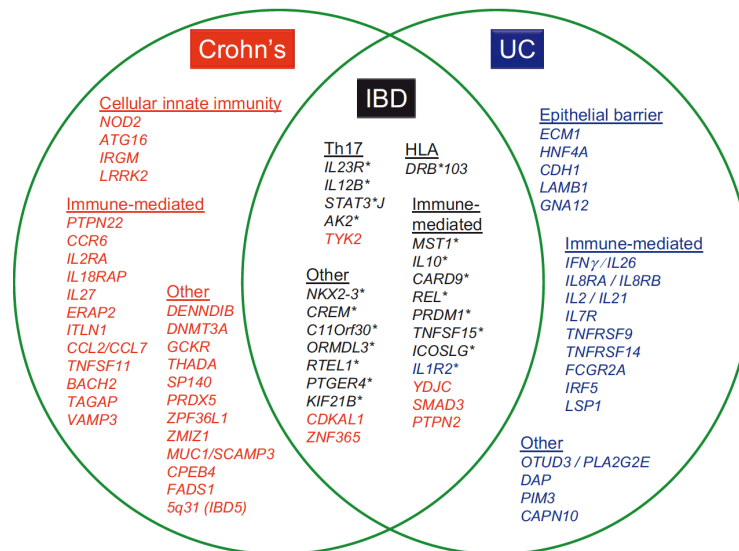


Abbildung 11: Übersicht der Suszeptibilitätsgene von CED, die weltweit als signifikant beschrieben wurden. Das Vorkommen bei Patienten mit M. Crohn ist rot markiert, bei C. ulcerosa blau und bei den gemeinsamen Suszeptibilitätsgenen schwarz [Lees 2011].

Durch Oda et. al und McAllistar et. al wurde bereits einerseits dem Zytokin IL-17F eine Hauptrolle bei chronisch entzündlichen und allergischen Lungenkrankheiten zugewiesen [Oda 2005, McAllister 2005], andererseits konnten Kawaguchi et al. [Kawaguchi 2006] einen Zusammenhang zwischen der Substitution einer Aminosäure auf dem Gen für den gleichen hier untersuchten SNP *IL17F* p.His161Arg und einem geringeren Risiko für das Auftreten von Asthma zeigen. Eine Überexpression an IL-17F führt nach den Ergebnissen von Yang [Yang 2008] zu einer Zunahme von proinflammatorischer Zytokin- und Chemokinexpression in der Lunge und somit zu einer entzündungs-begleitenden Infiltration mit Neutrophilen. Davon unabhängig stellte Bending [Bending 2009] einen Zusammenhang zwischen der Produktion von IL-17F und der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 her.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Forschungsergebnisse zu IL-17F, der funktionell nachgewiesenen Bedeutung der IL-23/IL-17-Achse bei CED und der Identifikation von *IL23R* als Suszeptibilitätsgen wurde im Rahmen dieser Arbeit *IL17F* erstmals als mögliches Suszeptibilitätsgen bei CED untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus untersucht, da dieser spezielle Austausch der Aminosäuren bislang die einzig bekannte Genvariante für *IL17F* darstellt, für die ein Einfluss auf die menschliche Prädisposition für Krankheiten nachgewiesen wurde [Kawaguchi 2006]. Darüber hinaus deuten die Analysen der Öffentlichen Gendatenbanken [Public gene data banks: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>] darauf

hin, dass die *IL17F* p.His161Arg-Variante der einzige kodierende SNP auf dem *IL17F* Gen ist, bei dem eine Heterozygotenfrequenz von mehr als 7 % erwartet werden kann und damit der häufigste kodierende *IL17F*-SNP ist.

Im Vergleich der Patienten, die an einer CED leiden und der gesunden Kontrollgruppe, konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus verzeichnet werden. In der Gruppe der *C. ulcerosa*-Patienten war niemand für den SNP homozygot, jedoch waren je drei Patienten der M. Crohn- und der Kontrollgruppe homozygot. Trotz der erhöhten Expression von IL17F im Darmgewebe der M. Crohn-Patienten, konnte in der vorliegenden Arbeit der *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus nicht als CED-Suszeptibilitätsgen identifiziert werden.

Diese Daten entsprechen den bisherigen Ergebnissen aus genomweiten Assoziationsstudien: In einer genomweiten Metaanalyse von Franke et al. [Franke 2010] wurden 71 Genorte als Suszeptibilitätsgen für M. Crohn bestätigt. Auch im Rahmen dieser großen Metaanalyse konnte dieser SNP im Speziellen nicht als Suszeptibilitätsgenvariante bestätigt werden [Anderson 2010].

Bei der Untersuchung japanischer Asthma-Patienten konnte durch das Vorkommen des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und damit verbunden eine Hochregulation von IL-17F ein protektiver Effekt auf die Entzündung der Schleimhaut beobachtet werden. Dies ist vergleichbar mit dem protektiven Effekt der *IL23R* p.Arg381Gln-Variante bei den Patienten mit M. Crohn. Es wurde gezeigt, dass es die Expression des β -Defensin-2 im menschlichen Epithel der Luftwege hochreguliert, sodass vermutet werden kann, dass dieser epitheliale Zellschutz durch mukosaprotektive Defensine geregelt wird [Kao 2004]. Diese Hypothese stimmt mit mehreren Berichten überein, dass IL-22 und IL-17A von Th-17-Zellen co-exprimiert werden [Liang 2006]. Von Brand et al. konnte gezeigt werden, dass IL-22 exprimiert wird und die Expression des β -Defensin-2 auch in intestinalen Epithelzellen hochreguliert wird [Brand 2006]. Alternativ dazu könnte die Substitution des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus direkt die IL-17F-Expression regulieren. Um diese Vermutung zu erhärten, sind jedoch weitere Studien mit einer großen Anzahl homozygoter Träger dieses SNPs notwendig. Auch die Rolle von *IL17F* als Suszeptibilitätsgen für CED kann nur im Rahmen weiterer Forschungen an einer sehr großen Population abschließend geklärt werden.

4.2 Analyse des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus in Hinblick auf die CED-Krankheitsphänotypen

Mit dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle von *IL17F* als mögliche genetische Ursache in der Pathogenese der CED untersucht und ein Zusammenhang des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus mit der Prävalenz für das Auftreten von M. Crohn und C. ulcerosa und den phänotypischen Merkmalen der CED-Patienten erforscht. In einem weiteren Schritt wurden die genotypischen Eigenschaften mit den phänotypischen Merkmalen der Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa verglichen.

Bei der Genotyp-Phänotyp-Analyse der allgemeinen Merkmale bei Patienten mit M. Crohn bestand in Bezug auf das Geschlecht, den BMI, das Alter bei Diagnosestellung, die Dauer der Erkrankung und das Alter der Patienten bei Studiendurchführung kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen. Bei der Untersuchung der charakteristischen Krankheitsmerkmale entsprechend der Montreal-Klassifikation wie z.B. das Alter bei Diagnosestellung, die Lokalisation, die Ausprägung und die Verwendung von Immunsuppressiva, konnte in Bezug auf das Vorkommen des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus für M. Crohn keine Signifikanz der erhobenen Merkmale gezeigt werden. Es wird vermutet, dass Th17-Zellen eine größere Bedeutung in der Krankheitsentstehung von M. Crohn spielen, als bei Patienten mit C. ulcerosa [Neurath 2007], da M. Crohn vorrangig als Th1-vermittelte Krankheit [Wolk 2004] und C. ulcerosa primär als Th2-vermittelte Krankheit gilt [Sakuraba 2009]. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Th17-Zellen auch eine Rolle in den vorwiegend Th2-vermittelten Erkrankungen spielen könnten. Die einzige Erkrankung, die bisher mit dem *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus verknüpft wurde, ist interessanterweise Asthma [Kawaguchi 2006], eine ebenfalls Th2-vermittelte Entzündungsreaktion.

Ein Zusammenhang konnte innerhalb der C. ulcerosa-Population zwischen dem Auftreten des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und einem niedrigeren BMI ($p=0,009$) hergestellt werden. Bei den heterozygoten C. ulcerosa-Patienten konnte ein signifikant niedrigerer BMI ($22,2 \text{ kg/m}^2$) als bei Patienten mit dem Wildtyp ($24,2 \text{ kg/m}^2$) beobachtet werden. Außerdem trat die C. ulcerosa bei gleichzeitigem Vorkommen des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus in einem signifikant ($p=0,039$) früheren Alter ($26,8 \pm 9,4$ Jahre) auf als bei den Patienten mit dem Wildtyp ($31,7 \pm 13,4$ Jahre). Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass diese Genvariante mit einer stärkeren Krankheitsaktivität bei C. ulcerosa einhergeht. Ein Einfluss auf die

Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten oder auf eine ausgeprägte Pankolitis sind nicht nachweisbar und es ist unwahrscheinlich, dass diese Variante eine bedeutende Rolle bei der Ausprägung und Entwicklung eines speziellen Phänotyps der *C. ulcerosa* spielt.

Darüber hinaus könnten auch ethnische Faktoren, wie sie für *IL17A* [Mei 2007] gezeigt wurden, eine Rolle spielen. Homozygote Träger des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus scheinen in Japan zum Beispiel gegen Asthma geschützt zu sein. Aufgrund der sehr geringen Prävalenz homozygoter Träger in der kaukasischen Bevölkerung, die in unseren Studien und den Daten des HapMap [International HapMap Consortium 2003] Projektes bei annähernd 0,3% liegen, kann nur durch sehr große, multizentrische Studien bewiesen werden, ob und in wie weit das homozygote Vorkommen dieses Polymorphismus mit dem Auftreten einer CED einhergeht.

4.3 Epistasis zwischen dem *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und den mit CED-assoziierten Genvarianten des *IL23R*

In einer vorangegangenen Studie von van Beelen et al. konnte gezeigt werden, dass Bakterien die DC von Patienten mit M. Crohn so umprogrammieren können, dass diese die Produktion von IL-17A in T-Gedächtniszellen anregen [van Beelen 2007]. Bestätigt wurde diese zentrale Rolle von *NOD2* in der IL-23/IL-17-Achse in DC, in denen *NOD2* wie bei einigen M. Crohn-Patienten supprimiert war. Die Entdeckung der IL-23/IL-17-Entzündungskaskade unterstreicht die bedeutende Rolle der Genetik bei der Entstehung der CED [Iwakura 2006].

Die neuesten Daten zeigen, dass bei der Pathogenese des M. Crohn innerhalb der IL-23/IL-17-Achse komplexe Interaktionen beteiligt sind. Im Besonderen wurde die Wechselwirkung zwischen *IL23R* und *IL17A* und zwischen *IL23R* und *IL17RA* und deren Prädisposition für CED beschrieben [Papadakis 2007, Mei 2007]. Von sehr großem Wert sind in diesem Zusammenhang auch genaue Datenanalysen aller früher veröffentlichten genomweiten Assoziationsstudien [Parkes 2007] und die Reproduzierbarkeit der Epistasis zwischen *IL23R*, *IL17A* und *IL17RA* [Papadakis 2007]. Außerdem wurde das Suszeptibilitätsgen *IL23R*, erforscht, das für die Regulierung der Expression des Th17-Zytokins verantwortlich ist [Schmechel 2008]. Es existieren mehrere publizierte Beispiele für eine Gen-Gen-Interaktion. McGovern

zeigte eine Epistasie zwischen *CARD9* und *REL* bei Patienten mit *C. ulcerosa* [McGovern 2010] und zwischen *IL17A* und *IL23R* beziehungsweise zwischen *IL23RA* und *IL23R* [McGovern 2009]. Török et al. zeigte einen genetischen Zusammenhang für die Entstehung von M. Crohn zwischen dem TLR9-Polymorphismus und *NOD2* bzw. *IL23R* [Török 2009]. Glas et al. publizierten Epistasie zwischen den Genvarianten des *IL23R* und drei SNPs in dem *KIAA1109/TENR/IL2/IL21*-Block [Glas 2009]. Kim et al. publizierten jüngstens ebenfalls einen genetischen Zusammenhang zwischen *IL23R* und *IL17A* mit der Pathogenese von CED [Kim 2011].

In den vorliegenden Untersuchungen wurde keine Evidenz für die epistatische Interaktion zwischen der Variante des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und zehn mit dem M. Crohn assoziierten SNPs des *IL23R*-Gens gefunden. Außerdem wurden keine epistatischen Interaktionen zwischen den drei hauptsächlich mit M. Crohn assoziierten Varianten des *NOD2*-Gens gefunden. Die schwache Interaktion zwischen der Variante des p.Gly908Arg *NOD2* bei M. Crohn mit einem p-Wert von 0,01 erfüllt nach der Korrektur nach Bonferroni für multiples Testen nicht mehr die Kriterien für eine Signifikanz. Der *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus ist daher nicht mit einer Suszeptibilität für IBD verbunden und ist durch eine fehlende epistatische Interaktion mit der CED-assoziierten Variante des *IL23R*-Gens gekennzeichnet.

Offen bleibt weiterhin die Vermutung, ob die drei häufigsten Mutationen in den LRR-Bereichen des *NOD2*-Gens zu einem Funktionsverlust oder –gewinn führen [Lees 2009]. Gallagher et al. haben eine Erklärung für Mutationen innerhalb des *IL23R*-Gens veröffentlicht [Gallagher 2010]. Die Mutation von rs11209026 (G1142A/p.R381Q) befindet sich auf dem neunten Exon und kodiert eine transmembrane Region des IL-23R-Proteins. Das schützende A-Allel verursacht alternatives Splicing, verschiebt dadurch das Stoppcodon und führt letztendlich zum Verlust der transmembranen Domäne des Proteins. Das daraus resultierende lösliche IL-23R bindet IL-23, das dadurch antagonisiert wird und in der Folge zu einer verminderten Th-17-Zelldifferenzierung führt. Dies könnte einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung von M. Crohn darstellen.

Weitere umfangreiche Untersuchungen mittels ImmunoChip-Technologie sind daher notwendig, um die komplexen genetischen Zusammenhänge detailliert zu erforschen, zu replizieren und die damit verbundenen Chancen und Risiken in Bezug

auf die Pathogenese und die funktionellen Konsequenzen für letztendlich die Therapie der CED bewerten zu können.

Die Abbildung 12 gibt eine Übersicht der Proteine wieder, die für Suszeptibilitätsgene bei M. Crohn und C. ulcerosa kodieren und die in den IL23R-Signalweg und die Th17-Zellentwicklung eingebunden sind. Rot markiert sind die Gene, bei denen in genomweiten Assoziationsstudien ein Zusammenhang mit M. Crohn gefunden werden konnte. Für die C. ulcerosa wurde Gene gefunden, die für IL23R, IL12/23 p40, JAK2 und STAT3 kodieren. Es konnte für die C. ulcerosa eine Assoziation der SNPs innerhalb des *IL2/IL21*-Gens (Protein dunkelblau markiert) gezeigt werden, bei dem eine Epistasie mit dem *IL23R*-Gen vorliegt [Glas 2009]. In einer weiteren genomweiten Assoziationsstudie konnte im Bereich des SNPs eines *IL22/IL26*-Genclusters eine Verbindung im Rahmen der Suszeptibilität zu C. ulcerosa gefunden werden [Silverberg 2009].

Durch weitere große Metaanalysen wurde die wichtige Rolle von IL23R in der Pathogenese von M. Crohn erneut belegt. Unter den mehr als 30 Regionen mit der höchsten Übereinstimmung mit M. Crohn spielten vier SNPs eine wesentliche Rolle im IL23R-Signalweg. Diese waren IL23R, IL12B, STAT3 und JAK2. Zwei weitere Suszeptibilitätsgene, CCR6 und TNFSF15, waren bei M. Crohn ebenfalls in die Th17-Zelldifferenzierung mit involviert [Brand 2009].

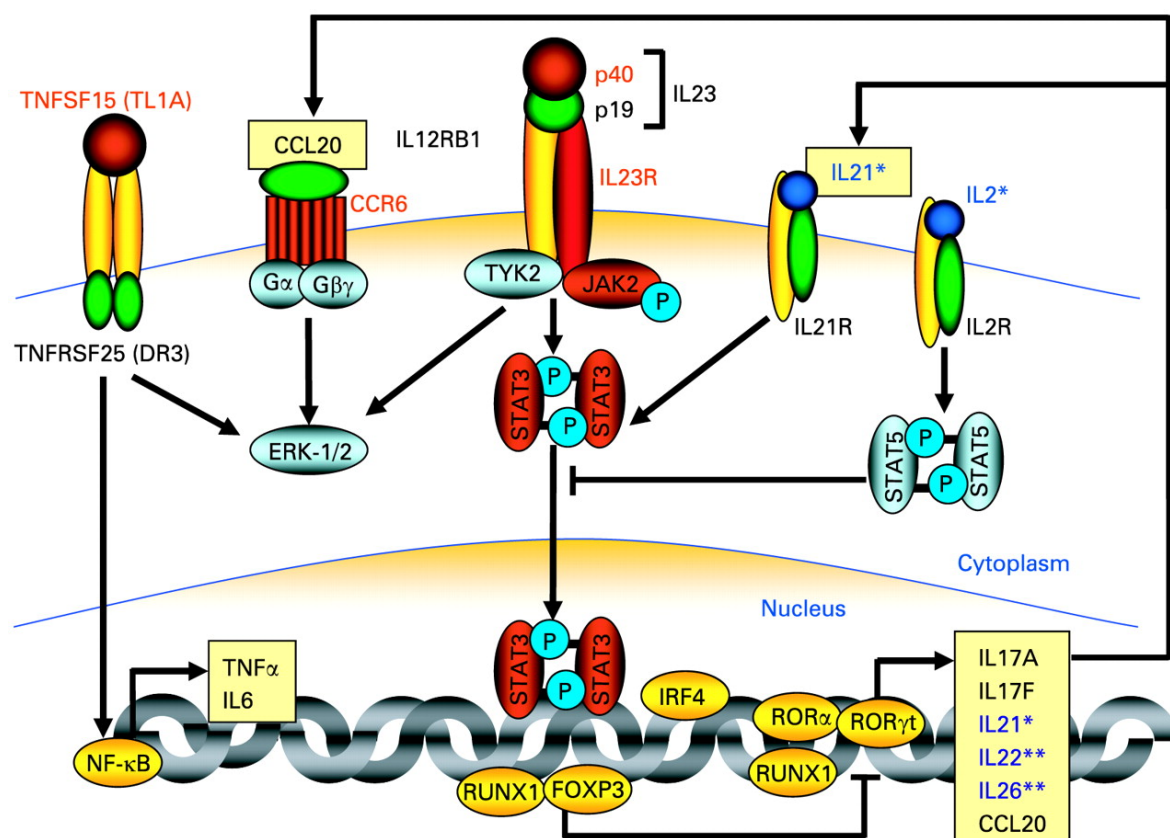


Abbildung 12: Übersicht über die Proteine, die für Suszeptibilitätsgene bei M. Crohn und C. ulcerosa kodieren und die in den IL23R-Signalweg und die Th17-Zellentwicklung eingebunden sind [Brand 2009].

4.4 Analyse der intestinalen IL-17F-mRNA-Expression bei Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa

In dieser Arbeit wurden erstmals Gewebeproben bezüglich einer veränderten Regulation der intestinalen Genexpression der IL-17F-mRNA untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der IL-17F-mRNA in den Biopsien aus entzündeten Geweben bei den Patienten mit M. Crohn signifikant um das 4,4-fache im Vergleich zu den nicht-entzündeten Biopsien erhöht war. Innerhalb der Patienten mit C. ulcerosa ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression der IL-17F-mRNA in den entnommenen Biopsien. Ursache könnte hierfür sein, dass z.B. bei einer Pancolitis auch die makroskopisch nicht-entzündeten Biopsiestellen der Darmmukosa eine histologische Entzündung zeigen können, wodurch sich die IL-17F-mRNA-Expression ebenfalls erhöhen würde. Die Biopsien wurden nur Erkrankten entnommen, da durch die Ethikkommission eine Biopsieentnahme bei Gesunden nicht genehmigt wurde. Aufgrund des fehlenden Ethikvotums konnte kein Direktvergleich zwischen der gesunden und der erkrankten Population durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch IL-17F in entzündetem Darmgewebe von Patienten mit M. Crohn vermehrt produziert wird. Aufgrund des fehlenden Vergleiches mit einer Kontrollgruppe sollte dieses Ergebnis in weiteren Studien repliziert werden.

Von Wilson et al. wurde gezeigt, dass Th-17-Zellen vermehrt IL-17A, IL-17F, IL-26, IFN- γ und CCL20 exprimieren [Wilson 2007]. Eine unmittelbar vermehrte Expression der Zytokine und Chemokine bei einer aktiven M. Crohn-Erkrankung wurde für IL-17A [Andoh 2002, Fujino 2003], IL-21 [Pallone 2010], IL-22 [Brand 2006, Schmechel 2008], IL-26 [Dambacher 2008], CCL20 [Brand 2006] gezeigt. Die erhöhte Expression von IL-17A bei Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa wurde kürzlich von Kim et al. bestätigt [Kim 2011].

Die Wirksamkeit eines Anti-CCL20-Antikörpers gegen das Th17-Chemokin wurde im Mausmodell bestätigt [Katchar 2007]. CCL20 (C-Chemokin-Ligand) wird vor allem vom Deckepithel der Payer'schen Plaques gebildet und wirkt dort auf die Lymphozyten und

DC chemotaktisch. Dies führt bei Entzündungen zu einer gesteigerten Expression von CCL20 [Tanaka, Imai et al. 1999].

Im Tierversuch konnte bei immunsupprimierten Affen gezeigt werden, dass die Reduktion von Th17-Zellen im Interstitium des Darmes zu häufigeren Bakteriämien führt (incl. bestimmter Serotypen von Salmonella). Die Vermutung liegt nahe, dass der Verlust an Th17-Zellen eine erhöhte Anfälligkeit für Salmonelleninfektionen bei HIV-Patienten bewirkt [Raffatellu 2008]. Bei der Abwehr gegen extrazelluläre Bakteriämien und Pilze auf Haut- und Schleimhaut-Epithelien könnte auf IL-17A und IL-17F eine protektive Rolle zukommen und darauf hinweisen, dass IL-17F nicht nur von Th17-Zellen und durch Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet wird, sondern auch durch Darm-Epithelzellen [Raffatellu 2008] z.B. des Kolons [Ishigame 2009]. Cua und Tato [Cua 2010] konnten nachweisen, dass die schnelle Produktion von IL-17F unter anderem auch durch Neutrophile, Monozyten, NK-Zellen und lymphoid tissue inducer (LTi)-ähnlichen Zellen verursacht sein kann. Diese Vermutung und die vorbekannten Ergebnisse stellen einen elementaren Therapieansatz bei der Behandlung der CED dar, da die Blockierung der oben genannten Chemokine und Zytokine dabei einen zentralen Baustein darstellen könnte. Die ersten Studien, bei denen die Blockierung von IL-17 im Vordergrund steht, wurden bereits an Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa durchgeführt [www.clinicaltrials.gov], weitere sind in Planung.

Bei Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Psoriasis wurde während der Anti-IL-17A-Therapie ein erhöhtes Risiko für opportunistische Infektionen z.B. mit Staphylococcus und Candida berichtet [Wang 2011]. Die Funktion der Zytokine muss daher für den Einsatz von Antikörpern sehr genau verstanden werden.

Offensichtlich besitzen IL-17A und IL-17F eine bidirektionale Wirkung. Diese äußert sich einerseits in der Produktion protektiver Proteine, z.B. β -Defensin 2 und andererseits durch die Produktion aggressiver Chemo- und Zytokine [Gaffen 2009]. In einem Transfer-Colitis-Modell wurde die protektive Funktion von IL-17 bestätigt [O'Connor 2009]. Es ist davon auszugehen, dass β -Defensin 2 das adaptive Immunsystem durch die Rekrutierung von DC und T-Zellen an mikrobiologisch befallene Bereiche fördert [Yang 1999].

In der Abbildung 13 [modifiziert nach Gaffen 2011] ist der durch IL-17 vermittelte Signaltransduktionsweg dargestellt, der mit der Herstellung einer IL-17-mRNA

zunächst endet. Hier ergeben sich zwei Möglichkeiten: entweder die erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, die zu einer erhöhten Chemotaxis von Neutrophilen führt. Wird die Produktion von β -Defensin 2 eingeschlagen, führt dies am Zielort zu einem vermehrten Epithelschutz.

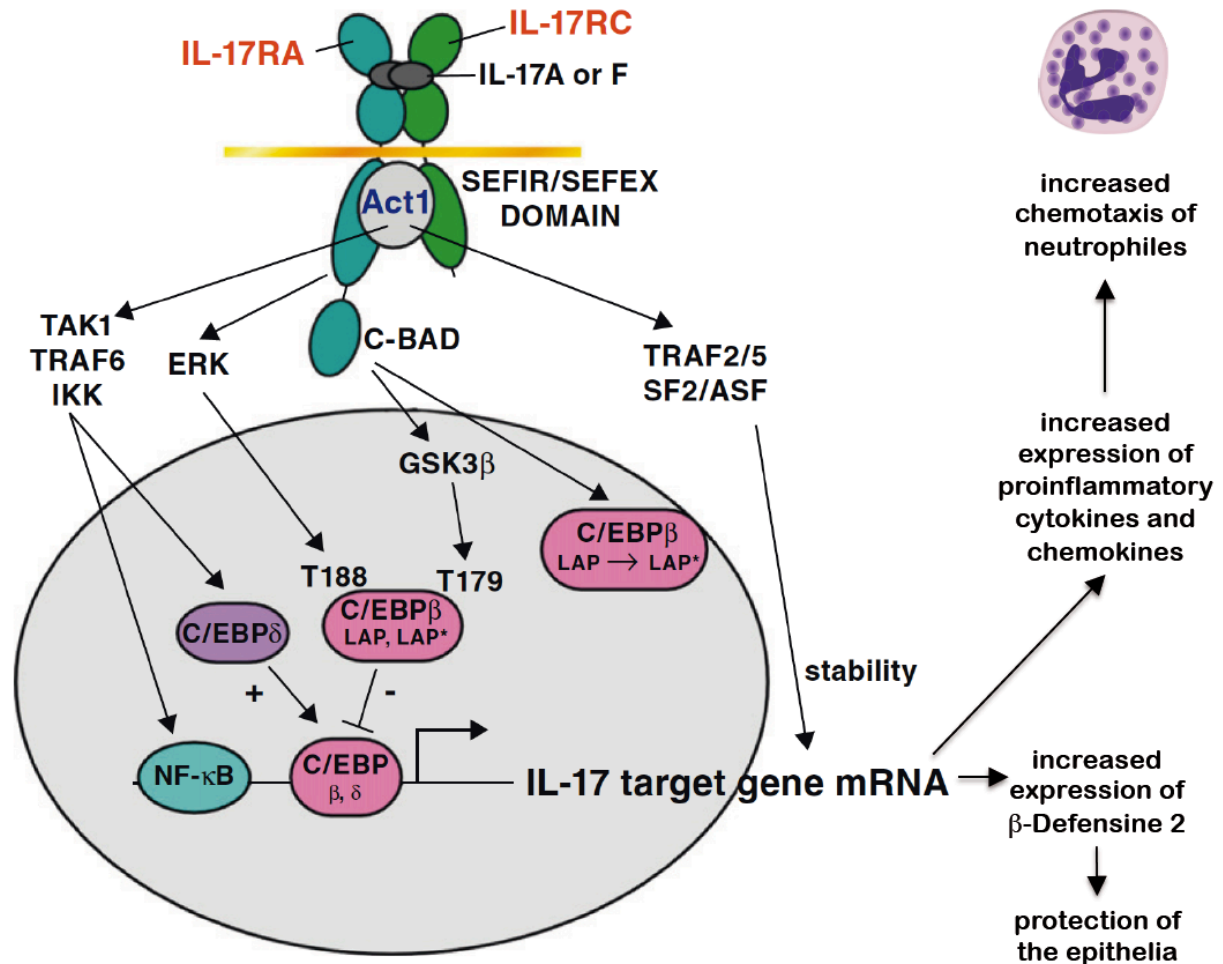


Abbildung 13: Der IL-17 vermittelte Signaltransduktionsweg [modifiziert nach Gaffen 2011]

Um die Therapiemöglichkeiten bei M. Crohn und C. ulcerosa zu optimieren und auszubauen ist eine möglichst genaue Kenntnis des IL-23/IL-17-Weges von elementarer Bedeutung. Sowohl die Interaktionen der Chemokine und Zytokine als auch deren Regulation sollten so ausführlich wie möglich untersucht, erfasst und ausgewertet werden. Nur das exakte Verständnis der dabei involvierten Vorgänge in der Darmmukosa können zukunftsfähige Therapiemöglichkeiten entwickelt werden. So gilt es z.B. zu klären, ob die gesamte IL-23/IL-17-Strecke geblockt werden muss, oder ob das einfache Blockieren von z.B. IL-17A produzierenden Th17-Zellen ausreichend ist, die CED therapeutisch zu beeinflussen. Hierbei ist es wichtig, das

gesamte Wirkungsspektrum von IL-17 zu berücksichtigen, das neben der rein proinflammatorischen Wirkung auch einen Schutz gegen Bakterien bieten kann [Kolls 2004, van Beelen 2007].

Zusammenfassend stellt die vorliegende Arbeit die erste umfassenden Untersuchung der genetischen Rolle von *IL17F* und dessen Einfluss auf die Pathogenese von CED dar. Es wurde erstmals gezeigt, dass die IL-17F-Expression im Kolon von aktiv an M. Crohn erkrankter Patienten hochreguliert ist. Der *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus geht nicht mit der erhöhten Prävalenz für einen M. Crohn einher, während bei heterozygoten Trägern dieser Polymorphismus ein früheres Erkrankungsalter bei C. ulcerosa als indirekter Faktor für eine schwerere Erkrankung und einen niedrigeren BMI gezeigt werden konnten.

Um weiter zu klären, welche Rolle, die IL-17-Familie bei der Pathogenese der CED spielt, sind weitere Studien nötig. Diese sollten schwerpunktmäßig die Interaktion der genetischen Varianten untereinander und die damit verbundenen funktionellen und phänotypischen Konsequenzen aufklären.

5 Zusammenfassung

Hintergrund der mit dieser Arbeit durchgeführten Analyse waren Vorarbeiten die zeigen konnten, dass einerseits dem Zytokin IL-17F eine Hauptrolle bei chronisch entzündlichen und allergischen Lungenkrankheiten zugewiesen [Oda 2005, McAllister 2005]. Andererseits konnten Kawaguchi et al. [Kawaguchi 2006] einen Zusammenhang zwischen der Substitution einer Aminosäure auf dem Gen für IL-17F und einem geringeren Risiko für das Auftreten von Asthma zeigen. Eine Überexpression von IL-17F führt nach den Ergebnissen von Yang [Yang 2008] zu einer Zunahme von proinflammatorischer Zytokin- und Chemokinexpression in der Lunge und somit zu einer entzündungs-begleitenden Infiltration mit Neutrophilen. IL-17F gehört zur Familie der proinflammatorischen IL-17-Zytokine und wird von Th17-Zellen exprimiert [Aggarwal 2003]. Diese werden durch das Zytokin IL-23 weiter differenziert und führt zur Enddifferenzierung von Th17-Zellen. IL-23 gehört zur IL-12-Familie und wird von Antigen-präsentierenden Zellen wie z.B. aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen produziert. Durch die IL-23/IL-17-Achse wird die akute und chronische Entzündungsreaktion reguliert, die zur Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen, Metalloproteinasen und Chemokinen führt [Hwang 2004, Kolls 2004]. Die aktuellen Forschungsergebnisse zu IL-17F, die Bedeutung der IL-23/IL-17-Achse bei CED und die Identifizierung von *IL23R* als CED-Suszeptibilitätsgen gaben Anlass, die Rolle von IL-17F bei der Pathogenese von CED genauer zu untersuchen und *IL17F* als mögliches Suszeptibilitätsgen zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit war es,

1. einen möglichen Zusammenhang des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus mit dem Auftreten eines M. Crohn oder einer C. ulcerosa an einer großen Patientenkohorte und Kontrollen zu untersuchen und hierdurch erstmals die Bedeutung von *IL17F* als mögliches CED-Suszeptibilitätsgen in einer großen Patientenkohorte zu bestimmen,
2. im Rahmen einer detaillierten Genotyp-Phänotyp-Analyse mögliche Einflüsse des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus auf Krankheitsverlauf und Phänotyp von CED-Patienten zu untersuchen,

3. die genetischen Interaktionen zwischen den drei hauptsächlich mit M. Crohn assoziierten Gen-Loci, den *NOD2* Mutationen p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 und 10 ebenfalls mit M. Crohn assoziierten *IL23R*-Varianten und dem *IL17F*-p.His161Arg-Polymorphismus zu überprüfen und
4. Gewebeproben auf eine veränderte Regulation der intestinale Genexpression der IL-17F-mRNA hin zu untersuchen.

(1) Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Vergleich der Patienten, die an einer CED leiden und der gesunden Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und damit kein Einfluss auf die Krankheitssuszeptibilität besteht.

(2) Außerdem konnte beim Vergleich der Genotypen mit den krankheitscharakteristischen phänotypischen Merkmalen der Patienten im Rahmen der Genotyp-Phänotyp-Analyse der Patienten mit *C. ulcerosa* bei zwei Merkmalen, dem BMI und dem Alter bei Diagnosestellung, signifikante Zusammenhänge mit dem Auftreten des Polymorphismus hergestellt werden. In dieser Population trat die Erkrankung in einem signifikant früheren Alter ($26,8 \pm 9,4$ Jahre) auf, als bei den Patienten mit dem Wildtyp ($31,7 \pm 13,4$ Jahre). Bei den heterozygoten *C. ulcerosa*-Patienten konnte ein signifikant niedriger BMI ($22,2 \text{ kg/m}^2$) als bei den Wildtyp-Patienten ($24,2 \text{ kg/m}^2$) beobachtet werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Variante mit einer stärkeren Krankheitsaktivität einhergeht. Beim Vergleich der Genotypen mit den krankheitscharakteristischen phänotypischen Merkmalen der Patienten mit *M. Crohn* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen gefunden werden.

(3) Bei der Untersuchung der Epistasisanalyse konnte zwischen dem *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und den mit CED-assoziierten SNPs des *IL23R* eine schwache Interaktion zwischen der Variante des p.Gly908Arg-NOD2 bei M. Crohn gefunden werden. Der p-Wert betrug 0,01 und erfüllte nach der Bonferroni-Korrektur (Korrektur für multiples Testen) nicht mehr die Kriterien für eine Signifikanz. Eine Evidenz für die Epistasie zwischen dem *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus und einem mit CED assoziierten SNP innerhalb des *IL23R*-Genes ließ sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen.

(4) Bei der Untersuchung der Gewebeproben auf eine veränderte Regulation der intestinale Genexpression der IL-17F-mRNA konnte gezeigt werden, dass die

Expression der IL-17F-mRNA in den Biopsien aus entzündeten Geweben bei den Patienten mit M. Crohn signifikant um das 4,4-fache im Vergleich zu den nicht-entzündeten Biopsien erhöht war. Innerhalb der Patienten mit C. ulcerosa ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der IL-17F-mRNA in den entnommenen Biopsien. Auch wenn hier kein absoluter Unterschied gefunden werden konnte, waren die absoluten Expressionsspiegel deutlich hochreguliert. Dies weist darauf hin, dass IL-17F bzw. Th17-Zellen auch bei der C. ulcerosa eine entscheidende Rolle spielen.

Insgesamt bestehen zunehmend mehr Anhaltspunkte, dass IL-23 und die Zytokine IL-17A und IL-17F in der Pathogenese der CED eine zentrale Rolle spielen. Allerdings ist die Seltenheit der homozygoten Merkmalsträger des *IL17F* p.His161Arg-Polymorphismus so gering, dass weitere Metaanalysen nötig sind, um abschließend einen Zusammenhang zwischen IL-17F und den CED belegen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Aadland E, Schrumpf E, Fausa O. Primary sclerosing cholangitis: a long-term follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:655-664.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;278:1910-4.

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.

Andoh A, Fujiyama Y, Yoshioka U, Sasaki M, Araki Y, Tsujikawa T, Bamba T. Elevated serum anti-carbonic anhydrase II antibodies in patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med* 2002;9:499-502.

Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, Rioux JD. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet.* 2011;43:246-52.

Arnott ID, Ho GT, Nimmo ER, Satsangi J. Toll-like receptor 4 gene in IBD: further evidence for genetic heterogeneity in Europe. *Gut* 2005;54:308.

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

Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003;112:693-706.

Benchimol E, Seow C, Steinhart A, Griffiths A. Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD006792.

Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 2009;119:565-72.

Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001; 91: 854-862.

Both H, Torp-Pedersen K, Kreiner S, Hendriksen C, Binder V. Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease in a regional patient group. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:987-91.

Brand S, Olszak T, Beigel F, Diebold J, Otte JM, Eichhorst ST, Göke B, Dambacher J. Cell differentiation 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.

Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Marquardt A, Jagla W, Popp A, Leclair S, Herrmann K, Seiderer J, Ochsenkuhn T, Goke B, Auernhammer CJ, Dambacher J. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G827-38.

Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Goke B, Ochsenkuhn 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.

Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crispin A, Goke B, Lohse P, Ochsenkuhn T. 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.

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;58:1152-67.

Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002; 51: 21-5.

Broome U, Bergquist A. Primary sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease, and colon cancer. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 31-41.

Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989;34:1841-54.

Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, Head RD, Xavier R, Stappenbeck TS, Virgin HW. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 2010;141:1135-45.

Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1097-104.

Chang SH, Dong C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 2007;17:435-40.

Chichlowski M, Hale LP. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1139-49.

Chieppa M, Rescigno M, Huang AY, Germain RN. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 2006;203:2841-52.

Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007;133:1327-39.

Coremans G, Rutgeerts P, Geboes K, et al. The value of ileoscopy with biopsy in the diagnosis of intestinal Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 1984;30:167-172.

Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:481-96.

Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:479-89.

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.

D'Souza S, Levy E, Mack D, Israel D, Lambrette P, Ghadirian P, Deslandres C, Morgan K, Seidman EG, Amre DK. Dietary patterns and risk for Crohn's disease in children. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:367-73.

Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, Sisic Z, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Konrad A, Tillack C, Otte JM, Diebold J, Goke B, Ochsenkuhn 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.

Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 2009;58:1207-17.

Danese S, Angelucci E. New and emerging biologics in the treatment of inflammatory bowel disease: quo vadis? *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33:217-27.

de Baey A, Mende I, Baretton G, Greiner A, Hartl WH, Baeuerle PA, Diepolder HM. A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF-alpha. *J Immunol* 2003;170:5089-94.

Desai HG, Gupte PA. Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation? *Indian J Gastroenterol* 2005;24:23-4.

D'Haens G, Geboes K, Peeters M, et al. Patchy cecal inflammation associated with distal ulcerative colitis: a prospective endoscopic study. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1275-9.

Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, Danese S, D'Hoore A, Gassull M, Gomollón F, Hommes DW, Michetti P, O'Morain C, Oresland T, Windsor A, Stange EF, Travis SP; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010;4:28-62.

Di Sabatino A, Fulle I, Ciccocioppo R, et al. Doppler enhancement after intravenous levovist injection in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8: 251-257.

Dijkstra B, Bagshaw PF, Frizelle FA. Protective effect of appendectomy on the development of ulcerative colitis: matched, case-control study. *Dis Colon Rectum* 1999;42:334-6.

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.

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

Edwards F, Truelove S. Course and prognosis of ulcerative colitis. *Gut* 1964;5:1–15.

Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990;336:357-9.

Ely LK, Fischer S, Garcia C. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines *Nature Immunology* 2009;10:1245-1251.

Evans JM, Mc Mahon AD, Murray FE, Mc Devitt DG, MacDonald TM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 40:619-622.

Farmer R, Hawk W, RB. T. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 1975;68:627-635.

Floren CH, Benoni C, Willen R. Histologic and colonoscopic assessment of disease extension in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:459-62.

Franke A et.al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:1118-25.

Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.

Gaffen SL, Kramer JM, Yu JJ, Shen F. The IL-17 cytokine family. *Vitam Horm* 2006;74:255-82.

Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009;9:556-567

Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol* 2011;23:613-9.

Gallagher G, Megjugorac NJ, Yu RY, Eskdale J, Gallagher GE, Siegel R, Tollar E. The lambda interferons: guardians of the immune-epithelial interface and the T-helper 2 response. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:603-15.

Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Panes J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006;130:1588-94.

Gardenbroek TJ, Eshuis EJ, Ponsioen CI, Ubbink DT, D'Haens GR, Bemelman WA. The effect of appendectomy on the course of ulcerative colitis: a systematic review. *Colorectal Dis* 2011.

Geboes K, Ectors N, D'Haens G, Rutgeerts P. Is ileoscopy with biopsy worthwhile in patients presenting with symptoms of inflammatory bowel disease? *Am J Gastroenterol* 1998;93:201-20.

Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1008-13.

Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-7.

Gerhardt S, Abbott WM, Hargreaves D, Pauptit RA, Davies RA, Needham MR, Langham C, Barker W, Aziz A, Snow MJ, Dawson S, Welsh F, Wilkinson T, Vaugan T, Beste G, Bishop S, Popovic B, Rees G, Sleeman M, Tuske SJ, Coales SJ, Hamuro Y, Russell C. Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody. *J Mol Biol* 2009;394:905-21.

Glas J SJ, Wetzke M, Konrad A, Török HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: Combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS ONE* 2007;2:819.

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.

Glas J, Stallhofer J, Ripke S, Wetzke M, Pfennig S, Klein W, Epplen JT, Griga T, Schiemann U, Lacher M, Koletzko S, Folwaczny M, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Brand S. Novel genetic risk markers for ulcerative colitis in the IL2/IL21 region are in epistasis with IL23R and suggest a common genetic background for ulcerative colitis and celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1737-44.

Glasser AL, Darfeuille-Michaud A. Abnormalities in the handling of intracellular bacteria in Crohn's disease: a link between infectious etiology and host genetic susceptibility. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56:237-44.

Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB. The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)* 1976;55:401-412

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.

Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Gunther S, Prescott NJ, Onnie CM, Hasler R, Sipos B, Folsch 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. *Nat Genet* 2007;39:207-11.

Hanauer S, Schwartz J, Robinson M, et al. Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial. Pentasa Study Group. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1188-97.

Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006;1:3-9.

Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;129:50-65.

Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH, et al. Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001;120: 841-7.

Hill MD, Davies G, Mc Intyre AS, Gorard DA. Proctitis with caecitis: an atypical presentation of ulcerative colitis. *Endoscopy* 2002;34:664-6.

Hoffmann J.C, Kroesen A.J, Klump B, Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Handbuch für Klinik und Praxis. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 2. Auflage, 2009.

Homann N, Klarmann U, Fellermann K, et al. Mesenteric pulsatility index analysis predicts response to azathioprine in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:126-132.

Huang SH, Frydas S, Kempuraj D, Barbacane RC, Grilli A, Boucher W, Letourneau R, Madhappan B, Papadopoulou N, Verna N, De Lutiis MA, Iezzi T, Riccioni G, Theoharides TC, Conti P. Interleukin-17 and the interleukin-17 family member network. *Allergy Asthma Proc* 2004;25:17-21.

Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, Mc Kenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006;203:2473-83.

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

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier 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.

Hugot JP. CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:9-18.

Hume G, Radford-Smith GL. The pathogenesis of Crohn's disease in the 21st century. *Pathology* 2002;34:561-7.

Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther* 2004;6:120-8.

Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM, Starovasnik MA. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* 2001;20:5332-41.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-12.

International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426:789-96.

Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000;119:1740-4.

Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 2009;30:108-19.

Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:1218-22.

Jeejeebhoy KN, Detsky AS, Baker JP. Assessment of nutritional status. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1990;14:193-196.

Juillerat P, Mottet C, Pittet V, Froehlich F, Felley C, Gonvers JJ, Vader JP, Michetti P. Extraintestinal manifestations of Crohn's disease. *Digestion* 2007;76:141-8.

Kao CY, Chen Y, Thai P, *et al.* IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol* 2004;173:3482–3491.

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.

Katchar K, Kelly CP, Keates S, O'brien MJ, Keates AC. MIP-3alpha neutralizing monoclonal antibody protects against TNBS-induced colonic injury and inflammation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:1263-71.

Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, Suzuki S, Matsukura S, Kokubu F, Maeda Y, Fukui Y, Konno S, Huang SK, Nishimura M, Adachi M. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:795-801.

Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:670-5.

Kim SW, Kim ES, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, Cheon JH. Genetic polymorphisms of IL-23R and IL-17A and novel insights into their associations with inflammatory bowel disease. *Gut* 2011;60:1527-36.

Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1342-52.

Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467-76.

Koutrobakis I, Manousos ON, Mewwissen SGM, Pena AS. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1996; 43:381-393.

Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992;102:1940-8.

Lashner BA, Shaheen NJ, Hanauer SB, Kirschner BS. Passive smoking is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease in children. *Am J Gastroenterol* 1993;88:356-9.

Lavy 2001 Lavy A, Broide E, Reif S, Keter D, Niv Y, Odes S, Eliakim R, Halak A, Ron Y, Patz J, Fich A, Villa Y, Arber N, Gilat T. Measles is more prevalent in Crohn's disease patients. A multicentre Israeli study. *Dig Liver Dis* 2001;33:472-6.

Lee KM. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Korean J Gastroenterol* 2008;52:1-8.

Lee SD, Cohen RD. Endoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:119-32.

Lees CW, Satsangi J. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009;3:513-34.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* 2011;60:1739-53.

Leon F, Smythies LE, Smith PD, Kelsall BL. Involvement of dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* 2006;579:117-32.

Leshed A, Somasundaram R, de Haar C, van der Woude CJ, Braat H, Peppelenbosch MP. Role of defective autophagia and the intestinal flora in Crohn disease. *Self Nonself* 2010;1:323-327.

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-9.

Libioulle C, Louis E, Hansoul S, Sandor C, Farnir F, Franchimont D, Vermeire S, Dewit O, de Vos M, Dixon A, Demarche B, Gut I, Heath S, Foglio M, Liang L, Laukens D, Mni M, Zelenika D, Van Gossum A, Rutgeerts P, Belaiche J, Lathrop M, Georges M. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet* 2007;3:58.

Lochs H, Dejong C, Hammarqvist F, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Gastroenterology. *Clin Nutr* 2006;25:260-274.

Lochs H, Steinhardt HJ, Klaus-Wentz B, et al. Comparison of enteral nutrition and drug treatment in active Crohn's disease. Results of the European Cooperative Crohn's Disease Study. IV. Gastroenterology 1991;101:881-888.

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

Lohr J, Knoechel B, Wang JJ, Villarino AV, Abbas AK. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. J Exp Med 2006;203:2785-91.

Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, El Yafi F, Colombel JF, Belaiche J. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. Gut 2003;52:552-7.

Ludwig D, Wiener S, Bruning A, et al. Mesenteric blood flow is related to disease activity and risk of relapse in Crohn's disease: a prospective follow-up study. Am J Gastroenterol 1999; 94:2942-2950.

Lundberg G. A, Kellin A, Samnegard A, Lundman P, Tornvall P, Dimmeler S, Zeiher A. M, Hamsten A, Hansson G. K, Eriksson P. Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene. Journal of Internal Medicine 2005; 257:415–422

Maconi G, Sampietro GM, Parente F, et al. Contrast radiology, computed tomography and ultrasonography in detecting internal fistulas and intra-abdominal abscesses in Crohn's disease: a prospective comparative study. Am J Gastroenterol 2003; 98:1545-1555.

Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. Science 2005;307:734-8.

Marshall JK, Irvine EJ. Rectal corticosteroids versus alternative treatments in ulcerative colitis: a meta-analysis. Gut 1997;40:775-81.

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.

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

McAllister F, Henry A, Kreindler JL, Dubin PJ, Ulrich L, Steele C, Finder JD, Pilewski JM, Carreno BM, Goldman SJ, Pirhonen J, Kolls JK. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 2005;175:404-12.

McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut* 2007;56:1333-6.

McGovern DP, Rotter JI, Mei L, Haritunians T, Landers C, Derkowski C, Dutridge D, Dubinsky M, Ippoliti A, Vasiliauskas E, Mengesha E, King L, Pressman S, Targan SR, Taylor KD. Genetic epistasis of IL23/IL17 pathway genes in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:883-9.

McGovern DP, Gardet A, Rioux JD, Seielstad M. et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 2010;42:332-7.

Mei L, Su X, Ippoliti AF, Taylor KD, Targan SR, Rotter JI. Association between IL17A and IL17RA genes and inflammatory bowel diseases (IBD). *Gastroenterology* 2007;132:444.

Mensah-Brown EP, Shahin A, Al-Shamsi M, Lukic ML. New members of the interleukin-12 family of cytokines: IL-23 and IL-27 modulate autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1079:157-60.

Miehlsler W, Puspok A, Oberhuber T, Vogelsang H. Impact of different therapeutic regimens on the outcome of patients with Crohn's disease of the upper gastrointestinal tract. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7: 99-105.

Miossec P. IL-17 in rheumatoid arthritis: a new target for treatment or just another cytokine? *Joint Bone Spine* 2004;71:87-90.

Mylonaki M, Langmead L, Pantes A, Johnson F, Rampton DS. Enteric infection in relapse of inflammatory bowel disease: importance of microbiological examination of stool. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16: 775-778.

Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 2007;13:26-8.

Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, Mc Cormick 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.

Niess JH, Reinecker HC. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:687-91.

Noble CL, Abbas AR, Lees CW, Cornelius J, Toy K, Modrusan Z, Clark HF, Arnott ID, Penman ID, Satsangi J, Diehl L. Characterization of intestinal gene expression profiles in Crohn's disease by genome-wide microarray analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1717-28.

Numasaki M, Tomioka Y, Takahashi H, Sasaki H. IL-17 and IL-17F modulate GM-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha. *Immunol Lett* 2004;95:175-84.

O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK, Flavell RA. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009 June; 10:603-609.

Oda N, Canelos PB, Essayan DM, Plunkett BA, Myers AC, Huang SK. Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:12-8.

Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001;276:4812-8.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.

Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology* 2002;123:714-718.

Orchard TR, Thiyagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Hill Gaston JS, Jewell DP. Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118: 274-278.

Otley A, Steinhart AH. Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;CD000296.

Pallone F, Fina D, Caruso R, Monteleone G. Role of IL-21 in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6:537-41.

Papadakis KA, Rotter JI, Mei L, Su X, Ippoliti AF, Taylor KD, Targan SR. An interaction between IL23R and IL17A and between IL23R and IL17RA haplotypes is necessary for susceptibility to Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007;132:74.

Parente F, Greco S, Molteni M, et al. Role of early ultrasound in detecting inflammatory intestinal disorders and identifying their anatomical location within the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:1009-1016.

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.

Pascu M, Roznowski AB, Muller HP, et al. Clinical relevance of transabdominal ultrasonography and magnetic resonance imaging in patients with inflammatory bowel disease of the terminal ileum and large bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:373-382.

Pelteкова VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471-5.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417-29.

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.

Przybylski G, Pyskir J, Pasińska M, Kopiński P, Gołda R, Modrzyński M. Passive smoking at teenager's home suffering from asthma bronchiale and control at the disease with Asthma Control Test. *Przegl Lek* 2007;64:626-9.

Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* 1989;298:82-6.

Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, Green A, Newman B, Florin TH. Protective role of appendicectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2002;51:808-13.

Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Bäuml AJ. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med* 2008;14:421-8.

Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1988;29:342-5.

Riordan AM, Ruxton CH, Hunter JO. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:229-38.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhart AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39:596-604.

Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, Landers C, Jewell DP. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112:1845-1853.

Safdi M, DeMicco M, Sninsky C, et al. A double-blind comparison of oral versus rectal mesalamine versus combination therapy in the treatment of distal ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1867-71.

Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:512-530.

Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009;137:1736-45.

Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390-407.

Satsangi J, Landers CJ, Welsh KI, Koss K, Targan S, Jewell DP. The presence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:18-26.

Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006 ;55:749-53.

Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E, Lohse P, Göke B, Brand S. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:204-12.

Schreyer AG, Seitz J, Feuerbach S, Rogler G, Herfarth H. Modern imaging using computer tomography and magnetic resonance imaging for inflammatory bowel disease (IBD) AU1. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:45-54.

Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:437-45.

Shepherd NA. Granulomas in the diagnosis of intestinal Crohn's disease: a myth exploded? *Histopathology* 2002;41:166-8.

Shi HN, Walker A. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. *Can J Gastroenterol* 2004;18:493-500.

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

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a

difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.

Sicilia B, Lopez Miguel C, Arribas F, Lopez Zaborras J, Sierra E, Gomollon F. Environmental risk factors and Crohn's disease: a population-based, case-control study in Spain. *Dig Liver Dis* 2001;33:762-767.

Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T. Can J. 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 *Gastroenterol*. 2005;19:5-36.

Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 2009;41:216-20.

Smith M. B, Lashner B. A, Hanauer S. B. Smoking and inflammatory bowel disease in families. *Am J Gastroenterol* 1988;83:407-409.

Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:968-76.

Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 2001;167:4137-40.

Steinhart AH, Feagan BG, Wong CJ, et al. Combined budesonide and antibiotic therapy for active Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2002;123: 33-40.

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.

Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007;117:514-21.

Su C. Outcomes of placebo therapy in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:328-333.

Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.

Tanaka M, Riddell RH, Saito H, et al. Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:55-67.

Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiyama H, Yoshie O. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur J Immunol* 1999;29:633-42.

Thalmaier D, Dambacher J, Seiderer J, Konrad A, Schachinger V, Pfennig S, Otte JM, Crispin A, Goke B, Ochsenkuhn T, Lohse P, Brand S. The +1059G/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.

Thomas D. C, Crohn's and more: is *Mycobacterium paratuberculosis* a superantigen? *Med Hypotheses* 2008;71:858-61.

Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H. Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:79-84.

Török HP, Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Muller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brunnler G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkuhn T, Folwaczny C. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1421-7.

Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkuhn 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.

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.

Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29:990-6.

van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SA, Kapsenberg ML, de Jong EC. Stimulation of the Intracellular Bacterial Sensor NOD2 Programs Dendritic Cells to Promote Interleukin-17 Production in Human Memory T Cells. *Immunity* 2007;27:660-9.

Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004;5:800-8.

Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821-52.

Wei J, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2010;4:105-17.

Wendling D, Racadot E, Cedoz JP, Dumoulin G. Serum IL-17, BMP-7, and bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Joint Bone Spine* 2007. 74:304-5.

Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH and de Vos AM. Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 1999, 401:184–188.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950-7.

Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, and Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21:241–254.

Worthington J, Cullen S, Chapman R. Immunopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;28:93-103.

Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM. Identification of an Interleukin 17F/17A Heterodimer in Activated Human CD4+ T Cells. *J Biol Chem* 2007;282:13447-55.

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan S, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ. β -Defensins: Linking Innate and Adaptive Immunity Through Dendritic and T Cell CCR6. *Science* 1999, 286:525-528.

Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, Wang YH, Schluns KS, Broaddus RR, Zhu Z, Dong C. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* 2008;205:1063-75.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, Mc Clanahan T, Mc Kenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310-6.

Yu JJ, Gaffen SL. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 2008;13:170-7.

Zachos M, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutritional therapy for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD000542.

Zhang Z, Hinrichs DJ, Lu H, Chen H, Zhong W, Kolls JK. After interleukin-12p40, are interleukin-23 and interleukin-17 the next therapeutic targets for inflammatory bowel disease? *Int Immunopharmacol* 2007;7:409-16.

Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007;445:648-51.

Links im Internet:

www.cran.r-projekt.org (letzter Zugriff am 04.03.2010)

www.ecco-ibd.eu/publications/guidelines.php?navId=30 (letzter Zugriff am 18.04.2010)

<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ain457+crohn>. Clinical trial. Efficacy, Safety and Tolerability of AIN457 in Moderate to Severe Active Crohn's Disease. (letzter Zugriff am 02.02.2011)

www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/ (letzter Zugriff am 04.03.2010)

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
6-MP	6-Mercaptopurin
°C	Grad Celsius
%	Prozent
χ^2	Chi-Quadrat-Test
A	Adenin
APC	Antigen-präsentierende Zelle(n)
BMI	Body Mass Index
bp	base pair, Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C	Cytosin
CARD15	Caspase activation and recruitment domain 15
CCL	Chemokin (cm Motiv) Ligand
CD	Cluster of differentiation
CD	Crohn disease, Morbus Crohn
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CI	confidence Interval
CRP	C-reaktives Protein

C. ulcerosa	Colitis ulcerosa
CXC	CXC-Chemokin
DC	Dendritic cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
ECCO	European Crohn's and Colitis Organisation
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
fs	Frameshift
G	Guanin
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GI	Gastrointestinaltrakt
HCl	Hydrochlorid
HLA-B27	Human Leukocyte Antigen-B
IBD	Inflammatory bowel disease
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IL23R	Interleukin 23-Rezeptor (Gen)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LRR	leucin rich repeat – Region

LTi	lymphoid tissue inducer -ähnliche Zellen
m ²	Quadratmeter
M. Crohn	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-dipeptide
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIF	macrophage migration inhibitory factor
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
6-MP	6-Mercaptopurin
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
Na ₂ EDTA	Natriumethyldiamintetraessigsäure
NEB	Puffer der Firma New England Biolabs
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD2	Nucleotide oligomerization domain 2
OH	Hydroxy
p	probability –value, Signifikanzwert

pANCA	Perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
PCR	Polymerase chain reaction
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RR	relative risk, relatives Risiko
SD	Standardabweichung
SLC	Solute Carrier
SNP	Single nucleotide polymorphism, Einzelbasenpolymorphismus
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	TRIS+EDTA
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
Th	T-Helfer Zelle
Th17	IL-17 produzierende CD4 ⁺ T-Helfer Zellen
TLR	Toll like receptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett

UpM Umdrehungen pro Minute

V Volt

vs. versus

7.2 Fragebogen

Pat.Nr:		Adresse	
Name:		Ort	
letzte Blutentnahme:		Telefonnummer	
BMI		Größe (cm):	Gewicht (kg):
Raucher		Zusatzinfo: wie lange geraucht, wann aufgehört, wie viele Zig.	
nie=			
aktuell=			
Ex-Raucher=			
Diagnose		Geschlecht	
MC=		m=	
UC=		w=	
IC=			
Alter bei Diagnose (in Jahren)		Zeit seit Diagnosestellung (in Jahren)	genaues Alter bei Diagnose (in Jahren):
<16 years (A1)=			
17-40 years (A2)=			
> 40 years (A3)=			
Lokalisation (CD) Kombination möglich Einteilung nach Montreal-Klassifikation L4 unbedingt ein ODER ausschließen Angabe, welcher Abschnitt befallen ist: Terminal ileum (L1)= Colon (L2)= Ileocolon (L3)= Upper GI (L4)=			
Behaviour (CD) Angabe, welcher Abschnitt befallen ist: Non-stricturing= Non-penetrat (B1)= Stricturing (B2)= Penetrating (B3)=			
Lokalisation (UC) Angabe, welcher Abschnitt befallen ist: Proctitis (E1)= Left-sided UC (E2)= Extensive UC (E3)=			
Verwendung von Immunsuppressiva z.B.: Azathioprin, 6-MP, 6-Thioguanin, Methotrexat, Infliximab. genau nennen, was und wie lange gegeben wurde			
Einnahme v. Infliximab ja= nein=			
Operationen wg. CED ja= nein=			
was wurde operiert:			
Fisteln ja= nein=			
Angabe, wo Fisteln sind:			
Stenosen ja= nein=			
Angabe, wo Stenosen sind:			
Abszesse ja= nein=			
Angabe, wo Abszess ist, welche Art:			
Extraintestinale Manifestationen ja= nein=			
Angabe, welche Manifestationen			
Positive family history of IBD ja= nein=			
angeben, wer in der Familie welche Erkrankung hat			

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenspiel der Faktoren bei der Pathogenese der CED	4
Abbildung 2: Struktur des NOD2-Proteins	18
Abbildung 3: Mukosale Immunantwort von gesunden Individuen und Crohn-Patienten mit defekter NOD2-Funktion	19
Abbildung 4: Das Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei Aktivierung der IL-23/Th-17-Achse	23
Abbildung 5: Struktur des IL-17F	24
Abbildung 6: Gelelektrophorese nach erfolgreicher Amplifikation der DNA	38
Abbildung 7: Gelelektrophorese der Genotypisierung	40
Abbildung 8: Expression der IL-17F-mRNA bei Morbus Crohn	57
Abbildung 9: Expression der IL-17F-mRNA bei C. ulcerosa	57
Abbildung 10: Die absolute Expression der intestinalen IL-17F-mRNA im Vergleich	58
Abbildung 11: Übersicht der Suszeptibilitätsgene von CED	60
Abbildung 12: Proteine, die für Suszeptibilitätsgene bei M. Crohn und C. ulcerosa kodieren	66
Abbildung 13: Der IL-17 vermittelte Signaltransduktionsweg	68

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Klassifikation des M. Crohn anhand der Montreal-Klassifikation [Satsangi 2006]	6
Tabelle 2: Therapieoptionen bei M. Crohn [www.ecco-ibd.eu]	10
Tabelle 3: Einteilung der C. ulcerosa nach der Montreal-Klassifikation [Silverberg 2005]	11
Tabelle 4: Überblick über die bisher mit M. Crohn und C. ulcerosa in Verbindung gebrachten Suszeptibilitätsgene [Cho 2007]	20
Tabelle 5: Übersicht über CED-assoziierte Genvarianten und deren zugrundeliegende Pathogenese [Cho 2007]	21
Tabelle 6: Übersicht der IL-17 Familie [Weaver 2007, Kolls 2004]	25
Tabelle 7: Verwendete Substanzen zur Extraktion der DNA	29
Tabelle 8: Verwendete Substanzen zur Durchführung der PCR	29
Tabelle 9: Verwendete Substanzen für den enzymatischen Verdau des PCR-Produktes	30
Tabelle 10: Verwendete Substanzen zur Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese	30
Tabelle 11: Verwendete Substanzen zur Extraktion der mRNA	31
Tabelle 12: Herstellung des TE-Puffers	31
Tabelle 13: Herstellung des Ladepuffers	32
Tabelle 14: Herstellung des TAE-Puffers	32
Tabelle 15: Verwendete Laborgeräte	33
Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 17: Verwendete Primer	34
Tabelle 18: Zyklen im Thermocycler	34
Tabelle 19: Verwendete Primer	36
Tabelle 20: Zyklen im Thermocycler	37
Tabelle 21: Demographische und klinische Charakterisierung der CED Studienpopulation	46
Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung des IL17F p.His161Arg-Polymorphismus in der Studienpopulation (Kontrollgruppe, M. Crohn, C. ulcerosa)	47
Tabelle 23: Genotyp-Phänotyp-Analyse der allgemeinen Merkmale bei Patienten mit M. Crohn.	48

Tabelle 24: Zusammenhang zwischen dem IL17F-Genotyp und den für M. Crohn charakteristischen Krankheitsmerkmalen.	52
Tabelle 25: Zusammenhang zwischen dem IL17F-Genotyp und den für C. ulcerosa charakteristischen Krankheitsmerkmalen	55

8 Danksagung

Mein größter und sehr herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. med. Julia Seiderer-Nack für die Überlassung des Forschungsthemas, die stetige und ausdauernde Unterstützung und Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Stephan Brand danke ich für die exzellente Unterstützung während der Zeit im Forschungslabor und bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Julia Diegelmann möchte ich für die außerordentlich gute Einarbeitung und die kompetente Unterstützung während der Zeit im Forschungslabor danken.

Frau Simone Breiteneicher danke ich für ihre zuverlässige technische Unterstützung.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für die Ermöglichung meiner Ausbildungen und ihre unermüdliche Motivation danken.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann für seine unendliche Geduld, Unterstützung und Liebe.