

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler

**Untersuchungen zum monozytären Zytokinexpressionsmuster beim Morbus Crohn in
Abhängigkeit vom CARD15/NOD2-Genotyp**

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

vorgelegt von
Sebastian Christian Cotofana
aus
Hermannstadt/Sibiu

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter ist:

Herr Prof. Dr. Christian Folwaczny

Mitberichterstatter sind:

Herr Prof. Dr. Andreas Wagner

Herr Prof. Dr. Matthias Siebeck

Dekan ist:

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

4. Dezember 2008

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Beynon V, Cotofana S, Brand S, Lohse P, Mair A, Wagner S, Mussack T, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Folwaczny C, Glas J, Török HP. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Mar 26; PMID:18383179

Für Maria und Vasile Coțofană

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	7
1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen – Allgemeine Einführung.....	7
1.1.1 Epidemiologie.....	7
1.1.2 Colitis ulcerosa.....	9
1.1.3 Morbus Crohn.....	11
1.2 Ätiologische Modelle für die Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.....	12
1.2.1 Genetische Faktoren bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	14
a) Genetische Epidemiologie.....	14
b) Prädisponierende Gene.....	15
c) Der <i>IBD1</i> -Locus.....	19
d) Das <i>NOD2/CARD15</i> -Gen.....	19
e) Das <i>NOD2</i> -Protein.....	21
1.2.2 Epigenetische Faktoren.....	24
a) Die bakterielle Darmflora.....	24
b) Pathogene Mikroorganismen.....	26
c) Das Rauchen.....	26
1.3 Die Rolle des <i>NOD2</i> -Proteins beim Morbus Crohn.....	27
1.4 Zu den untersuchten Zytokinen und ihre Rolle beim Morbus Crohn.....	32
2. Zielsetzung der Arbeit.....	37
3. Material und Methoden.....	38
3.1 Studienpopulation.....	38
a) Demografische Daten.....	38
b) Klinische Daten.....	38
c) <i>NOD2</i> -Genotyp.....	40

3.2 Methoden.....	40
3.2.1 Allgemeine Vorgehensweise.....	40
3.2.2 Isolation und Stimulation der Monozyten.....	40
3.2.3 Die RNA Isolation.....	41
3.2.4 Die cDNA-Gewinnung.....	42
3.2.5 Die quantitative PCR.....	43
3.3 Kits und Chemikalien.....	45
3.3.1 Materialien für die RNA Isolierung.....	45
3.3.2 Materialien für die cDNA Gewinnung.....	45
3.3.3 Materialien für die quantitative PCR.....	45
3.4 Geräte.....	46
3.5 Statistische Auswertung.....	46
4. Ergebnisse.....	47
4.1 Kurze Einleitung.....	47
4.1.1 Patienten- und ausgewähltes Kontrollkollektiv.....	47
4.1.2 Interne Standards.....	48
4.2 Basale und MDP/LPS-induzierte Interleukin 1beta mRNA-Expression in Abhängigkeit vom <i>NOD2</i> -Genotyp.....	49
4.3 Basale und MDP/LPS-induzierte Interleukin 10 mRNA-Expression in Abhängigkeit vom <i>NOD2</i> -Genotyp.....	52
4.4 Basale und MDP/LPS-induzierte Interleukin 12 mRNA-Expression in Abhängigkeit vom <i>NOD2</i> -Genotyp.....	54
4.5 Basale und MDP/LPS-induzierte <i>NOD2</i> mRNA-Expression in Abhängigkeit vom <i>NOD2</i> -Genotyp.....	56
5. Diskussion.....	58
5.1 Allgemeine Vorgehensweise.....	58
5.2 Interleukin 1beta mRNA-Expression.....	59
5.3 Interleukin 10 mRNA Expression in Abhängigkeit vom <i>NOD2</i> -Genotyp.....	61
5.4 Interleukin 12 p40 mRNA Expression in Abhängigkeit vom <i>NOD2</i> -Genotyp.....	63
5.5 <i>NOD2</i> mRNA Expression in Abhängigkeit vom <i>NOD2</i> -Genotyp.....	67

5.6 Bedeutung der Ergebnisse für Morbus Crohn und Ausblick.....	68
6. Zusammenfassung.....	70
7. Literaturverzeichnis.....	72
8. Danksagung.....	100
9. Lebenslauf.....	101

1. Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen – Allgemeine Einführung

Unter dem Begriff chronisch-entzündliche Darmerkrankungen werden die beiden Entitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammengefasst. Bei beiden handelt es sich um chronisch rezidivierende und in Schüben verlaufende Entzündungen des Gastrointestinaltraktes. Sie treten hauptsächlich im Dünndarm und Kolon auf, können sich aber auch, wie beim Morbus Crohn, auf den gesamten Darmtrakt ausbreiten.

Während der letzten 50 Jahre sind die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu einem der häufigsten Probleme der Gastroenterologie der westlichen Welt geworden. Obwohl die Ätiologie und Pathogenese immer noch weitgehend unbekannt bleiben, haben neue Diagnose- und Therapieoptionen (Endoskopie, Radiologie, Histologie) zu einem besseren Verständnis der beiden Manifestationen geführt und damit konsekutiv zu einer verbesserten Prognose für Betroffene.

Die Ätiologie ist multifaktoriell. Hierbei spielen die genetische Prädisposition, eine immunologische Fehlregulation sowie Umwelteinflüsse eine Rolle.

1.1.1 Epidemiologie

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind laut Beschreibungen etwa 130 Jahre alt: 1875 konstatierten Sir Samuel Wilks und Walter Morton zum ersten Mal einen Unterschied zwischen Durchfall und Colitis ulcerosa (Wilks, 1875). 1909 beschrieb John Lockhart-Mummery im Rahmen seiner Untersuchungen zur Sigmoidoskopie das makroskopische Bild der Colitis ulcerosa (Lockhart-Mummery, 1909). 1913 wurde eine weitere Studie veröffentlicht, in der über eine Reihe von Patienten mit Colitis ulcerosa berichtet wurde (Dalziel, 1913). 20 Jahre später berichtete Dr. Burrill B. Crohn über Patienten, die an Morbus Crohn litten (Crohn, 1932). Nach dem 2. Weltkrieg sind Inzidenz und Prävalenz, sowohl für Colitis ulcerosa, als auch für Morbus Crohn im Vergleich zur Vorkriegsära deutlich angestiegen. Davon waren besonders die Industriestaaten betroffen wie Großbritannien, die Vereinigten Staaten und Skandinavien. In den achtziger und neunziger Jahren konnte dieser Trend auch in Kontinentaleuropa nachgewiesen werden. In den letzten Jahren haben sich Inzidenz und Prävalenz in Nordamerika und Nordeuropa stabilisiert.

Die Prävalenz für Morbus Crohn schwankt in Europa zwischen 8,3 und 214,0 Fällen pro 100.000 Einwohner und für Colitis ulcerosa zwischen 21,4 bis 243 pro 100.000 Einwohner. Hochgerechnet auf

400 Millionen Einwohner ergibt das eine Zahl von 1,9 Millionen Menschen, die an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen leiden. Für Nordamerika schwanken die Prävalenzen für Morbus Crohn von 26,0 bis 198,5 und für Colitis ulcerosa von 21,4 bis 243,0 Fälle pro 100.000 Einwohner. Für Asien werden die Zahlen der Betroffenen mit 3,6 bis 50,6 pro 100.000 für Morbus Crohn und für Colitis ulcerosa mit 7,6 bis 70,6 pro 100.000 angegeben.

Die Zahl der Neuerkrankungen reicht in Europa von 0,7 bis 9,8 Personen pro 100.000 pro Jahr für Morbus Crohn und für Colitis ulcerosa gibt es Angaben zwischen 1,5 und 20,3 neue Fälle pro 100.000 Einwohner im Jahr. Hochgerechnet macht das 39.200 neue Patienten mit Morbus Crohn und 66.000 Patienten mit Colitis ulcerosa pro Jahr in Europa. Für Nordamerika liegen die Inzidenzen für Morbus Crohn bei 3,1 bis 14,6 und für Colitis ulcerosa bei 2,2 bis 14,3 jährlichen Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Hochgerechnet macht das im Jahr eine Zahl von 87.000 Neuerkrankungen an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Die Inzidenz an jährlichen Neuerkrankungen in Asien liegt mit Werten von 0,5–4,2 für Morbus Crohn und 1,2–5,8 für Colitis ulcerosa deutlich niedriger. Es werden allerdings ansteigende Zahlen aus Teilen Asiens (Korea) berichtet, bei denen das 10-fache an Neuerkrankungen im Vergleich zu 1980 beschrieben wurde. In Afrika und Südamerika ist die Inzidenz im Vergleich zu Europa niedriger, 0,03-2,6 für Morbus Crohn und 0,6-5,0 für Colitis ulcerosa (Loftus, 2002). Diesen Beschreibungen gemeinsam ist, dass sowohl in Nordamerika als auch in Europa ein Nord-Süd-Gefälle zu beobachten ist, mit vermehrtem Auftreten im Norden.

Ein weiterer Trend ist in der Geschlechterverteilung zu beobachten. Hierbei überwiegt der Frauenanteil im Bild des Morbus Crohn, während bei der Colitis ulcerosa der Männeranteil geringfügig größer ist (Binder, 2004).

Das Alter bei der Erstdiagnose chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen liegt im Allgemeinen in der 2. oder 3. Lebensdekade, gefolgt von einer weiteren statistischen Häufung in der 6. bzw. 7. Dekade.

Es wurden statistisch signifikante ethnische und regionale Unterschiede beschrieben. Bei der Volksgruppe der Ashkenasi-Juden zum Beispiel wurde eine höhere Inzidenz an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben (Akolkar, 2001). Regional signifikante Häufungen der Inzidenz wurden in städtischen Gebieten im Vergleich zu ländlichen Gebieten beschrieben oder in Gebieten mit einem höher entwickelten sozialen Standard im Vergleich zu Gebieten mit niedrigem sozialen Standard. Ebenso unterschiedliche Inzidenzen wurden in Ländern mit unterschiedlichen Entwicklungsstufen beobachtet (Bonen, 2003).

1.1.2 Colitis ulcerosa

Die Colitis ulcerosa ist eine kontinuierlich, entlang der Oberfläche ausgedehnte, chronisch-hämorrhagische Entzündung der Kolonschleimhaut. Sie ist vorwiegend auf die Mukosa begrenzt und dehnt sich nur in aktiven Krankheitsphasen bis in die Submukosa aus. Tiefere Darmwandschichten bleiben vom Entzündungsprozess ausgespart. Histomorphologisch ist die Colitis ulcerosa charakterisiert durch eine Hyperämie der Schleimhaut, dichte zelluläre Infiltration des Schleimhautstromas und einer unregelmäßigen Kryptenarchitektur. Für das aktive Stadium sind Kryptenabszesse charakteristisch, mit Anhäufung von Granulozyten in den Krypten. Im chronischen Stadium ist die Schleimhaut mit Histiozyten und Lymphozyten durchsetzt und es liegen Schleimhautatrophien mit einer Abnahme der Becherzell-dichte vor. Am häufigsten bleibt die Entzündung auf das Rektum beschränkt, breitet sich allerdings in 50% der Fälle auf das Rektosigmoid und in 25% nach proximal bis zur linken Kolonflexur aus. In weiteren 25% breitet sie sich auf das gesamte Kolon aus (Pankolitis) und befällt in 10-20% das terminale Ileum (Backwash-Ileitis). Charakteristisch für die Colitis ulcerosa ist ein intermittierender Krankheitsverlauf: auf Phasen des akuten Schubes folgt eine längere Remissionsphase, die von Rückfällen unterbrochen werden kann. Erschwerend kann ein steroidrefraktärer Verlauf oder ein chronisch aktiver Verlauf hinzukommen.

Die klinische Einteilung und Therapieplanerstellung richten sich nach der Aktivität der Entzündung (CAI, colitis activity index), den Empfehlungen der Vienna-Klassifikation oder ihrer Erweiterung, der Montreal-Klassifikation (Gasche, 2000; Silverberg, 2005).

Komplikationen intrainestinaler Art können auftreten in Form des toxischen Megakolon, das sich aus der Paralyse der glatten Muskelzellen aufgrund der schweren transmuralen Entzündung ergibt. Zusätzlich besteht ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms, nach langjährigem Krankheitsverlauf. Hierbei wird das Entartungsrisiko mit 18% angegeben bei einem Krankheitsverlauf von 30 Jahren (Lynch, 2004).

Zu den extraintestinalen Manifestationen gehören die primär sklerosierende Cholangitis, die zu Stenosen in intra- und extrahepatischen Gallengängen führen kann, das Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum als Hautmanifestation, Gelenkbeschwerden (Arthritis, Spondylarthritis), Episkleritis und Iridozyklitis als Manifestation im Bereich der Augen. Das Vorliegen einer primär sklerosierenden Cholangitis und einer Backwash-Ileitis vergrößern die Wahrscheinlichkeit von Epitheldysplasien und können zu einer Erhöhung des Kolon-Ca Risikos führen.

Die Therapiewahl der Colitis ulcerosa richtet sich nach Lokalisation, Schweregrad des Schubes sowie nach dem Krankheitsverlauf. Der akute Schub wird bei distalem Befallsmuster mit topischen Präparaten wie Klysmen, Schaumpräparaten oder Suppositorien behandelt. Bewährt haben sich hierbei

5-Aminosalizylsäurepräparate und Kortikosteroide. Bei der Remissionsinduktion von weiter proximal reichenden Entzündungen haben sich orale 5-Aminosalizylate und Steroide als wirksam erwiesen. Bei steroidrefraktärer Colitis ulcerosa besteht die Indikation zur Therapie mit intravenösen Immunsuppressiva wie Cyclosporin, um eine Notfallkolektomie zu vermeiden. Bei Steroidabhängigkeit, sollten 2 Versuche zur Ausschleichung misslingen, wird eine Behandlung mit Immunsuppressiva wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin ins Auge gefasst. Im fulminanten Verlauf oder bei Therapieresistenz ist eine chirurgische Intervention nötig, mit einer ileoanal Pouchanlage. Als Komplikation kann es dabei im Verlauf zu einer zum Teil rezidivierenden Entzündung im Pouch kommen (Pouchitis). Diese tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% innerhalb von 10 Jahren auf und wird mit Antibiotika oder mit Probiotika behandelt.

Extraintestinale Manifestationen, wie zum Beispiel an den Gelenken, werden nur vorsichtig mit nichtsteriodalen Antirheumatika behandelt, die primär sklerosierende Cholangitis hingegen als Dauertherapie mit Ursodeoxycholsäure (Herrlinger, 2002; Hoffman, 2002, Nikolaus, 2007).



Abb.1.1: A-C Koloskopische Bilder einer Colitis ulcerosa in unterschiedlichen Stadien. A: Leichte Entzündung mit fehlender Haustrierung und Gefäßzeichnung; B: Mäßige Entzündung mit fehlender Haustrierung. Mukosa ist ödematös angeschwollen und zeigt multiple, fibrinbelegte Erosionen; C: Schwere Entzündung mit Einengung des Lumens durch Pseudopolypen (nach Nikolaus, 2007).

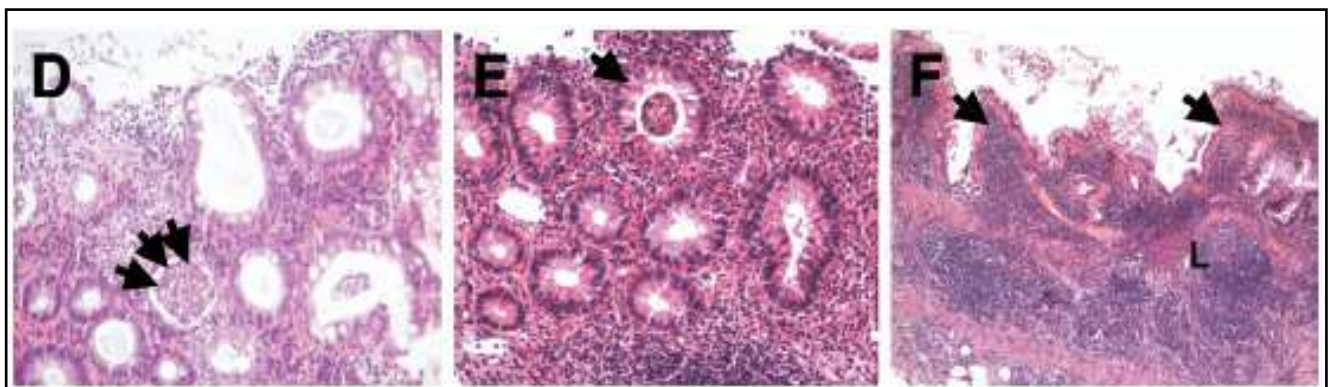


Abb.1.2: Histologische Schnitte einer durch Colitis ulcerosa befallene Kolonschleimhaut. D+E: Kryptenabszesse (Pfeile); F: Pseudopolypen (Pfeile) (nach Nikolaus, 2007).

1.1.3 Morbus Crohn

Bei dem Morbus Crohn handelt es sich um eine Entzündung des Gastrointestinaltraktes, bei der alle Wandschichten betroffen sind und die den gesamten Intestinaltrakt befallen kann. Der Morbus Crohn tritt diskontinuierlich und segmental auf, wobei ein nebeneinander Vorkommen von gesunden und erkrankten Darmabschnitten charakteristisch ist. Makroskopisch zeigt sich eine Entzündung aller Wandabschnitte, die von der Mukosa bis zur Muscularis propria und Serosa reicht. Dabei kann die Darmwand ödematös und fibrotisch verdickt sein. Dadurch kommt es zu stenotischen Einengungen des Lumens, aber auch zur Ausbildung von Fisteln unterschiedlichster Lokalisation. Regional kommt es häufig zu Lymphknotenhyperplasien und Lymphangiektasien. Mikroskopisch findet man ein entzündliches Infiltrat aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie Makrophagen und Lymphozyten. Der charakteristische Nachweis von Epitheloidzellgranulomen gelingt nur bei 40% der Betroffenen. Die häufigste Lokalisation sind das terminale Ileum und das proximale Kolon. In 30% der Fälle wird das Ileum isoliert befallen, in 25% isoliert das Kolon und in 45% der Fälle tritt ein gemeinsamer Befall auf. Intraintestinale Komplikationen ergeben sich aus der Pathogenese und führen zu Stenosen, Strikturen, Fisteln und Abszesse mit ihren entsprechenden Symptomen. Extraintestinale Manifestationen treten in Augen auf als Iritis und Uveitis, in der Haut in Form von Erythema nodosum und Pyoderma gangrenosum, sowie in Gelenken als Arthritis und Arthralgien. Eine Assoziation der Autoimmunhepatitis wurde darüber hinaus ebenfalls beschrieben. Das Entartungsrisiko mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Malignomen wird in der Literatur variabel angegeben, wobei es niedriger ist als bei der Colitis ulcerosa. Hierbei reicht die Spanne der Inzidenzratio von 5,6 bis 23,8 (Bonen, 2003). Zusätzlich können den Krankheitsprozess systemische Leiden erschweren, in Form von Anämie, Eisenmangel, Vitamin-B12-Mangel, Hypoalbuminämie, Zinkmangel, Nierensteine, Osteoporose.

Die klinische Einteilung und Therapieplanerstellung richten sich nach der Aktivität der Entzündung (CDAI, crohns disease activity index), den Empfehlungen der Vienna-Klassifikation oder ihrer Erweiterung der Montreal-Klassifikation (Gasche, 2000; Silverberg, 2005).

Der akute Schub wird in leichten bis mittelschweren Fällen oral mit Budenosid bzw. Mesalazin behandelt, in schweren Fällen mit systemisch wirksamen Steroiden oral oder intravenös. Zur Remissionserhaltung sind Mesalazin und Kortikosteroide oral, systemisch oder lokal anzuwenden, je nach Schweregrad. Im chronisch aktiven Verlauf, steroidrefraktärem Verlauf und im steroidabhängigen Verlauf wird eine Therapie angestrebt mit Azathioprin/6-Mercaptopurin und bei nicht Ansprechen mit Methotrexat und TNF-alpha-Antikörper wie Infliximab. Ein fistulierender Verlauf stellt, je nach Komplikation, eine Indikation zur erweiterten medikamentösen Therapie,

lokalen Intervention oder zu einer operativen Maßnahme dar. Die Therapie extraintestinaler Beschwerden ist schwer kalkulierbar, da es Interaktionen mit der Grunderkrankung geben kann, die eventuell zu einem erneuten Schub führen kann. Sie erfolgt symptomatisch (Hoffman, 2002; Lichtenstein, 2004; Hoffman; 2002).



Abb.1.3: Koloskopische Bilder eines Morbus Crohn. D: Leichte Entzündung mit einer aphtösen Läsion; E: Mäßige Entzündung mit multiplen flachen longitudinalen Ulzerationen; F: Schwere Entzündung mit multiplen Schneckenspurartigen Ulzerationen (nach Nikolaus, 2007)

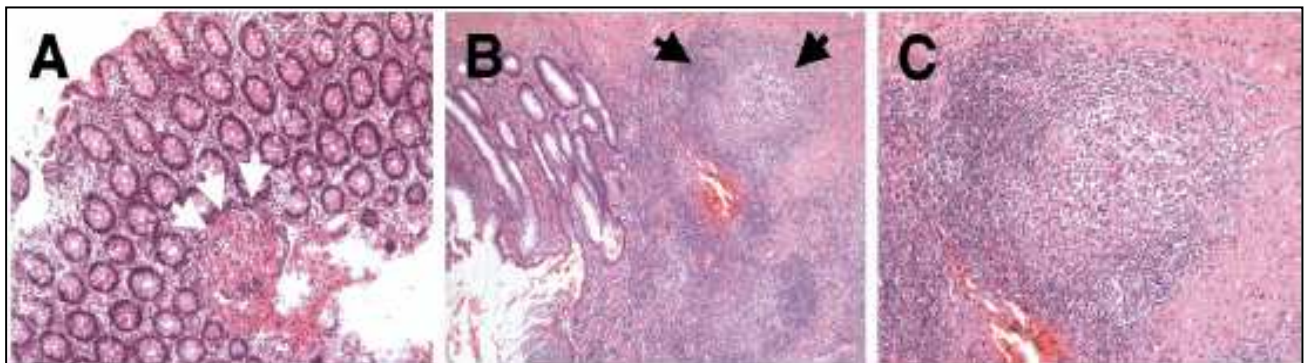


Abb.1.4: Histologische Schnitte bei einer durch Morbus Crohn befallenen Darmmukosa. A-C: Mukosa mit Granulomen (Pfeile) (nach Nikolaus, 2007)

1.2 Ätiologische Modelle zur Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Die Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist bisher noch weitgehend unverstanden. Verschiedene Einflüsse sind bekannt und in zahlreichen Studien bewiesen, jedoch ist aufgrund der Komplexität des Zusammenspiels der einzelnen Faktoren an sich und untereinander kein einheitliches Bild der Pathogenese entstanden.

Eine familiäre Häufung ist seit längerem bekannt, wodurch der Einfluss des genetischen Hintergrundes in die Pathogenese seinen Eingang findet, wobei der Einfluss beim Morbus Crohn größer ist als bei Colitis ulcerosa (Orhom, 1991; Tysk, 1988). Weiterhin ist erwähnenswert, dass Länder mit bisher niedriger Inzidenz an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in jüngster Zeit einen Zuwachs an Neuerkrankungen verzeichnen, wodurch sich ein Einfluss von Ernährungsgewohnheiten oder Umweltfaktoren vermuten lässt (Xavier, 2007). Aus histopathologischen Untersuchungen von Schleimhautbiopsien aus befallenen Darmarealen konnte man veränderte Zytokinkonzentrationen messen, die in Ihrer Gesamtheit zur Entstehung von Schleimhautulcerationen führen können, wie sie, in unterschiedlicher Weise, zu den Entitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beitragen könnten (Xavier, 2007).

Gemeinsam den Erklärungsmodellen ist, dass sie sich aus einem endogenen Teil und einem exogenen Teil zusammensetzen: Der endogene Teil besteht aus einem, mehr oder minder genetisch begründeten Einfluss auf das angeborene und erworbene Immunsystem und auf die bakterielle Homöostase im Intestinum. Der exogene Anteil basiert auf epigenetischen Einflüssen wie Ernährungsgewohnheiten, wie auch auf potentiellen pathogenen Mikroorganismen. Im Zusammenspiel könnten aufgrund einer genetischen Prädisposition und veränderten Umweltfaktoren und/oder pathogenen Mikroorganismen, Einflüsse auf das Immunsystem und auf die intestinale Homöostase entstehen, die in ihrer Gesamtheit zu einem Ungleichgewicht und zu einer Entzündung der intestinalen Mukosa führen. Siehe Abbildung 1.5.

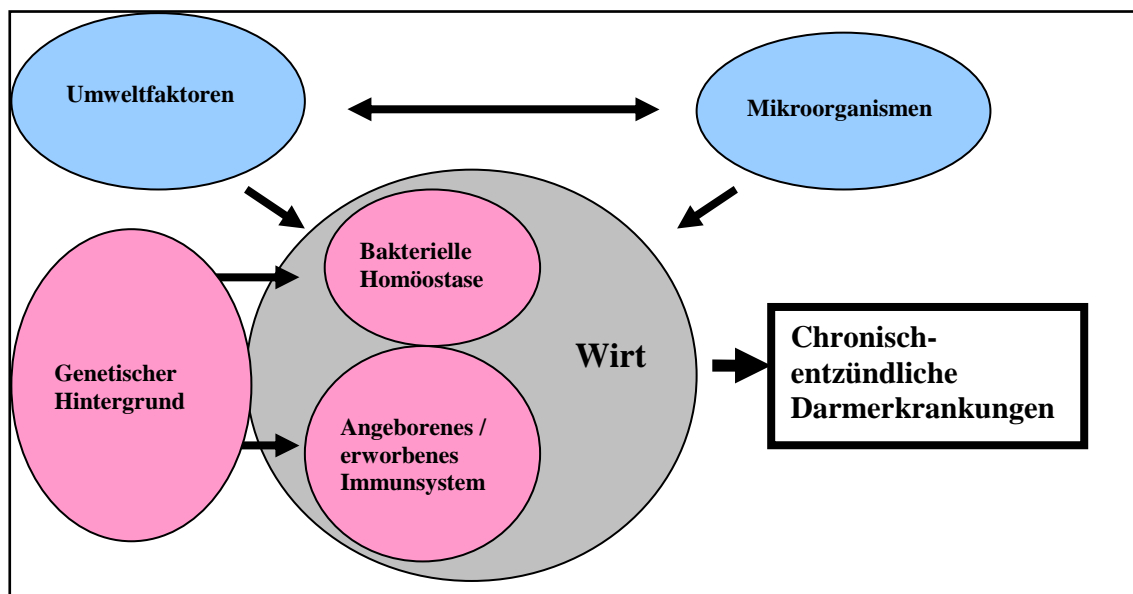


Abb.1.5: Modell zur Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Blau: Exogene Einflüsse; Rot: Endogene Einflüsse (nach Xavier, 2007)

1.2.1 Genetische Faktoren bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Übereinstimmende Ergebnisse aus der Zwillingsforschung und Multiplex-CED-Familien legten in den 1990er Jahren die Vermutung nahe, dass es eine Beteiligung der Gene an der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen geben könnte. Aufgrund funktioneller Überlegungen wurden verschiedene „Kandidaten-Gene“ untersucht. Es standen dabei Gene des HLA-Systems, Zytokine, Muzine und Integritätsproteine im Fokus (Russel, 2004). Fortschritte in der molekularen Genetik und eine Verringerung der Genotypisierungskosten ermöglichten den Sprung von der bisher Hypothesen-gestützten Forschung zu Hypothesen-freien Genomuntersuchungen am Menschen (Gaya, 2006; Van Limbergen, 2007). In diesen Genom-weiten Scans wurde nach auffälligen DNA-Sequenzen gesucht beispielsweise ATT ATT ATT oder GGG GGG GGG (Russel, 2004). Anhand solcher Muster konnten auf Chromosomen Bereiche identifiziert werden, die im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen standen (Shanahan, 2002). Es wurden dabei Loci entdeckt die mit IBD 1-9 (inflammatory bowel disease susceptibility locus 1-9) bezeichnet wurden. In diesen Regionen und auch außerhalb dieser Regionen wurden verschiedene Suszeptibilitätsgene identifiziert. (Van Limbergen, 2007).

a) Genetische Epidemiologie

Genetische Auffälligkeiten werden sichtbar, wenn man Zahlen der Inzidenz und Prävalenz von unterschiedlichen Populationen innerhalb eines Landes betrachtet (siehe Kapitel 1.1.1). Innerhalb der USA haben Untersuchungen zur Prävalenz von Morbus Crohn in einzelnen Volksgruppen ergeben, dass pro 100.000 43,6 Kaukasier, 29,8 Afro-Amerikaner, 4,1 Hispano-Amerikaner und 5,6 Asiaten betroffen sind. Innerhalb der kaukasischen Bevölkerung haben Kaukasier jüdischer Abstammung im Vergleich zu nicht-jüdischen Kaukasier eine 2-4fach höhere Inzidenz und eine 2-9fach höhere Prävalenz an einem Morbus Crohn zu erkranken. Kaukasier haben auch eine höhere Prävalenzrate als Afrikaner und auch als Asiaten, welche die niedrigste Prävalenzrate haben. Die erhöhte Inzidenz bei den Ashkenasi-Juden wurde in diesem Zusammenhang in unterschiedlichen Zeitintervallen und in unterschiedlichen Regionen erforscht und belegt (Bonen, 2003).

Weitere Beweise für eine genetische Beteiligung liefern vertikale und horizontale Untersuchungen von betroffenen Familien und ihren Angehörigen. Von diesen haben 5-10% eine positive Familienanamnese (Russel, 1997). Weiterhin ist beschrieben worden, dass belastete Familien zu 75% konkordant bezüglich einer Entität von chronisch-entzündlicher Darmerkrankung, entweder Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, sind. Die fehlenden 25% sind mit beiden Subtypen der chronisch-

entzündlichen Darmerkrankungen belastet. Krankheitscharakteristika wie die anatomische Lokalisation und bestimmte Komplikationen sind überzufällig konkordant in mehrfach betroffenen Familien beschrieben worden (Bayless, 1996; Folwaczny, 1997; Folwaczny, 1998; Schreiber, 2002). Neben Untersuchungen innerhalb von Familien ist die Zwillingsforschung von großer Bedeutung für die Evidenz einer genetischen Prädisposition. Damit werden zum Teil Unterschiede sichtbar gemacht, die nicht auf genetischem Einfluss beruhen, sondern durch die Umwelt bedingt sind. Die Konkordanz zwischen eineiigen Zwillingen liegt bei Morbus Crohn zwischen 42-58% bei Colitis ulcerosa zwischen 6 und 17%. Im Morbus Crohn unterscheidet sich das Risiko bei zweieiigen Zwillingen nicht von dem der übrigen Geschwister und bei Colitis ulcerosa liegt das Risiko zwischen 0 und 5%. Der Subtyp der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, ist einheitlich mit nahezu 100% bei eineiigen Zwillingen anzutreffen.

Um Unterschiede zwischen familiär vorbelasteten Patienten und Neuerkrankten feststellen zu können, wurde das Erstmanifestationsalter untersucht. Familienbelastete Patienten mit Morbus Crohn haben bei Erstdiagnose ein Durchschnittsalter von 22 Jahren, wo hingegen 27 Jahre das Durchschnittsalter von nicht-familiär vorbelasteten Patienten ist. Bei der Colitis ulcerosa liegt das Alter bei Erstdiagnose bei 23,3 im Vergleich zu 28,6 Jahren bei nicht-familiären Fällen (Peeters, 1996).

Diese Ergebnisse sprechen insgesamt für eine genetische Beteiligung an der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, wobei man davon ausgeht, dass ein Mendelscher Erbgang auszuschließen ist und eine polygenetische Beteiligung wahrscheinlicher ist.

b) Prädisponierende Gene

Im Rahmen der ersten 10 durchgeführten Genom-weiten Scans sind seit den frühen neunziger Jahren zahlreiche Genregionen in Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gebracht worden. Abbildung 1.6 gibt die Lokalisation der Suszeptibilitätsgenregionen und deren Signifikanz wieder.

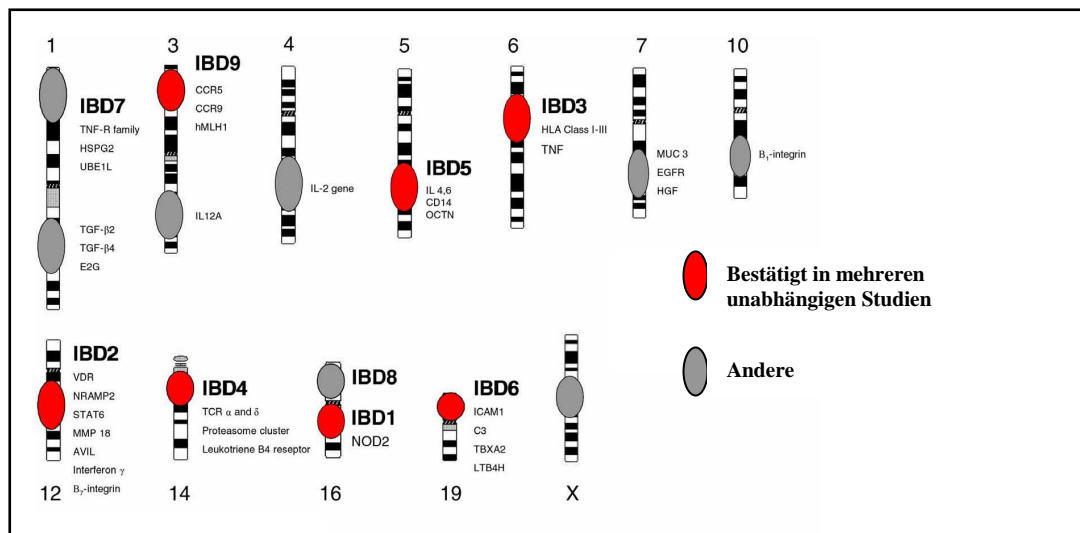


Abb.1.6: IBD = inflammatory bowel disease; Genorte im menschlichen Genom, die in den ersten Genom-weiten Scans in Verbindung zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gebracht wurden (nach Ahmad, 2001)

Diese Genorte wurden, ihrer Beschreibung nach chronologisch, mit IBD 1-9 bezeichnet. 6 dieser 9 Loci sind in voneinander unabhängigen Studien wiederholt bestätigt worden und erfüllen strikte Kriterien für eine signifikante Kopplung: IBD1 auf dem Chromosom 16q12, IBD2 auf dem Chromosom 12q13, IBD3 auf dem Chromosom 6p13, IBD4 auf dem Chromosom 14q11, IBD5 auf dem Chromosom 5q31-33 und IBD6 auf dem Chromosom 19p13. Weitere Loci sind auf den chromosomalen Regionen 1p36, 7q und 3p beschrieben worden. Hierbei sind IBD1, IBD4 und IBD5 spezifisch für Morbus Crohn, während IBD2 nur für Colitis ulcerosa spezifisch ist. IBD3, IBD6 und andere Loci wurden in beiden Subpopulationen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gefunden. Eine Übersicht über Lokalisation und beschreibende Forschergruppe gibt die Tabelle 1.7 wieder.

IBD-Locus	Lage im Chromosom	Suszeptibilitätsgene	assoziierte Erkrankung	Literatur
IBD1	16q12	<i>CARD15</i>	Morbus Crohn	(Hugot et al. 1996, Cho et al. 1998, Curran et al. 1998, Hampe et al. 1999a, IBD International Consortium. 2001, Williams et al. 2002)
IBD2	12q14	unbekannt	Colitis ulcerosa	(Satsangi et al. 1996b, Curran et al. 1998, Duerr et al. 1998, Hampe et al. 1999a, Ma et al. 1999, Parkes et al. 2000)
IBD3	6p	unbekannt	CED	(Barmada et al. 2004, Hampe et al. 1999a, Hampe et al. 1999b, Rioux et al. 2000, Williams et al. 2002)
IBD4	14q11-q12	unbekannt	Morbus Crohn	(Duerr et al. 1998, Ma et al. 1999, Duerr et al. 2000, Vermeire et al. 2004b, Pierik et al. 2005)
IBD5	5q31-33	<i>SLC22A4/A5</i>	Morbus Crohn	(Cho et al. 1998, Ma et al. 1999, Rioux et al. 2000)
IBD6	19p13	unbekannt	CED	(Rioux et al. 2000, van Heel et al. 2003)
IBD7	1p36	unbekannt	CED	(Cho et al. 1998)
IBD8	16q13	unbekannt	Morbus Crohn	(Satsangi et al. 1996b)
IBD9	3p26	unbekannt	CED	(Satsangi et al. 1996b, van Heel et al. 2003, Hampe et al. 2001a, Duerr et al. 2002)

Abb.1.7: Chromosomale Lokalisation, Suszeptibilitätsgene in der Region und Literaturangaben für die 9 zuerst beschriebenen Kopplungsregionen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (nach Schnitzler, 2007).

Abgesehen vom NOD2/CARD15 auf dem Chromosom 16, welches als erstes Suszeptibilitätsgen für den Morbus Crohn entdeckt wurde und vom IBD5 Locus, führte die Untersuchung von Suszeptibilitätsgenen in diesen Regionen zu keiner eindeutigen Assoziation mit den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Vor einem Jahr sind weiter Genom-weite Analysen durchgeführt worden, die zur Identifizierung weiterer Gene bzw. Suszeptibilitätsvarianten geführt haben (Cho, 2007b). Abbildung 1.9 bringt eine Übersicht über die signifikanten Assoziationen.

Gene or Locus	Genomic Location	Function and/or Genes in the Region
<i>NOD2</i>	16q12	Intracellular sensor of peptidoglycan
<i>IL23R</i>	1p31	IL-23 receptor
<i>ATG16L1</i>	2q37	Autophagy gene
Intergenic region	5p13	? <i>PTGER4</i> ; <i>CARD6</i>
<i>IBD5</i>	5q31	? <i>SLC22A4</i> , ? <i>SLC22A5</i> , ? <i>IRF1</i>
MHC region	6p21	Major histocompatibility complex
<i>PTPN2</i>	18p11	T-cell protein tyrosine phosphatase
<i>IL12B</i>	5q33	Interleukin-12/23 p40 subunit
<i>NKX2-3</i> region	10q24	Gut immune development
Intergenic region	10q21	? <i>ZNF365</i> ; ? <i>EGR2</i>
Gene-rich region	3p21	Many
<i>IRGM</i> gene region	5q33	Autophagy gene

Abb.1.8: Definitive Assoziation mit den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (nach Cho, 2007b)

Im Folgenden soll kurz auf die neu beschriebenen Suszeptibilitätsgene bzw. die Loci IL23R, ATG16L1, IBD5 und IRGM eingegangen werden.

IL23R ist der Rezeptor für das Interleukin 23 (IL23) (Van Limbergen, 2007). Interleukin 23 bedingt die Differenzierung von indifferenten T-Helfer-Lymphozyten in spezialisierte T-17-Helfer-Lymphozyten, Th-17-Zellen (Steinmann, 2007). Im Tierversuch führten diese Th-17-Zellen im Gastrointestinaltrakt zu autoimmuner und chronischer Entzündung, wobei das IL-23 eine tragende Rolle spielte (Hue, 2006). Mutationen im IL-23R-Gen, die zu einem mehr oder minderen Funktionsverlust des Proteins führten, zeigten einen protektiven Effekt bezüglich der Entstehung von Morbus Crohn im Vergleich zu Kontrollpersonen (Duerr, 2006; Dubinsky 2007; Van Limbergen, 2007).

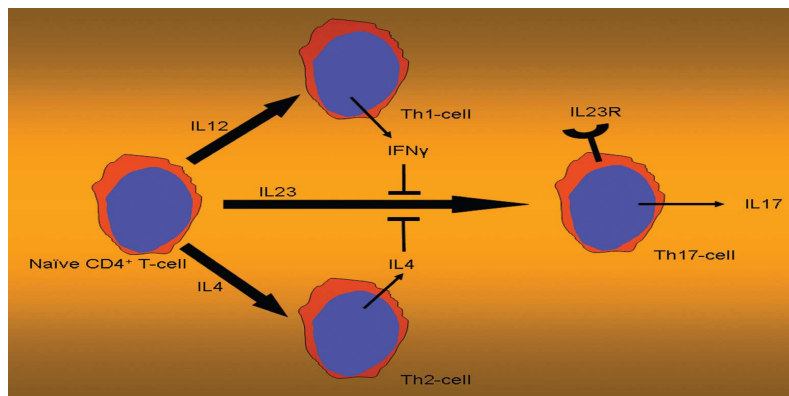


Abb.1.9: Differenzierung von indifferenten/naiven T-Zellen zu Th17-Zellen (IL12=Interleukin 12; IL4=Interleukin 4; IL23=Interleukin 23; IFN γ =Interferon gamma; IL23R=Interleukin 23 Rezeptor; IL17=Interleukin 17) (nach Cho, 2007b)

Das Gen ATG16L1 auf Chromosom auf 2q37 kodiert für ein Protein welches bedeutend ist für die Rolle von Zellen, die die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen, da es in dem Vorgang der bakteriellen Prozessierung und der Autophagozytose wichtige Funktionen einnimmt (Hampe, 2007). Das Ausschalten dieses Gens hat zu einer verminderten Fähigkeit der Zelle geführt die Phagozytose von *Salmonella typhimurium* (Rioux, 2007) durchzuführen. Die ist als eine Rolle des Proteins in der Abwehr gegenüber intrazellulären Erregern zu verstehen. Verschiedene Untersuchungen haben die Assoziation von genetischen Varianten in diesem Gen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bestätigt (Libioulle, 2007; Parkes, 2007; Wellcome, 2007; Baldassano, 2007; Cummings, 2007; Prescott, 2007).

Der IBD5-Locus auf dem Chromosom 5q31 wird wiederholt mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht. Die Identifizierung der kausalen Mutationen in der Region war jedoch aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichtes schwierig. Vor 3 Jahren sind 2 Varianten in den Genen SLC22A₄ und SLC22H₅ beschrieben worden, welche als krankheitsverursachende Mutationen vorgeschlagen wurden. Die Kausalität der beiden Varianten

bleibt jedoch fraglich. (Rioux, 2001; Negoro, 2003; Peltekova, 2004; Török, 2005; Noble, 2005; Silverberg, 2007).

Das Gen IRGM (immunity-related GTPase protein type M) liegt auf Chromosom 5q33 und das Protein ist ebenso wie ATG16L1 für Zellen, die die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen. Es ist gezeigt worden, dass es eine besondere Rolle bei der Phagozytose von Mycobakterien inne hat und Varianten in diesem Gen wurden eindeutig mit Morbus Crohn assoziiert (Singh, 2006).

c) Der *IBD1* Locus

Die perizentromerische Region des Chromosoms 16 wurde 1996 erstmals von dem Pädiater Hugot in Zusammenhang mit Morbus Crohn gebracht und als IBD1 Locus benannt (Hugot, 1996). In weiteren Studien wurde diese Kopplung mit Morbus Crohn bestätigt (Ohmen, 1996, Curran, 1998; Cavanaugh, 1998; Cho, 1998; Annese, 1999). In den darauffolgenden Jahren ist dann in diesem Bereich das Gen *CARD15/NOD2* identifiziert worden. Siehe Abbildung 1.10.

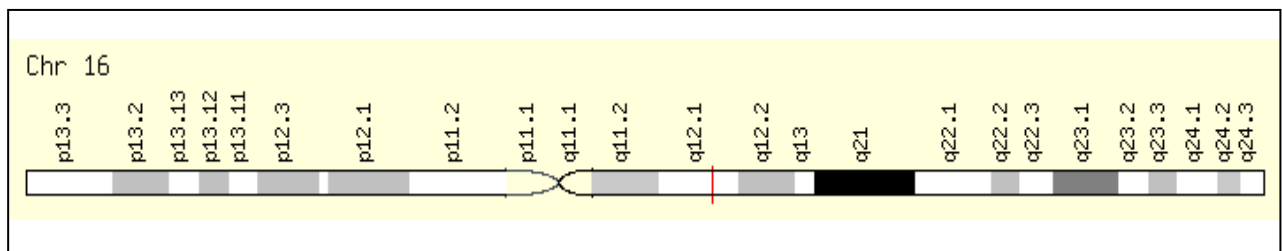


Abb.1.10: Chromosom Nr.16 mit IBD1 Locus (rote Linie) (nach Kambe, 2005)

d) Das *CARD15/NOD2*-Gen

Nachdem 1996 der IBD1 Locus beschrieben wurde, gelang es im Jahre 2001 das Gen zu identifizieren, welches für die Kopplung mit Morbus Crohn verantwortlich ist. Es ist das *NOD2*-Gen (nucleotide oligomerization domain 2) das auch *CARD15* (caspase activating and recruitment domain 15) genannt wird (Hugot, 2001; Ogura, 2001). Dieses Gen besteht aus 11 konstanten Exons und einem variablen zwölften Exon (Ogura, 2001). Siehe Abbildung 1.11.

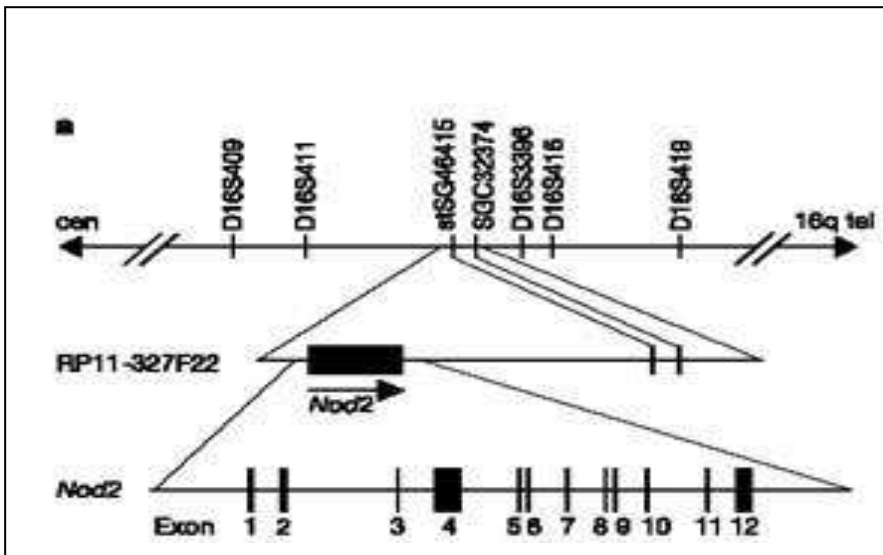


Abb.1.11: Der *IBD1*-Locus auf Chromosom 16q12 mit den DNA-Markern und das *CARD15*-Gen mit den 12 Exons. In der Mitte ist der humane genomische BAC ("bacterial artificial chromosome")-Klon RP11-327F22 mit dem *CARD15*-Gen dargestellt (nach Ogura, 2001)

Im Rahmen dieser und weiterer Untersuchungen ist (Russel, 2004; Hugot, 2001) die Identifikation von 3 Veränderungen in diesem Gen, welche überzufällig häufig bei Patienten mit Morbus Crohn vorkommen, möglich gewesen: eine Insertionsmutation c.3020insC (p.Leu1007fsX1008) und zwei Nukleotidaustausche c.2104C>T (p.R702W) und c.2722G>C (p.G908R) (Hugot, 2001). 10-30% der Morbus Crohn Patienten sind heterozygot für eine der 3 Mutationen, während 3-15% der Patienten entweder homozygot oder compound-heterozygot für eine der 3 Mutationen sind. Im Vergleich dazu sind 8% einer gesunden Vergleichspopulation heterozygot und 0-1% homozygot oder compound-heterozygot für eine der 3 Mutationen. In weiteren Studien zeigte sich, dass die Kombination aus den 3 Mutationen zusammen bis zu 82% der mutierten Allele in Individuen in Studien über Morbus Crohn Befallene darstellten (Hugot, 2001; Ogura, 2001; Lesage, 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass das relative Risiko an Morbus Crohn zu erkranken im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung als Träger einer der 3 Mutationen bei 1,5-3% liegt. Bei Befall zweiter Allelen steigt das Risiko auf bis zu 40% an (Hampe, 2001; Lesage, 2002; Cuthbert, 2002; Ahmad, 2002; Vermeire, 2002; Bonen, 2003; Akolkar, 2001; Cavanaugh, 2003; Newman, 2004; Hugot, 2001; Ogura, 2001). Allerdings weisen 60-70% der Morbus Crohn Betroffenen keine dieser Mutationen auf (Abreu, 2002; Ahmad, 2002; Cuthbert, 2002; Hampe, 2002; Lesage, 2002; Vermeire, 2002). D.h. dass diese 3 Genveränderungen nicht ausschließlich für die Entstehung von Morbus Crohn verantwortlich gemacht werden können (Hugot, 2002; Hampe, 2002, Linde, 2003). Das Fehlen einer 100%igen Assoziation zwischen diesen Mutationen und das Vorkommen von Morbus Crohn lässt zum einen Fragen offen bezüglich der Pathogenese, zum anderen erlaubt es den Rückschluss, dass die Pathogenese nicht ausschließlich auf diese speziellen genetischen Ursachen zurückzuführen ist, sodass noch andere genetische und umweltbedingte Faktoren auf die Entstehung dieser Entität miteinbezogen werden sollten.

Assoziationsstudien mit CARD15/NOD2 Mutationen in Patientengut aus europäischen, nord-amerikanischen, israelischen und australischen Kohorten bestätigen die oben genannte Assoziation. Studien aus Finnland, Irland und Schottland belegen dies ebenfalls, allerdings mit geringeren Häufigkeiten. In der schwarzen Bevölkerung liegt die Assoziationsstärke im Allgemeinen niedriger als in der kaukasischen, wohingegen keine Mutationen in der chinesischen, koreanischen oder japanischen Population gefunden werden konnten (Ahmad, 2004).

e) Das *NOD2*-Protein

Das *NOD2*-Protein besteht aus zwei N-terminalen caspase recruitment domains (CARDs), einer zentral lokalisierten nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) und zehn sogenannten leucine-rich repeats (LRRs) am COOH-Terminus, die aus je 27 Aminosäuren bestehen. Siehe Abbildung 1.12. (Hugot, 2001; Inohara, 2002).

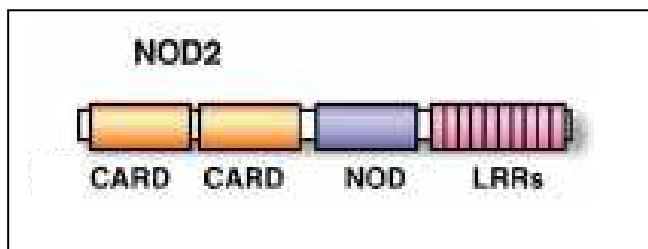


Abb.1.12: Strukturmodell von *NOD2* (modifiziert nach Kambe, 2005)

Es gehört zu einer Familie von Proteinen, die in der Evolution aufgrund ihrer wichtigen Funktion als Schutzbarriere gegen Eindringlinge in der Mukosa genetisch streng konserviert wurden und dadurch in vielen Eukaryoten Verwandte besitzt. Siehe Abbildung 1.13.

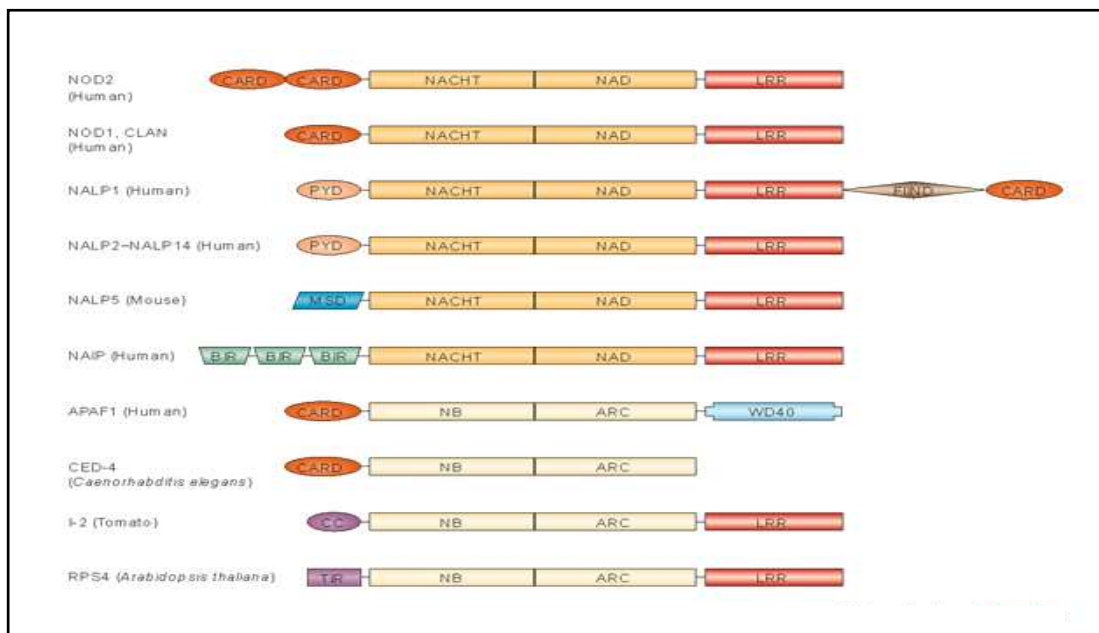


Abb.1.13: CATERPLLAR -verwandte Genprodukte von Eukaryoten (CARD, Transcription Enhancer, R(purin)-binding, PyrIn, Lots of LEucine repeats). CARD= caspase recruitment domain; PYD= pyrin domain; MSD= murine maternal specific domain; BIR= baculovirus inhibitor of apoptosis repeat; CC= coiled coils; TIR= Toll/interleukin-1 receptor domains; NACHT= nucleotide-binding domain found in NAIP, CIITA, HET-E and TP1; NAD= NACHT associated domain; NB= nucleotide binding; ARC= APAF1 R-gene products and CED-4, LRR= leucine rich- repeats; WD40= cytochrome c sensing domain of APAF1; FIIND= an interaction domain involved in inflammasome formation (modifiziert nach Schreiber, 2005)

NOD2 wird vor allem in Monozyten und dendritischen Zellen, aber auch in intestinalen Epithelzellen, vor allem in Panethzellen, expremiert, weiterhin in intestinalen Myofibroblasten, Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Osteoblasten (Ogura, 2001; Ogura, 2003; Otte, 2003; Davey, 2006; Lala, 2003; Girardin, 2003; Inohara, 2001; Inohara, 2002; Gutierrez, 2002; Berrebri, 2003; Rosenstiel, 2003; Hisamatsu, 2003). In Enterozyten ist die basale Expression von NOD2 niedrig, hingegen erhöht bei entzündlichem Befall (Rosenstiel, 2003). In kultivierten Enterozyten kann die NOD2-Expression durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor alpha und Interferon gamma (Rosenstiel, 2003) induziert werden.

Als das NOD2 Protein zu Beginn identifiziert wurde, wurde es mit Proteinen von Pflanzen in Beziehung gebracht, welche zum Schutz gegen Schädlinge eine Rolle spielen und zwar mit Pathogenrezeptoren. NOD2 gehört zu der Familie der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die sogenannten Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) (Ogura, 2001). Später fand man heraus, dass NOD2 als intrazellulärer Rezeptor für MDP (MurNac-L-Ala-D-isoGln oder muramyl dipeptid)

fungiert. MDP ist ein Bestandteil des Peptidoglykans, das in der Zellwand von gramnegativen und von grampositiven Bakterien vorkommt (Girardin, 2003; Inohara, 2003).

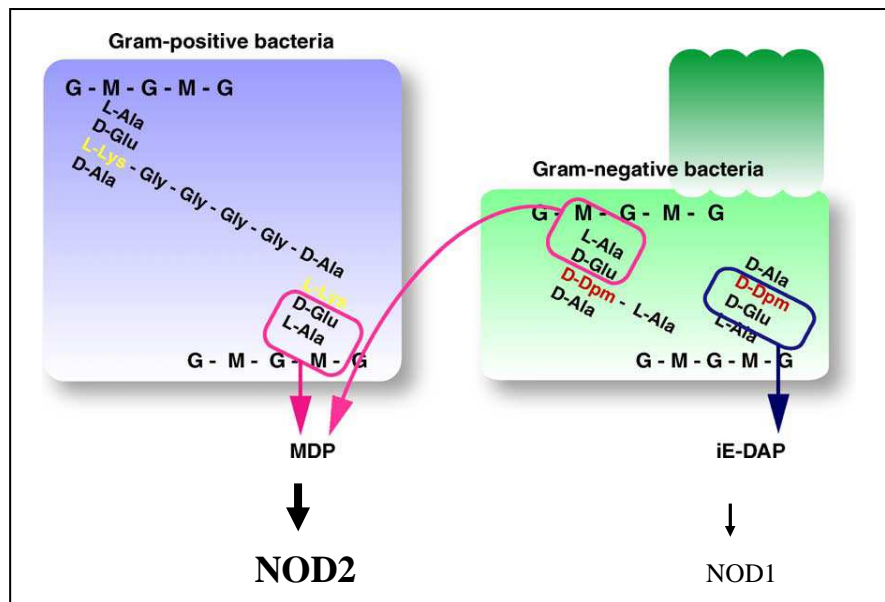


Abb.1.14: Aktivierungsmotiv für NOD2 und NOD1 (modifiziert nach Kambe, 2005)

Die Erkennung von MDP (muramyl dipeptid) erfolgt in der LRR-Region (leucin rich repeats) (Kambe, 2005). Morbus Crohn assoziierte genetische Varianten im NOD2 bedingen Strukturveränderungen, die zu Funktionseinbußen führen. Sie wurden hauptsächlich in der Nähe oder im LRR-Bereich gefunden und nicht am N-Terminus des Proteins (Eckmann, 2005). Siehe Abbildung 1.12. Die Leu1007fsinsC Mutation ist eine “non-sense“ Mutation, welche eine Laserrasterverschiebung in der Proteinsynthese des NOD2 Proteins bedingt, wodurch das Protein um 33 Aminosäuren verkürzt wird (Ogura, 2001). Die R702W und G908R Mutationen, beides “mis-sense“ Mutationen, führen ihrerseits auch zu Veränderungen in der LRR-Region. Dadurch kommt es zu einem signifikanten Funktionsverlust in der Erkennung von MDP mit verlorener Rezeptorfunktion des NOD2-Proteins (Ogura, 2001; Li, 2004). Nach Ligandenbindung kommt es normalerweise zu einer Oligomerization mit Hilfe der NO-Domäne (nucleotide oligomerization) (Kambe, 2005). Diese Oligomerization befähigt das Protein mit der Seronin-Threonin-Kinase namens RICK/RIP2 zu interagieren und via des Kernfaktors NF-κB die Induktion von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, Induktion von Co-Molekülen der T-Zell-Aktivierung, Induktion von epithelalem Zellverteidigungsmuster und Vermittlung von zahlreichen antimikrobiellen Zellantworten zu bewirken (Vidal, 2001; Fritz, 2005; Iinuma, 1995; Todate; 2001; Abbott, 2004; Kobayashi, 2002; Wehkamp, 2004)

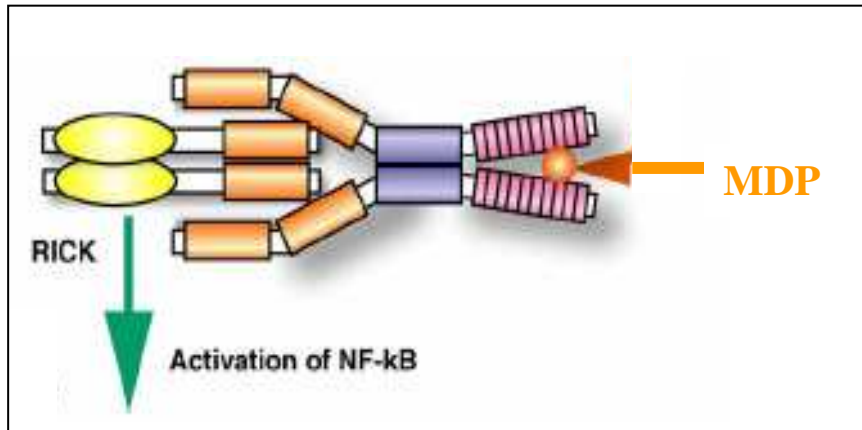


Abb.1.15: Schematische Darstellung der Ligandenbindung, Oligomerization und RICK-Aktivierung nach Ligandenbindung von mDP an das NOD2 Protein (modifiziert nach Kambe, 2005)

1.2.2 Epigenetische Faktoren

Neben genetischen Einflüssen wurden auch epigenetische Faktoren für die Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen verantwortlich gemacht. Die Suche nach krankheitsverursachenden Faktoren wurde dadurch angetrieben, dass kein einheitliches genetisches Modell gefunden wurde, welches die Pathogenese zur Gänze erklärt. Aufgrund der nicht ganz 100%igen Konkordanz bei eineiigen Zwillingen, den regionalen und nationalen Unterschieden und dem Nord-Süd-Gefälle in einigen Kontinenten wurde der Einfluss von epigenetischen Faktoren auf Inzidenz und Prävalenz vermutet.

a) Die bakterielle Darmflora

Der Gastrointestinaltrakt besitzt aufgrund seiner Größe und seiner besonderen Eigenschaften ein eigenes Immunsystem, welches als GALT (gut associated lymphoid tissue) bezeichnet wird. Dieses muss in Zusammenarbeit mit der Mukosa des Intestinums, in Form einer mechanischen Schranke, 2 lebenswichtige Aufgaben gleichzeitig erfüllen: zum einen muss die Aufnahme von Nährstoffen gewährleistet sein und zum anderen die Verteidigung des Wirts gegen Antigene, die sowohl aus der Nahrung, als auch von Mikroorganismen stammen können. Zusätzlich soll das Immunsystem des Darms, tolerant sein gegenüber annähernd 10^{13} kommensale Mikroorganismen, welche zusammen mehr Zellen besitzen als der Körper des menschlichen Wirts. Diese Symbiose von Mensch und Bakterium ist nicht zufällig, sondern hat sich im Laufe der Evolution zum Vorteil beider Lebewesen entwickelt. Der Darm ist eine ökologische Nische, in der die Mikroorganismen Wärme, Nahrung und

Schutz bekommen, während der Wirt Vitamin K, Teile des Vitamin-B-Komplexes, kurzkettigen Fettsäuren und Schutz vor pathogenen Mikroorganismen bekommt.

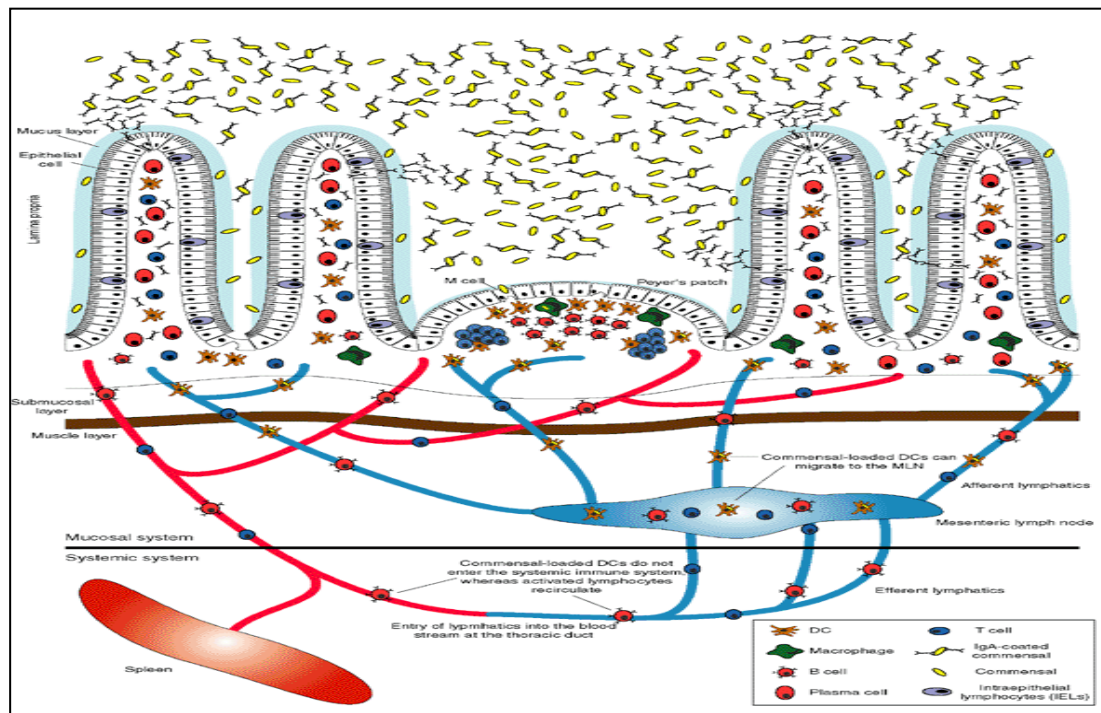


Abb.1.16: Übersicht über das GALT und seine zellulären Anteile (nach Macpherson, 2005)

Es ist verständlich, dass dieses Gleichgewicht nicht leicht zu halten ist und sehr anfällig für Störungen sein kann, wie es die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zeigen (Mac Donald, 2005). Zahlreiche Befunde und Untersuchungen belegen die Bedeutung von bakteriellen Antigenen für die Entstehung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Holtmann, 2002). Hierfür spricht die häufige Manifestation in den Darmarealen mit den höchsten Bakterienkonzentrationen (Ileum, Kolon). Darauf basierend konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass Tiere unter keimfreien Bedingungen keine intestinale Entzündung mehr entwickeln im Vergleich zu normal gehaltenen Tieren. Zudem kann die Unterbrechung der Darmassage durch einen Anus-*praeter* distal gelegene Darmläsionen beim Morbus Crohn zur Abheilung bringen, während es nach Wiederherstellung der Passage zu einem Rezidiv kommen kann (Shanahan, 2000). Schließlich kann eine Instillation von Darminhalt aus betroffenen Darmarealen bei Morbus Crohn in operativ ausgeschaltete Darmareale zu Rezidiven der Erkrankung in den ausgeschalteten Arealen führen (D'Haens, 1998).

b) Pathogene Mikroorganismen

Bei der Suche nach ursächlichen Faktoren, die zur Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beitragen könnten, ist man in einigen Studien einzelnen Mikroorganismen nachgegangen. Es wurde vermutet, dass die Infektion mit dem intrazellulären Erreger *Mycobacterium paratuberculosis* eine Rolle bei der Entstehung spielen könnte. Hierzu wurde ein Modell vorgeschlagen, das dem der *Helicobacter pylori* Infektion bei der Gastritis Typ B gleichkommt (Chiodini, 1984). Der Nachweis einer signifikanten Erhöhung von Antikörper Typ A, G, oder M gegen Antigene des *Mycobakterium* gelang jedoch nicht (Kobayashi, 1988), ebenso wie der immunhistochemische Nachweis des Organismus in entnommenen Proben (Kobayashi, 1989). Ein weiterer Vertreter der Mikrobiologie im Modell der Pathogenese war das Masern-Virus aus der Gruppe der Paramyxoviren. Es ist vermutet worden, dass dieses Virus vaskuläre Mikroläsionen verursacht und somit zu einer granulomatösen Entzündung führen kann (Wakefield, 1993). Mittlerweile besteht lediglich noch der Verdacht, dass eine perinatale Infektion mit dem Masern-Virus das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken signifikant erhöht (Ekbohm, 1994). Weiterhin wurde vermutet, dass ein nicht-konventionelles Bakterium oder Virus einen Beitrag in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hat (Mitchell, 1970). Als Beweis wurde die Tatsache verwendet, dass eine chronische, granulomatöse Entzündung mit homogenisierten Proben von Morbus Crohn Patienten hervorgerufen werden kann. Dies ist als Beweis jedoch widerlegt worden, als man herausfand, dass diese Entzündung durch toxische Proteine aus den Proben selbst verursacht wurde (McLaren, 1982). Eine protektive Auswirkung auf die Entwicklung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben jedoch vermehrte Infektionen in der Kindheit aufgrund eines geringen Hygienestatus (Gent, 1994). Ob dabei eine veränderte Antwort der T-Helfer-Zellen in Frage kommt oder ob die Ursache hierfür bei den regulatorischen T-Zellen liegt, wird heute noch untersucht.

c) Das Rauchen

Ein etablierter nicht mikrobieller Faktor ist der Tabakkonsum bzw. die Inhalation von Tabakrauch. Es wurde gezeigt, dass sowohl das aktive (Jick, 1983), als auch das passiv Rauchen (Sandler, 1992) einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer Colitis ulcerosa ausüben. Hingegen hat der Tabakkonsum einen nachteiligen Effekt, in dem das Entstehen eines Morbus Crohn gefördert wird (Calkins, 1989). Dieser Trend wurde ebenfalls in Kohortenstudien beobachtet, mit mehr betroffenen Familienmitgliedern, sowohl für Morbus Crohn als auch für Colitis ulcerosa (Lee, 1996). Die

gegensätzlichen Auswirkungen bei Morbus Crohn im Vergleich zur Colitis ulcerosa, liegen möglicherweise in deren unterschiedlicher Pathogenese. Die vermuteten direkten homöostatischen Veränderungen, die durch das Rauchen verursacht werden, sind in Abb.1.17 aufgeführt:

- Beeinflussung der zellulären bzw. humoralen Immunantwort
- Veränderung der Zytokin Expressionsmuster
- Veränderung der Eicosanoid-vermittelten Entzündung
- Reduktion, der antioxidativen Kapazität
- Produktion von Sauerstoff-Freien Radikalen
- Produktion körpereigener Glukokortikoide
- Veränderte Zusammensetzung des Mukus im Kolon
- Veränderung der mukosalen Durchblutung
- Pro-thrombotische Effekte
- Erhöhte Permeabilität
- Veränderte Motilität

Abb.1.17: Potentielle, durch Rauchen veränderte Mechanismen mit Bedeutung für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (modifiziert nach Birrenbach, 2004)

1.3 Die Rolle des *NOD2*-Proteins beim Morbus Crohn

NOD2/*CARD15* ist das erste, stark mit Morbus Crohn assoziierte Gen. Das *NOD2*-Protein gehört zu der Familie der Pattern-Recognition-Rezeptoren. Es ist ein Rezeptorprotein mit mehreren funktionellen Domänen (siehe Abbildung 1.18).

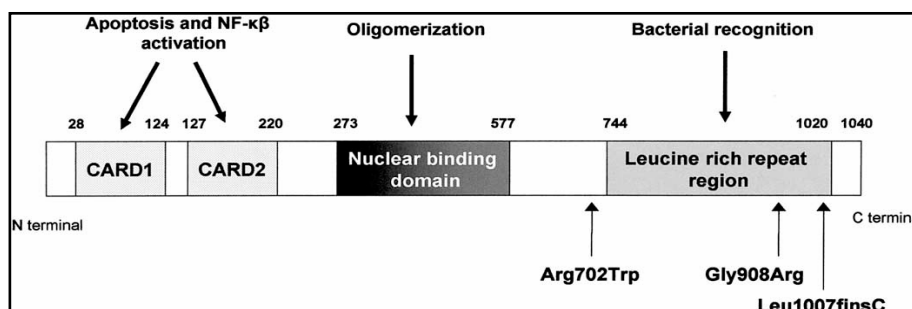


Abb.1.18: Modell des *NOD2*-Proteins mit den 3 beschriebenen Mutationen (nach Kambe, 2005)

Es sind über 60 genetische Varianten im *NOD2*-Gen beschrieben worden (Ahmad, 2002), von denen 3 die höchste Assoziation mit Morbus Crohn aufweisen: Arg702Trp (Exon 4), Gly908Arg (Exon 8) und Leu1007fsinsC (Exon 11). Diese 3 genetischen Varianten stellen gemeinsam bis zu 82% der

Mutationen in untersuchtem Patientengut von Morbus Crohn Patienten dar und erhöhen, jede unabhängig von der anderen, das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken, nicht jedoch an Colitis ulcerosa (Hugot, 2001; Ogura, 2001; Lesage, 2002). Zusätzlich prädisponieren diese genetischen Varianten für einen bestimmten klinischen Phänotyp, mit Hauptlokalisation im Ileum (Hugot, 2001, Ogura, 2001; Lesage, 2002, Cho, 2007a). Das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken ist bei Individuen, die heterozygot für eine der 3 Mutationen sind um das 2,4fache und bei homozygoten oder compound-heterozygoten um das 17,1fache erhöht (Ecomonou, 2004). Dieses Krankheitsrisiko ist eines der größten beschriebenen Risiken im Zusammenhang mit der multifaktoriellen Krankheit (Cho, 2007b). Weiterhin ist festgestellt worden, dass homozygote und compound-heterozygote Anlageträger signifikant häufiger einen fistulierendem oder stenosierendem Verlauf entwickeln und ein um 2-3 Jahre früheres Manifestationsalter aufweisen als Morbus Crohn Betroffene ohne diese genetischen Veränderungen (Lesage, 2002).

35-45% der Morbus Crohn Patienten besitzen eine heterozygote Anlage von einer der 3 Mutationen und 10% ein homozygote oder compound-heterozygote Anlage (Vermeire, 2005). Weniger Anlageträger sind in skandinavischen, irischen und schottischen Untersuchten gefunden worden, kaum welche in der schwarzen Bevölkerung und keine der 3 Mutationen sind in asiatischen Morbus Crohn Patienten gefunden worden (Helio, 2003; Bairead, 2003; Arnott, 2004; Croucher, 2003; Yamazaki, 2002; Leong, 2003; Kugahtasan, 2005).

NOD2 ist ein zytoplasmatisches Protein, das als mikrobieller Rezeptor für die Erkennung von MDP (muramyl dipeptid) von Bedeutung ist. MDP ist ein Motiv vom Peptidoglykan, das in der Zellwand von grampositiven und gramnegativen Bakterien vorkommt (Girardin, 2003; Inohara, 2003). NOD2 erkennt MDP mit Hilfe der LRR-Region (leucin rich repeats) am C-Terminus des Proteins und aktiviert über mehrere Schritte den Kernfaktor NF- κ B, der seinerseits die Induktion von einem Orchester an pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen bewirkt (Fearnley, 2001; Takaesu, 2003; Chen, 2004; Barnich, 2005). Entsprechend dem Zytokinsekretionsmuster kann die Immunantwort unterteilt werden in eine Th-1 oder Th-2 zellvermittelte Reaktion auf das Pathogen (Lotz, 2006). Bei einer Th-1 vermittelten Immunantwort kommt es zu einem dominieren der Zytokine Interleukin 1, 2, 6, 12, 18, Tumornekrosefaktor alpha und Interferon gamma (Neumann, 2007). Bei einer Th-2 vermittelten Immunantwort herrschen die Zytokine Interleukin 4, 5 und 10 vor (Neumann, 2007). In mehreren Studien ist belegt worden, dass es im Rahmen des Morbus Crohn zu einer Th-1 vermittelten Immunantwort, mit dem Überwiegen der oben genannten Zytokine kommt (Reinecker, 1993; Reimund, 1996; Fuss, 1996; Kakazu, 1999; Annunziato, 2007), hingegen zu einer Th-2 vermittelten Immunantwort im Rahmen der Colitis ulcerosa (Camoglio, 1998; Sawa, 2003).

Die Abhängigkeit von NOD2-Mutationen sind im Hinblick auf das Zytokinexpressionsmuster kontroversen Theorien postuliert worden:

Es existieren derzeit mehrere Theorien bezüglich der funktionellen Verbindung zwischen Mutationen im NOD2-Gen und das Entstehen von Morbus Crohn. Zunächst ist mehrfach beschrieben worden, dass es bei Mutationen im NOD2-Gen zu einer verringerten Aktivierung des Kernfaktors NF- κ B kommt, mit einer verringerten Freisetzung von Immunmediatoren (Ogura, 2001; Kobayashi, 2005).

Einige Untersuchungen sprechen für eine Rolle des NOD2-Proteins in der Abwehr gegenüber Bakterien. Genetisch veränderte Mäuse, denen das NOD2-Gen ausgeschaltet wurde, waren anfälliger für eine orale Verabreichung des Bakteriums *Listeria monocytogenes*, was in Verbindung mit einer geringeren Paneth-Zell-vermittelten Expression von antimikrobiellen Proteinen wie Defcr-4 und Defcr-rs10 gebracht wurde (Kobayashi, 2005). An transfizierten intestinalen Epithelzellen, denen die Fähigkeit vermittelt wurde NOD2 zu exprimieren, ist beobachtet worden, dass diese das Eindringen und das Wachstum des enteropathogenen Bakteriums *Salmonella typhimurium* verhindern können (Hisamatsu, 2003). Weiterhin ist vorgeschlagen worden, dass NOD2 die Abwehr gegenüber *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobakterium* Stämmen begünstigen würde (Cho, 2007). Was die Darmmukosa von Morbus Crohn Patienten betrifft, so wurde in Ileumbiopsaten von Betroffenen beim Vorhandensein von NOD2-Mutationen eine herabgesetzte Expression der antimikrobiellen alpha-Defensine HD-5 und HD-6 beschrieben (Wehkamp, 2004). Unterstützend ist die Tatsache, dass antibiotische Therapieansätze sehr effizient in manchen Morbus Crohn Untergruppen angewendet werden (Isaacs, 2004). Gemeinsam diesen Ausführungen ist, dass sie die Theorie unterstützen, dass es aufgrund von Veränderungen im NOD2-Protein zu einer gestörten Immunantwort kommen kann mit einer verminderten Reaktion gegenüber eindringenden Bakterien (Eckmann, 2005). Dadurch könnte es zu einer vermehrten Besiedlung des Intestinums mit pathogenen Eindringlingen kommen, die eine andauernde Entzündung unterhalten könnten. Siehe Abbildung. 1.19.

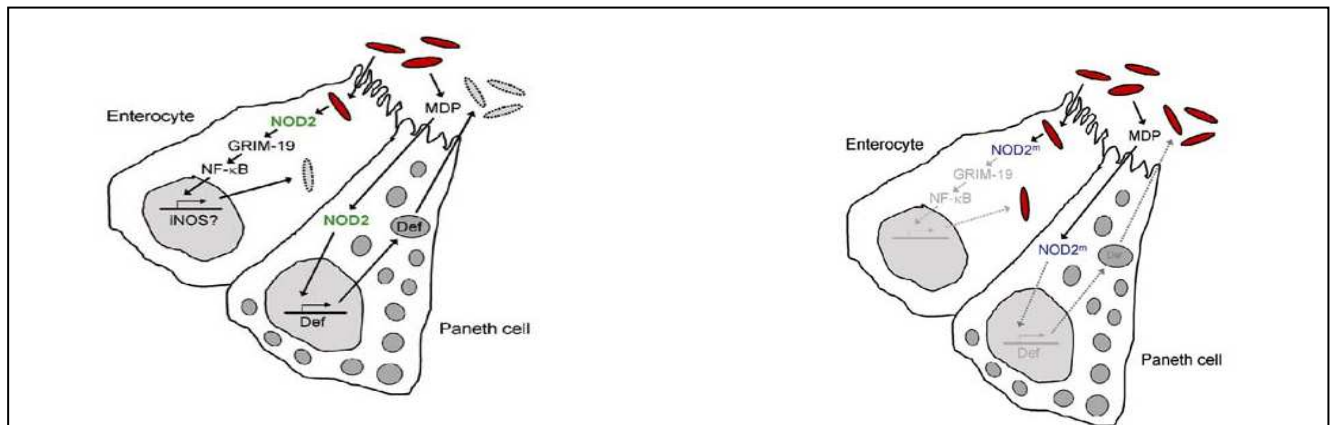


Abb.1.19. Schematische Darstellung eines Vergleichs zwischen nicht-mutiertem NOD2-Protein (grün/links) und mutiertem NOD2-Protein (blau/rechts) in Paneth-Zellen und Enterozyten im Mausmodell. Erklärung: Bei Anwesenheit von intaktem NOD2-Protein kommt es zu einer Aktivierung des Kernfaktors NF-κB und damit unter anderem zu einer Produktion von antimikrobiellen Substanzen, die zu einer Abwehr von Mikroorganismen (rot) führt. Bei genetisch veränderten NOD2-Protein erfolgt eine verringerte Aktivierung von NF-κB und eine defizitäre Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen was in einer erhöhten Mikrobendichte (mehr rot) resultiert.

Diese Beobachtungen sprechen für einen Funktionsverlust im Falle von Morbus Crohn assoziierten NOD2-Mutationen und unterstützen die sog. „loss of function“ Theorie zur pathogenetischen Rolle von NOD2-Mutationen.

Eine zweite pathogenetische Theorie ist die sog. „gain of function“ Theorie, welche auf Beobachtungen bzgl. des proinflammatorischen Zytokin IL-1beta beruht. Im Mausmodell wurde gefunden, dass es in Makrophagen mit mutiertem NOD2-Protein im Vergleich zu solchen mit normalem NOD2-Protein bei Stimulation mit MDP zu höheren Konzentrationen von Interleukin-1beta kommt (Maeda, 2005). Diese Mäuse zeigten weiterhin eine stärkere Entzündungsreaktion im Kolon unter experimentellen Bedingungen, und diese Entzündung sprach sehr gut auf eine Therapie mit Hemmer des Interleukin-1 Signalweges an (Maeda, 2005). Diese Daten lassen vermuten, dass es aufgrund von Veränderungen im NOD2-Protein zu einer verstärkten Interleukin-1beta Antwort bei MDP-Stimulation kommt. Es wurde hierbei angenommen, dass NOD2 via NF-κB die Synthese von unfertigem Interleukin-1beta (Pro-IL1beta) induzieren kann, jedoch nicht ohne Hilfe des Interleukin konvertierenden Enzyms (ICE) in funktionsfähiges Interleukin-1beta überführen kann. Mutiertes NOD2 würde diese Fähigkeit besitzen und in der Lage sein ICE zu aktivieren, entsprechend dem NOD1-Protein (Yoo, 2002). Somit käme es zu erhöhten IL-1beta Spiegeln beim Vorhandensein von NOD2-Mutationen (Eckmann, 2005). Aufgrund der auto- und parakriner Sekretionsweise des Zytokins könnte es zu einer Selbststimulation kommen, die zur Unterhaltung der Produktion und Sekretion führen könnte (Eckmann, 2005). Entsprechend dieser Hypothese ist bei Mäusen mit fehlendem ICE

eine verminderte Entzündungsreaktion der Mukosa gefunden worden, die unter experimentellen Bedingungen ausgelöst wurde (Siegmond, 2001) und Therapieansätze mit Inhibitoren des IL-1-Rezeptors führten zu einer Besserung der entzündlichen Symptomatik (Maeda, 2005). Die schematische Darstellung dieser pathogenetischen Theorie ist in der Abbildung 1.20 aufgeführt.

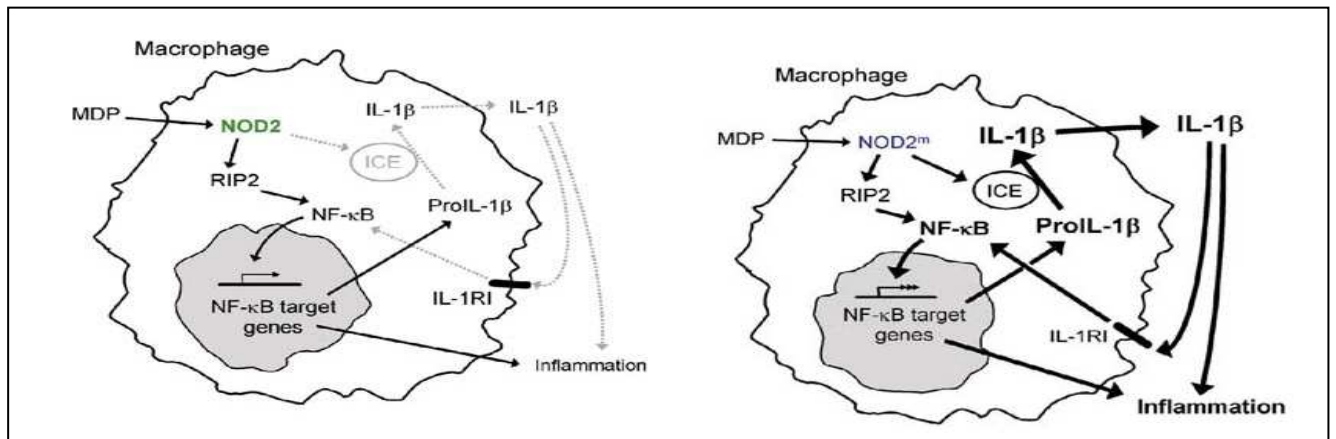


Abb.1.20: Vergleich der IL-1 β Sekretion in NOD2 nicht-mutierten (grün/links) und mutierten (blau/rechts) Zellen im Mausmodell. Erklärung: Bei nicht verändertem NOD2-Protein kommt es zu keiner Aktivierung der ICE und somit zu keiner Fertigstellung von IL-1 β . Mutiertes NOD2 erwirbt diese Fähigkeit mit der Folge, dass IL-1 β produziert und sezerniert wird, was die erneute und anhaltende Stimulation dieses Weges bedingt und zum Auftreten einer Entzündung führen kann.

In Untersuchungen an Monozyten aus peripherem Blut ist hingegen bei Individuen mit homozygoter Anlage der Leu1007fs Mutation eine herabgesetzte Aktivität von NF- κ B und eine verringerte Expression an IL-1beta nach Stimulation mit MDP gefunden worden (Li, 2004). Diese Diskrepanz zu den Ergebnissen im Mausmodell kann auf verschiedene Faktoren beruhen: die Zellpräparation, die Stabilität des NOD2-Proteins, der Unterschied zwischen menschlichem Modell und tierischem Mausmodell, wie auch die Tatsache, dass stimulierte Monozyten weniger reagibel sind im Sinne einer negativen Rückkopplung nach einstiger Aktivierung (Bonen, 2003; Eckmann, 2005).

Ein weiteres pathogenetisches Modell beruht auf der Sekretion des Interleukins-12 (IL-12). Im Mausmodell ist beschrieben worden, dass NOD2 nach Kontakt mit MDP die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2) hemmt, nachdem dieser durch bakteriellen Peptidoglykan (PGN) stimuliert wurde. Die Aktivierung von TLR2 würde nach Kontakt mit PGN eine erhöhte Produktion von IL-12 und dessen Untereinheiten IL-12p40 und IL-12p70 bewirken, welche durch aktiviertes NOD2 gehemmt wäre, siehe Abbildung 1.21 (Eckmann, 2005). In einer Untersuchung mit Makrophagen von Mäusen mit mutiertem oder ausgeschaltetem NOD2-Protein ist keine Hemmung des TLR2

Signalweges verzeichnet worden, und somit erhöhte Konzentrationen an IL-12p40 und IL-12p70 gemessen worden (Watanabe, 2004). Ähnliche Ergebnisse sind bei in vivo Untersuchungen an NOD2 defizienten Mäusen beschrieben worden, in denen Peptidoglykan systemisch verabreicht wurde (Watanabe, 2004).

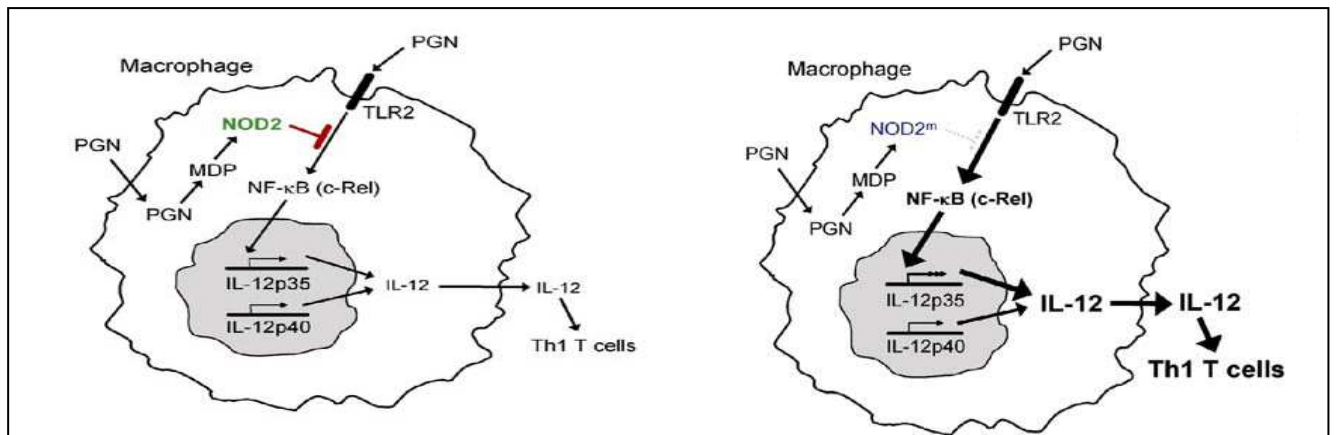


Abb.1.21: Vergleich von nicht-mutiertem (grün/links) und mutiertem (blau/recht) NOD2-Protein in Zusammenhang mit der IL-12 Produktion. Erklärung: Bei nicht veränderten NOD2-Protein kommt es zu einer Hemmung des TLR2 Signalweges und damit zu einer niedrigen IL-12 Konzentration nach Kontakt mit PGN. Bei verändertem NOD2 entfällt diese Hemmung und es kommt zu einer Aktivierung von NF-κB und damit zu erhöhten Konzentrationen an IL-12, das die Immunantwort in Richtung Th-1 lenkt und weitere pro-inflammatorische Zytokine induziert.

Eine andere Studie im selben Gebiet konnte diese Funde nicht bestätigen (Kobayashi, 2005), so dass diese Theorie ebenfalls wie die anderen zwei, umstritten ist. Somit bedarf es derzeit weiteren Untersuchungen zur Klärung der pathogenetischen Rolle von NOD2-Mutationen beim M. Crohn.

1.4 Zu den untersuchten Zytokinen und ihrer Rolle beim Morbus Crohn

Interleukin 1beta

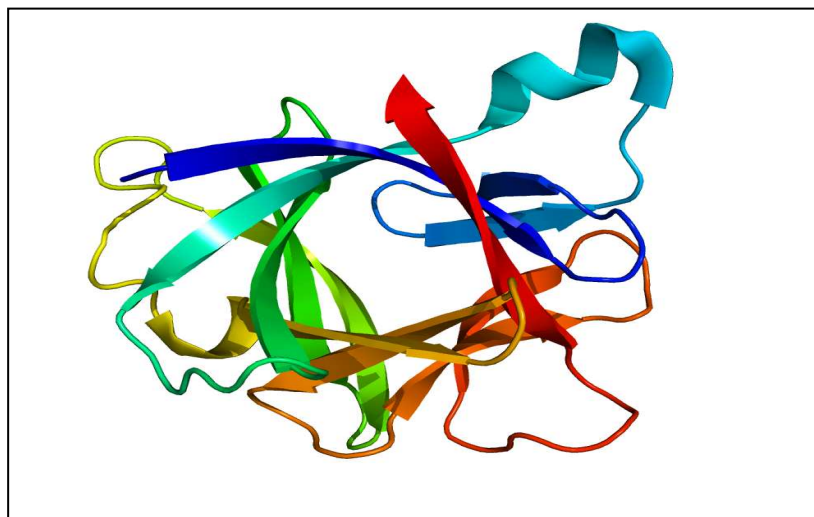


Abb.1.22: Dreidimensionale Struktur von Interleukin 1beta (nach, Yoon 2000)

Das Interleukin-1beta ist ein monomeres Protein, bestehend aus 153 Aminosäuren und einer Größe von 17kDa. Es ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und somit ein wichtiger Mediator der akuten Phase und der zellulären Immunantwort (Giovine, 1990). Es wird hauptsächlich von Monozyten exprimiert, aber auch endotheliale, lymphatische, gliale und epidermale Zellen sind hierzu in der Lage. Sezerniert führt es zu einer Aktivierung von B- und T-Lymphozyten, zu einer Proliferation von Fibroblasten, Induktion von Fieber und zu einer vermehrten Synthese von Akut-Phase-Proteinen der Leber (Dinarello, 1984; Fenton, 1987). Die Aktivierung der Gene, die dafür kodieren, erfolgt durch NF- κ B (Nuclear Factor kappa B). Nach der Translation entsteht eine inaktive Vorstufe dieses Proteins, das als Pro-Interleukin-1 β bezeichnet wird. Diese inaktive Vorstufe wird durch das Interleukin-1 β -converting Enzym (ICE) in das aktive Interleukin umgewandelt. Die Sekretion kann sowohl autokrin, als auch parakrin erfolgen. An Effektorzellen bindet es an den Rezeptoren CD121a (IL-1RI) oder CD121b (IL-1RII). Dadurch kann über mehrere Mediatoren Fieber entstehen oder es werden Makrophagen oder T-Lymphozyten aktiviert. Letzten Endes kommt es zu einer Entzündung, durch Aktivierung eines breiten Spektrums an pro-inflammatorischen Genen. Der IL-1beta-“Knockout“ ist durch eine gestörte Antwort der akuten Phase charakterisiert.

Interleukin 10

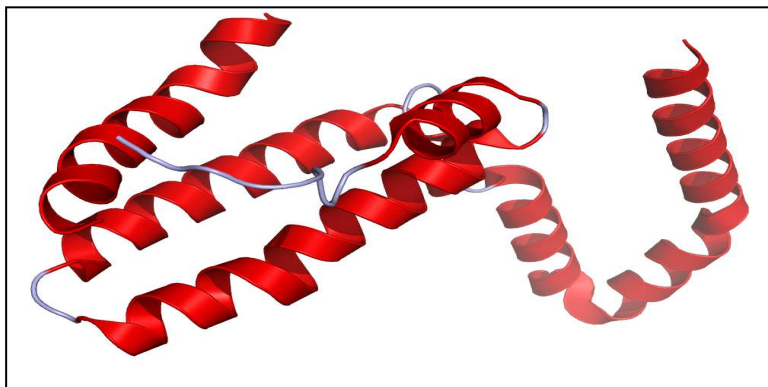


Abb.1.23:
Dreidimensionale Struktur
von Interleukin-10 (nach
Yoon, 2000)

Das Interleukin 10 wurde 1989 zum ersten Mal als Zytokin-Synthese-Inhibitor, der von Th-2-Helfer-Zellen produziert wird, beschrieben (Fiorentino, 1989). Mittlerweile hat man verstanden, dass IL-10 ein zentraler Regulator der mukosalen Immunantwort und eines der wichtigsten anti-inflammatorischen Zytokine überhaupt ist (Rennick, 2000). IL-10 ist ein 18,5kDA großes Zytokin und wird von Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und

verschiedenen Tumorzelllinien gebildet. Humanes IL-10 bindet nach seiner Sekretion an ein tetrameres Rezeptorprotein, welches aus 4 Untereinheiten besteht: 2 α und 2 β (Donnelly, 1999). Die 2 α Untereinheiten dienen zur Bindung, die 2 β Untereinheiten zur Signaltransduktion. Die β Untereinheit, oder CRF2-4, wirkt über die Signalkaskade der Janusrezeptoren (JAK1-STAT3) und aktiviert das SOCS-3 Gen. Dieses Gen (supressor of cytokine signalling-3) inhibiert seinerseits den JAK/STAT-Signalweg und die Expression vieler Wachstumsgene (Riley, 1999). Eines dieser Gene kodiert für den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welches auch für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Die Hauptfunktion des IL-10 liegt in der Beendigung eines inflammatorischen Prozesses durch Hemmung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Weiterhin spielt IL-10 in der Regulation der Proliferation und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Antigen-präsentierenden Zellen, Mastzellen und Granulozyten eine wichtige Rolle (Asadullah, 2003). Zu den gehemmten Zytokinen gehören IL-1beta, TNF-alpha, IL-6, die Th-2-Helferzellzytokine IL-4 und -5 (Staples, 2000), pro-inflammatorische Proteine wie MIP-1 α , RANTES, IL-8 und Eotaxin (Chung, 1999), pro-inflammatorische Enzyme wie iNOS und COX-2 (Li, 2003). Neben der hemmenden Wirkung besitzt IL-10 eine stimulierende Wirkung auf die Expression an den anti-inflammatorischen Proteinen wie IL-1 Rezeptorantagonist, dem löslichen TNF-alpha Rezeptor und dem TIOMM (tissue inhibitor of matrix metalloprotease) (Li, 2003). Eine der wichtigsten Wirkungen von IL-10 ist die Hemmung von IL-2 und Interferon- γ , welche Stimulatoren der Th-1 gerichteten Immunantwort sind. Damit bewirkt IL-10 einen shift der Immunantwort von Th-1-Zellen zu Th-2-Zellen (Fiorentino, 1989). Bei einem Fehlen würde es folglich zu einem Überwiegen der Th-1-Immunantwort kommen, so wie es beim Morbus Crohn der Fall ist (Bouma, 2003; Sato, 2005; Cobrim, 2005; Ogura, 2005; Monteleone, 2005; Madsen, 2002). Die Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10 erfolgt kompensatorisch (Li, 2003) und wird durch einen inflammatorischen Prozess selbst oder durch pro-inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF-alpha) hervorgerufen. Dadurch wird sichergestellt, dass eine Entzündung sich selbst limitiert und nicht andauert und, dass durch den Entzündungsprozess an sich, dem Organismus nicht mehr Schaden zugefügt wird, als durch die auslösende Noxe. Dieses negative Feedback des IL-10 im Entzündungsregelkreis (Poll, 1994) konnte im Tiermodell mehrfach bestätigt werden (Kuhn, 1993; Berg, 1995; Rennick, 2000).

Interleukin 12

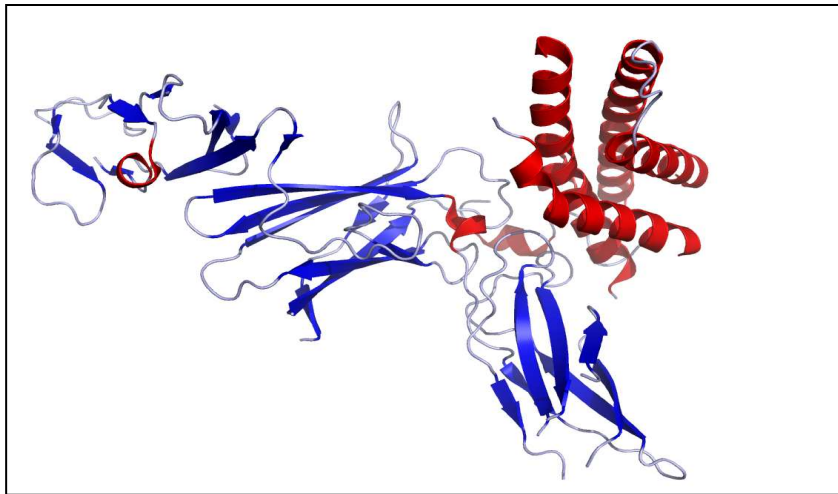


Abb.1.24:
Dreidimensionale
Struktur von Interleukin
12 (nach Yoon, 2006)

Das Interleukin 12 ist ein heterodimeres, pro-inflammatorisches Zytokin, bestehend aus einer 35-kDa (p35) und aus einer 40-kDa (p40) Untereinheit, die untereinander durch eine Disulfid-Brücke zum biologisch aktivem IL12p75 verbunden sind (Kobayashi, 1989). Beide Untereinheiten (p35 und p40) sind Produkte von verschiedenen Genen, die unabhängig voneinander lokalisiert sind und unterschiedlich kontrolliert werden (Sieburth, 1992). Während p35 ubiquitär exprimiert und post-transkriptionell reguliert wird (Aste-Amezaga, 2000; Ma, 1996), ist p40 auf Phagozyten und dendritische Zellen beschränkt und erliegt lediglich einer transkriptionellen Regulierung (Trinchieri, 2003). Im Vergleich zum biologisch aktiven IL-12 und p35 wird p40 10-1000-mal mehr sezerniert (Trinchieri, 1998).

IL-12 wird von Phagozyten und dendritischen Zellen als Antwort auf einen immunologischen Stimulus hin sezerniert (D'Andrea, 1992; Macatonia, 1995). Nach seiner Sekretion bindet es an seinen Rezeptor, der seinerseits ebenfalls aus 2 Einheiten besteht: IL-12R β 1 und IL-12 β 2 (Presky, 1996). Der Rezeptor wird von aktivierten T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert (Presky, 1996; Grohmann, 1998; Airoidi, 2000). Nach seiner Bindung an den Rezeptor kommt es zur Autophosphorylierung des dimeren Rezeptors und nachfolgend zur Phosphorylierung von Tyrosin- und Januskinasen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT4 (signal transducer and activator of transkription 4), der die Transkription bestimmter Gene initiiert (Bacon, 1995; Simpson, 1998). Als Folge davon kommt es zur Expression und Sekretion von Interferon- γ und zur Differenzierung von indifferenten T-Lymphozyten zu Th-1-Lymphozyten (Hsieh, 1993; Manetti, 1993). Interferon- γ aktiviert seinerseits ein ganzes Arsenal an pro-inflammatorischen Zytokinen und vergrößert die Effekte von IL-12. (Trichnieri, 2003) Dies befähigt den Organismus zu einer Organ-spezifischen Immunität und zu einer adäquaten Abwehr

gegenüber pathogenen Bakterien und intrazellulären Parasiten (Trichnieri, 1998). Aufgrund der Funktion eine ungerichtete, allgemeine Immunantwort in eine spezielle, durch Th-1-Lymphozyten vermittelte Immunantwort umzuwandeln, steht IL-12 als Bindeglied zwischen der angeborenen und der Th-1 vermittelten, adaptativen Immunantwort.

2. Zielsetzung der Arbeit

Morbus Crohn ist ein Krankheitsbild multifaktorieller Ätiologie. Zur Pathogenese tragen sowohl Umweltfaktoren wie auch genetische Faktoren bei. Eine herausragende Rolle nimmt dabei der Rezeptor NOD2 ein. Mutationen dieses Rezeptors sind eindeutig mit dem Auftreten von Morbus Crohn assoziiert und führen zu einer gestörten Erkennung von bakteriellen Peptidoglykanen bzw. deren Untereinheit Muramyl-Dipeptid (MDP).

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Expressionsmusters ausgesuchter Zytokine in Monozyten von Individuen mit verschiedenen NOD2-Genotypen, nach Kontakt mit bakteriellem MDP. Hierfür wurden Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn sowie von Kontrollpersonen isoliert und mit bakteriellen Bestandteilen (MDP und LPS) stimuliert. Die mRNA-Expression für IL-1beta, IL-10 und IL-12p40 wurde nach Stimulation mit MDP in Individuen mit verschiedenen NOD2 Genotypen verglichen.

Hierbei sollte untersucht werden:

1. In welchem Ausmaß die Morbus Crohn assoziierten NOD2-Mutationen zu einer erhöhten oder erniedrigten Expression von IL-1beta führen, da hierfür in der bisherigen Literatur unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht worden sind.
2. Inwieweit die NOD2-Mutationen die Expression von IL-12p40 beeinflussen.
3. Die Wirkung der Mutationen auf die Expression von IL-10, einem Zytokin mit ausgeprägter antiinflammatorischer Wirkung, unabhängig von der Expression anderer Zytokine.
4. Der Einfluss der 3 Hauptmutationen (Leu1007fs, R702W, G908R) auf die Rezeptorfunktion des NOD2-Proteins.

Die gewonnenen Informationen sollten zu einem besseren Verständnis der Pathogenese und der Krankheitsentstehung des Morbus Crohn führen, auf dem Weg von Mutationen im NOD2-Gen zur klinischen Entität.

3. Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

a) Demografische Daten

Alle Patienten wurden über Inhalt und Ziele der Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis für die Teilnahme an der Studie. Als Material wurde venös entnommenes Vollblut verwendet.

Für diese Studie wurde eine Population von insgesamt 22 Personen zusammengestellt. Dabei handelte es sich um 18 Patienten mit Morbus Crohn und um 4 gesunde Kontrollpersonen. Die epidemiologischen Daten sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Demografische Daten	Morbus Crohn-Gruppe	Kontroll-Gruppe
Alter des jüngsten Teilnehmers	20 Jahre	24 Jahre
Alter des ältesten Teilnehmers	77 Jahre	40 Jahre
Durchschnittsalter	40,9 Jahre	39,1 Jahre
Anzahl der Frauen	n=10	n=2
Anzahl der Männer	n=8	n=2
TOTAL n=22	n=18	n=4

Tab.2.1:
Demografische
Daten der
Studienpopulation

Die Patienten mit Morbus Crohn wurden aus einer zuvor bezüglich NOD2-Mutationen typisierten Population ausgewählt (Török, 2004). Bei den Kontrollpersonen handelte es sich um Mitarbeiter der Medizinischen Klinik bzw. Medizinischen Poliklinik bei denen klinisch eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung ausgeschlossen wurde, und keine weiteren bedeutenden Pathologien vorlagen.

b) Klinische Daten

Bei den Patienten mit Morbus Crohn galt als Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie eine anhand von klinischer, endoskopischer, radiologischer und histopathologischer Kriterien gesicherte

Diagnose eines Morbus Crohn (Stange, 2006). Die klinische Klassifikation der Erkrankung nach der Vienna-Klassifikation ist in der Tabelle 2.2 angegeben.

Kriterien	Code	Erklärung	Anzahl
Alter bei Diagnosestellung	A1	< 40Jahre	n=17
	A2	> 40Jahre	n=1
			n=18
Befallsmuster	L1	Terminales Ileum	n=10
	L2	Kolon	n=2
	L3	Ileum und Kolon	n=2
	L4	oberer GI-Trakt	n=4
			n=18
Verhalten	B1	nicht strikturierend/nicht penetrierend	n=5
	B2	strukturierend	n=5
	B3	penetrierend	n=8
			n=18

Tab.2.2: Klinische Daten der Morbus Crohn Population anhand der Vienna-Klassifikation

Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme in Remission und haben während der letzten 6 Monate vor Studienbeginn keine Therapie mit TNF-alpha-Antikörper oder eine hoch dosierte Glukokortikoidtherapie erhalten. Details der bestehenden Medikation zur Zeit der Blutentnahme sind in der Tabelle 2.3 angegeben.

Medikation	Anzahl der Patienten
Azathioprin	n=10
Kortikosteroide	n=1
Azathioprin+Kortikosteroide	n=2
Kortikosteroide+Aminosalicylate	n=3
Azathioprin+Kortikosteroide+Aminosalizylate	n=1
Zusätzlich Adjuvanten (Ionen/Vitamine)	n=10
Ausschließlich Adjuvantien	n=1

Tab.2.3: Medikation der Morbus Crohn Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme

c) NOD2 Genotyp der untersuchten Individuen

Der NOD2 Genotyp der untersuchten Individuen ist in der Tabelle 2.4 angegeben.

NOD2 Genotyp	Morbus Crohn Patienten	Kontrollindividuen
Wildtyp	wt/wt (n=3)	wt/wt (n=2)
einfach heterozygot	R702W/wt (n=3) Leu1007fs/wt (n=3)	Leu1007fs/wt (n=1)
compound-heterozygot	R702W/Leu1007fs (n=2) R702W/G908R (n=1)	R702W/Leu1007fs (n=1)
mutiert homozygot	R702W/R702W (n=1) Leu1007fs/Leu1007fs (n=5)	n=0
TOTAL n=22	n=18	n=4

Tab.2.4: NOD2 Genotyp der untersuchten Individuen

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Vorgehensweise

Das hier verwendete Material/Zellysat wurde im Rahmen einer anderen Arbeit (Doktorarbeit von Anja Schaaf) gewonnen. Hierfür wurden Monozyten isoliert und entweder mit MDP (muramyl dipeptid), oder mit LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Zellen lysiert und aus dem Zellysat tRNA extrahiert und mit Hilfe der reversen Transkription und der quantitativen PCR (polymarease chain reaction) quantitativ bestimmt. Daraus konnte auf die jeweilige Menge an Protein-spezifischer RNA geschlossen werden, die wiederum eine Aussage über die Expression der codierenden Gene zuließ.

3.2.2 Isolation und Stimulation der Monozyten

Den Studienteilnehmern wurde zu Beginn der Studie venöses Vollblut aus einem peripheren Zugang abgenommen. Die Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) erfolgte mittels Picall-Gradientzentrifugation. Hiervon wurden weiterhin Monozyten magnetisch mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (MACS, Monozyteisolation Kit II human) weiter aufgereinigt. Die Monozyten wurden im Anschluss daran mit 100 ng/ml Lipopolysaccharid von E.coli 055:B5 oder mit 100 ng/ml

Muramyldipeptid oder mit dem Medium allein 6 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden in 300µl RLT Buffer (Quiagen) und β-Mercaptoethanol lysiert. Suspension wurde dann bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3 Die RNA-Isolation

Die Monozyten wurden als ganze Zellen lysiert. Dadurch befand sich in der Suspension ein Gemisch aus allen Zellbestandteilen. Um daraus die RNA zu isolieren, wurde die gesamte Suspension durch eine Membran gefiltert, welche aus Silika-Gel besteht und die Eigenschaft besitzt, RNA selektiv zu binden. Ermöglicht wird die Bindung an die Membran durch Zugabe von Ethanol. Die anderen Bestandteile werden dadurch eliminiert, indem die Membran mit selektiven Lösungsmitteln gespült wird, die nicht-RNA Bestandteile herauswaschen.

Die Monozyten jedes Individuums wurden in den vorausgehenden Schritten folgendermaßen behandelt: unstimuliert (behandelt nur mit Kulturmedium), MDP-stimuliert und LPS-stimuliert. Davon gab es jeweils 3 Ausführungen (A-, B-, und C-Probe). Summarisch machte das 9 Proben pro Patient. Wie oben erwähnt wurden die Monozyten nach Behandlung lysiert und in einem Gemisch aus β-Mercaptoethanol und RLT Buffer bei -80°C aufbewahrt. Für die RNA-Extraktion wurden die Zelllysate in einem Brutschrank bei 37°C aufgetaut. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit Hilfe des RNA-Extraktionskit der Firma Quiagen: Quiagen RNeasy Mini Kit.

Zu der 350µl Suspension aus lysierten Monozyten, RLT Buffer und β-Mercaptoethanol wurden weitere 350µl 70%-igen Ethanol zugegeben und ohne Zentrifugation vermischt. Diese 700µl wurden auf die im Kit enthaltene Spezialsäule pipettiert und bei 13000U/min 15s lang zentrifugiert. Die Suspension wurde dabei durch die Silika-Membran gedrückt, wobei RNA und weitere Bestandteile hängenblieben. Die Flüssigkeit, die nicht hängenblieb und durch die Membran floss wurde verworfen. Aufgrund der Kanzerogenität des β-Mercaptoethanols wurde dieser Schritt unter einem Abzug ausgeführt und der Verwurf wurde gesondert entsorgt. Im Anschluss daran wurden 500µl Buffer RPE auf die Membran pipettiert und 2 min bei 13000U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Um sicher zu gehen, dass sich keine Spuren von DNA in der Membran befanden, wurde ein zusätzlicher Schritt zum DNA-Verdau hinzugefügt. Dieser Schritt wurde ebenfalls mit einem Kit der Firma Quiagen durchgeführt: RNase-Free DNase Set. Der DNA Verdau wurde im weiteren Verlauf ohne Komplikationen eingebracht. Zuerst wurden 350µl Buffer RW1 auf die Membran pipettiert, bei 13000U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann wurde auf jede Probe 10µl DNase I stock solution, ebenfalls von der Firma Quiagen, und 70µl Buffer RDD gegeben und

15min zum Verdauen bei 25°C abgestellt. Danach wurde erneut ein Waschschriff mit 350µl Buffer RW1 und anschließender Zentrifugation bei 13000U/min vorgenommen. Nachdem die Säule in ein neues Untersatzgefäß verlegt wurde, ist diese mit 500µl Buffer RWE 2min lang bei 13000U/min gewaschen worden. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde die Säule bei 15000U/min 1min lang trocken zentrifugiert. Um die RNA nun aus der Membran zu lösen, wurden 60µl RNA-Storage-Solution der Firma Ambion hinzugegeben und 2min lang bei 10000U/min zentrifugiert. Dabei wurde die RNA aus der Membran herausgewaschen und in das neue Gefäß hineingspült. Die Säule wurde verworfen und die RNA in 60µl Lösung beibehalten.

Die Konzentration und die Qualität der isolierten RNA wurden mit dem Photometer gemessen. Die Konzentration lag im Durchschnitt bei 3ng/µl ± 2ng/µl und bei der Reinheit (Anteil an Proteinverunreinigungen) wurde der Quotient aus E280/E260 (Ratio < 2,0) beachtet. Die Proben wurden anschließend erneut bei -80°C aufbewahrt.

3.2.4 Die cDNA-Gewinnung

Das Prinzip der Gewinnung von cDNA beruht auf einer Umwandlung der polymerase chain reaction, die 1985 von Karry Mullis propagiert wurde. Bei dieser Methode wird allerdings als Vorlage keine DNA-Sequenz herangezogen, sondern eine RNA-Sequenz. Damit wird der umgekehrte Weg der Proteinsynthese eingeschlagen. Als Besonderheit im Vergleich zur DNA-Amplifikation aus RNA ist, dass hier eine Polymerase verwendet wird, die als Matritze RNA erkennt: RNA-abhängige DNA-Polymerase. Das Ergebnis ist cDNA, die normaler DNA gleicht, bis auf, dass sich darin keine Introns befinden, sondern verständlicherweise nur Exons vorhanden sind. Die weiteren Schritte der PCR wurden fast identisch übernommen, ebenso wie die Ingredienzien.

Mit der Gewinnung der cDNA konnte nicht sofort weiter gemacht werden, denn der Kit der Firma Fermentas: RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, hatte die RNA-Menge von 10ng in 11µl als Mindestanforderung, um eine gute und komplette cDNA-Herstellung zu garantieren. Diese wurde in manchen Proben aufgrund der niedrigen Konzentration unterschritten. Daher war in einigen Proben ein Eindampfschritt erforderlich. Für diesen Schritt wurden die Proben von -80°C in einem Brutschrank bei 37°C aufgetaut und im Anschluss daran in die Vakuumzentrifuge gestellt. Dabei wurde strengstens darauf geachtet, dass die Temperatur in der Zentrifuge nicht über 42°C steigt. Nach etwa 4-6h waren die 60µl auf etwa 2-9µl eingedampft. Die Proben wurden der Zentrifuge entnommen und auf 11µl aufgefüllt. Nun wurde aus jeder Probe verdampft/nicht-verdampft 11µl entnommen und

in einen PCR-Streifen, bestehend aus 8 Tubes hinein pipettiert. Nun konnte mit einem Ausgangsvolumen von 11µl weiter gearbeitet werden. Den 11µl wurde 1µl Random Hexamer Primer (0.2µg/µl) zugegeben und 5sec lang vermischt. Das Gemisch wurde nun bei 70°C 5min lang inkubiert und im Anschluss kurz zentrifugiert und auf Eis gekühlt. Es wurden folgende Mengen an Substanzen hinzugefügt und erneut vermischt: 4µl 5xReaktionsbuffer; 1µl RiboLockRibonuclease Inhibitor (20u/µl); 2µl 10mM dNTPmix. Das Gemisch wurde 5min lang bei 25°C inkubiert, im Anschluss zentrifugiert und zum Schluss auf Eis gekühlt. Diesen nun 19µl wurde 1µl RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) zugefügt zu einem finalen Volumen von 20µl. Das Gemisch wurde dann in einem Thermocycler wie folgt inkubiert: 10min bei 25°C, 60min bei 42°C und 10min bei 70°C. Im Anschluss wurden die 20µl, die nun cDNA enthielten, in ihren Tubes belassen und bei -20°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.5 Die quantitative PCR

Die quantitative polymerase chain reaction ist eine regelhafte PCR mit der besonderen Eigenschaft, dass während der Amplifikation, die Kopienzahlen direkt gemessen werden können. Diese Besonderheit wird mit der TaqMan®-Methode auf Basis der Fluoreszenz Resonanz Emissions Transfer (FRET) erzielt.

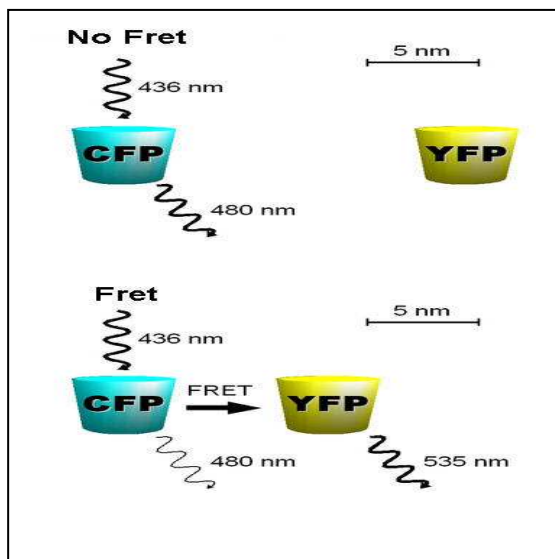


Abb.2.5: Kurze Darstellung des Fluoreszenz Resonanz Emissions Transfer (FRET) Prinzips: Bei relativer Nähe der Moleküle CFP und YFP (cyan fluorescence protein/yellow fluorescence Protein) wird Licht der Wellenlänge 535nm abgegeben; es erfolgt FRET. Bei relativer Entfernung der Moleküle wird Licht der Wellenlänge 480nm abgegeben; es erfolgt kein FRET.

FRET wurde um 1960 von Theodor Förster entdeckt und beschreibt dabei den Vorgang der Lichtquanten Aufnahme und Abgabe. Diese Aufnahme und Abgabe wird von Molekülen bewerkstelligt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und in einem gewissen Abstand zueinander Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Diese Wellenlänge ändert sich bei unterschiedlichen Abständen zwischen den Fluoreszenzmolekülen in charakteristischer Weise.

Erklärung siehe Abbildung 2.5. Solche Moleküle sind in unserer Untersuchung Oligonukleotide, die aus mehreren Basensequenzen bestehen und am 3' und am 5'- Ende jeweils Fluoreszenzmoleküle tragen. Dadurch befinden sich diese beiden Fluoreszenzmoleküle in relativer Nähe zueinander und es wird FRET ermöglicht. In unserer Untersuchung wurde dieses Oligonukleotid so gewählt, dass lediglich eines der beiden Fluoreszenzmoleküle mit der Matrizen-DNA hybridisieren kann. Dadurch wurde eine Möglichkeit geschaffen, dass das zweite Fluoreszenzmolekül abgespalten werden konnte. Diese Abspaltung wurde ermöglicht mit der 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase, welche bei der Hybridisierung, während der DNA-Amplifikation unpassende Stücke abspaltet. Dadurch, dass eines der beiden Fluoreszenzmoleküle nicht passt, wird es bei der Hybridisierung abgespalten und der Abstand zum einst benachbarten Fluoreszenzmolekül, das folglich seiner passenden Struktur an die Matrizen-DNA legiert wurde, vergrößert sich. Auf diese Weise verändert die DNA-Polymerase den Abstand zwischen den fluoreszierenden Molekülen und führt dazu, dass kein FRET stattfinden kann. Dieses Ereignis kann nach Beleuchtung mit einem Laserstrahl verfolgt werden, da bei relativer Nähe Licht der Wellenlänge 530nm und nach Abspaltung aus dem Oligonukleotid Licht der Wellenlänge 480nm emittiert wird. Somit kann die Aktivität der DNA-Polymerase optisch verfolgt werden, die man als Maß für die Herstellung neuer Kopien an DNA heranzieht. Folglich schließt man in direkter Proportion vom Lichtimpuls auf die Anzahl der synthetisierten Kopien in der Probe.

Die quantitative PCR konnte ohne Zwischenschritte begonnen werden. Dafür wurden die Proben aus dem -20°C Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. 13,5µl wurden von jeder Probe in eine MicroAmp Optical 96-Well Platte pipettiert und mit 16,5µl Master Mix vermischt. Diese 16,5µl Master Mix enthielten 15µl TaqMan Universal PCR Master Mix und 1,5µl Zytokin spezifischen Primer der Firma Applied Biosystems: TaqMan Gene Expression Assays. Die einzelnen Schritte der quantitativen PCR sind in Tabelle 2.6 angegeben.

Temperatur	Dauer	Zyklen	Geschehen
48°C	30 min	1x	RT-Step
95°C	10 min	1x	Aktivierung
95°C	15 sek	45x	Denaturierung
60°C	1 min	45x	Annealing/Extension

Tab.2.6: Einzelne Schritte der quantitativen PCR

Nach 2h Laufzeit wurden die Proben entnommen und verworfen. Das Ergebnis der quantitativen PCR wurde anschließend ausgewertet.

3.3 Kits und Chemikalien

3.3.1 Materialien für die RNA Isolierung

- Ethanol absolut	Merck
- Quiagen® RNeasy Mini Kit.	Quiagen
- RNase-Free DNase Set	Quiagen
- RNA-Storage-Solution	Ambion
- Einmal-Küvetten	Eppendorf

3.3.2 Materialien für die cDNA Gewinnung

- RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
- Aqua ad injectabilia	Braun
- Random hexamer primer (0.2µg/µl)	Fermentas
- 5x reaction buffer	Fermentas
- RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20u/µl)	Fermentas
- 10mM dNTP mix	Fermentas
- RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl)	Fermentas

3.3.3 Materialien für die quantitative PCR

- MicroAmp® Optical 96-Well plate	Applied Biosystems
- TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay (für jeweils IL1beta, IL10, IL12p40)	Applied Biosystems
- Aqua ad injectabilia	Braun

3.4 Geräte

Zentrifuge:	Centrifuge 5415C	Eppendorf
Brutschrank:	HBSNSRS 220	ThermoElectronCorp.
Photometer:	BioPhotometer	Eppendorf
Vakuumpzentrifuge:	Thermo SPD Speedvac	HPLC Instruments
PCR-Cycler:	DNA Engine DYAD	MJ Research
TaqMan Gerät:	ABI Sequence Detector System SDS 7700	Applied Biosystems

3.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS Vers.14 verwendet. Hiermit wurden nicht-parametrische statistische Tests angewendet, bzw. in unabhängigen Stichproben den U-Test nach Mann und Whitney und in abhängigen Stichproben den Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wurde mit $P \leq 0,05$ gewählt.

4. Ergebnisse

4.1 Kurze Einleitung

4.1.1 Patienten- und ausgewähltes Kontrollkollektiv

Bei der Auswahl der Patienten wurde darauf geachtet, dass alle Patienten eine gesicherte Diagnose haben, die eindeutig dem Krankheitsbild des Morbus Crohn zugeordnet werden konnte. Diese Diagnose sollte sowohl radiologisch, endoskopisch wie auch histopathologisch gesichert sein (Stange, 2006). Weiterhin wurde auf Strukturgleichheit innerhalb der Studienpopulationen geachtet.

Ziel der Studie war die Untersuchung des Einflusses bestimmter NOD2-Genotypen auf die monozytäre Zytokinproduktion nach Stimulation mit MDP. Als Vergleich wurde die Stimulation mit dem Medium, i.e. ohne Stimulans, und mit LPS (Lipopolysaccharid) herangezogen. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien und wird von einem transmembranösen Rezeptor namens TLR 4 (Toll like rezeptor 4) erkannt. Die nachfolgende Signalkaskade ist unabhängig von der des NOD2-Proteins, hat aber identische Konsequenzen, was die Zytokinproduktion anbetrifft, zur Folge (Janeway, 2002; Shi, 2006; Kobayashi, 2002; Strober, 2006).

Bei der Auswahl der NOD2-Genotypen wurden Patienten mit den 3 Hauptmutationen verwendet, welche am häufigsten beim Morbus Crohn vorkommen: R702W, G908R und Leu1007fs (Hugot, 2001; Ogura, 2001). Von diesen 3 Mutationen ist die 3020insC mit einem früheren Manifestationsalter, mit dem idealen Befallsmuster, einer erhöhten Anzahl an Ileocoekalresektionen, sowie einer verstärkten Frequenz an postoperativem Rückfall und Re-Operationen gekennzeichnet (Cuthbert, 2002; Vermeire, 2002; Buning, 2004; Buhner, 2008). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache haben wir bei der Auswertung der Ergebnisse unter anderem die Gruppen NOD2 Double-dose (Individuum mit 2 mutierten Allelen im NOD2-Gen = homozygote oder compound-heterozygote Individuen) mit mindestens einem 3020insC Allel (Double-dose mit 3020insC) und Individuen ohne diese Allel (Double-dose ohne 3020insC) gebildet.

Des Weiteren haben wir bei der Auswertung die Gruppe NOD2-Wildtyp-vorhanden gebildet. Darin eingeschlossen sind die an Morbus Crohn befallenen Wildtyp Individuen, die Wildtyp Individuen der Kontrollpopulation sowie die einfach heterozygoten Individuen, d.h. Individuen mit mindestens einem vorhandenen Wildtyp-Allel. Dies wurde auf der Basis gemacht, dass unsere Ergebnisse und bisherige Literaturdaten dafür sprechen, dass die Antwort auf MDP-Stimulation unabhängig von der Erkrankung ist und allein vom NOD2-Genotyp beeinflusst wird. Weiterhin ist in unserer Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp NOD2 und einfach heterozygote NOD2 Individuen

aufgefallen. Die Ergebnisse des direkten Vergleichs zwischen heterozygoten und Wildtyp Individuen für die jeweilige mRNA-Expression ist in Tabelle 4.1 angegeben.

Zytokin	Stimulation	p-Wert nach direktem Vergleich der Expressionswerte nach dem Mann-Whitney-U-Test	Einfach heterozygote Individuen	Wildtyp Individuen
Interleukin1beta	Unstimuliert	0,311	n=7	n=3
	MDP	0,548	n=7	n=3
	LPS	0,841	n=7	n=3
Interleukin10	Unstimuliert	0,841	n=7	n=3
	MDP	0,548	n=7	n=3
	LPS	0,151	n=7	n=3
Interleukin12	Unstimuliert	0,421	n=7	n=3
	MDP	0,151	n=7	n=3
	LPS	0,841	n=7	n=3
NOD2	Unstimuliert	0,841	n=7	n=3
	MDP	0,691	n=7	n=3
	LPS	0,548	n=7	n=3

Tab.4.1: Signifikanzen des Vergleichs zwischen Individuen mit Genotyp: NOD2-Wildtyp und NOD2-Heterozygot

Somit wurde im Weiteren immer der Vergleich der mRNA-Expression für das jeweilige Zytokin in der Gruppe der “Wildtyp-Allel“ Individuen mit der Gruppe der Double-dose Individuen dargestellt.

4.1.2 Interne Standards

Aufgrund der intra- und interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben, was auf den potentiell unterschiedlichen RNA Mengen beruht, ist es nicht zuverlässig die absoluten Kopienzahlen für eine bestimmte mRNA zu erfassen. Deshalb wurden alle Proben mit einer Größe verrechnet, die laut Literatur keinen Schwankungen, bedingt durch Stimulation oder großer Mengenzahl, unterworfen ist und die somit einen Vergleich zwischen den verschiedenen Proben zulässt. Diese Größe ist die mRNA-Expression eines sogenannten Housekeeping-Gens, welches in zahlreichen Studien ebenfalls als interner Standard verwendet wird: glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) (Edwards, 1985; Winer, 1999; Barber, 2005). Dadurch ist es zulässig, Vergleiche zwischen Proben in Hinblick auf die spezifische mRNA-Expression zu ziehen. Würde kein interner Standard

verwendet werden, der in jeder Zelle vorkommt und von externen Einflüssen unabhängig ist, würde dies zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen.

In dieser Arbeit wurde neben GAPDH ein weiterer Standard getestet: die ribosomale 18s RNA. Der Vergleich der beiden Standards hatte gezeigt, dass es im Falle von 18s zu großen Schwankungen zwischen den Proben untereinander kommt. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass 18s im Vergleich zu GAPDH in erheblich größeren Mengen vorkommt und dadurch bereits kleine Ungenauigkeiten beim Pipettieren die Ergebnisse erheblich verzerren. Aus diesen Gründen wurde 18s als interner Standard abgelehnt und GAPDH anstatt verwendet.

Ein weiterer Standard musste gefunden werden, damit die einzelnen Taqman-Läufe untereinander verglichen werden durften. Die Bedingungen, die vor und während eines Taqman-Laufes herrschten, waren gleich. Jedoch wurde zur besseren Vergleichbarkeit eine Standardreihe hergestellt, die in jeder Probe mitlief und immer gleich war. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe aus monozytärer tRNA, die bis zu einer Verdünnung von 1:3.000.000 hergestellt wurde. Durch diesen Standard konnten die jeweiligen Läufe im Taqman untereinander verglichen werden.

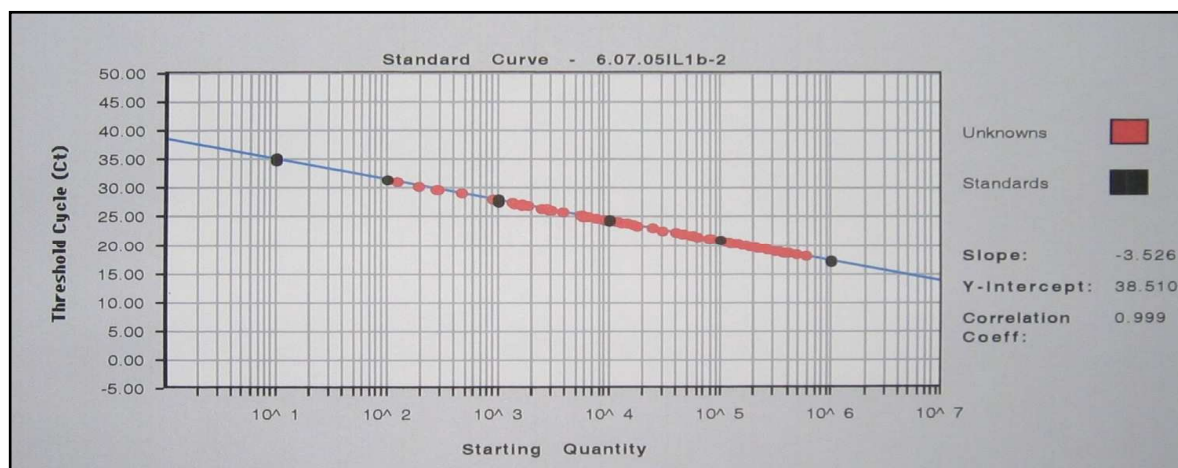


Abb.4.2: Standardkurve im TaqMan-Lauf am Beispiel von Interleukin 1beta

4.2 Basale und MDP/LPS-induzierte Expression von Interleukin 1beta in Abhängigkeit vom *NOD2*-Genotyp

Für die Untersuchung der Expression von IL-1beta (Interleukin 1beta) wurden die Gruppen Wildtyp-Allel-vorhanden und Double-dose sowie die Gruppen Double-dose mit und ohne mindestens einem 3020insC Allel gebildet. Die Einteilung in die Gruppen erfolgte wie oben beschrieben. Die grafische Auswertung der Wildtyp-Allele zeigt Abbildung 4.3.

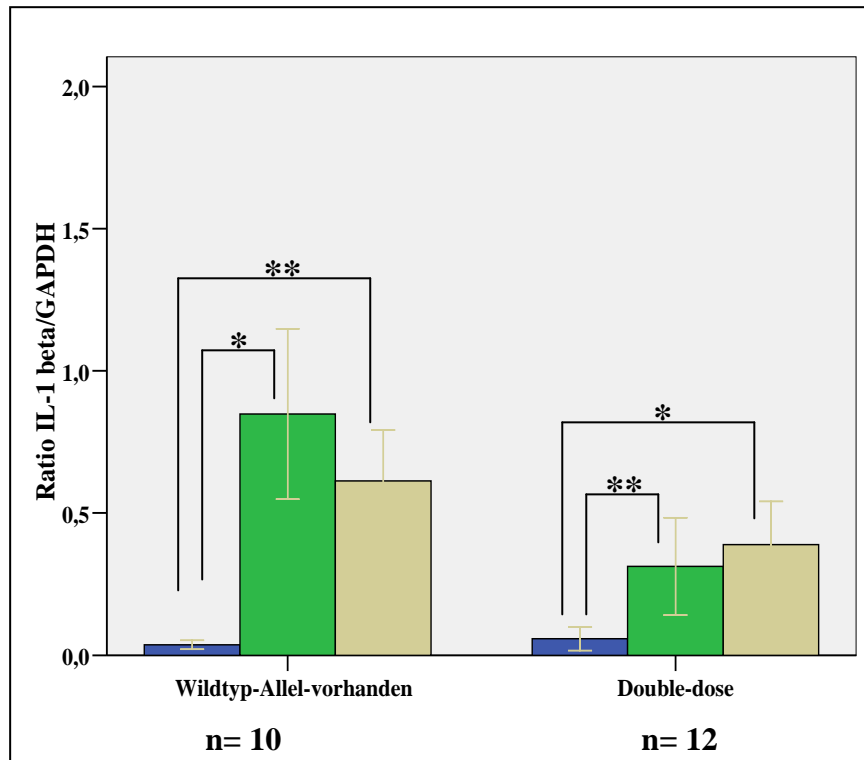


Abb.4.3: **IL-1beta mRNA Expression** in den Gruppen NOD2 Wildtyp-Allel-vorhanden und NOD2 Double-dose in Abhängigkeit der Stimulation, relativiert zu GAPDH
 Blau: Medium/unstimuliert
 Grün: 100ng/μl MDP
 Gelb: 100ng/μl LPS
 *: $p \leq 0,05$
 **: $p \leq 0,01$

In der Gruppe mit noch mindestens einem vorhandenen Wildtyp-Allel ist ein signifikanter Anstieg der Expression von IL-1beta mRNA bei Stimulation mit MDP zu beobachten ($P= 0,017$). Bei Stimulation mit LPS ist ebenfalls ein signifikanter Anstieg zu beobachten ($P= 0,009$). In der Gruppe Double-dose (2 mutierte NOD2-Allele) ist ein ähnliches Muster beobachtet worden: Bei dem Vergleich zwischen den beiden gebildeten Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der basalen bzw. MDP- und LPS-induzierten Expression von IL-1beta mRNA beobachtet werden. Der Anstieg der IL-1beta mRNA Expression nach MDP Stimulation ist ebenso signifikant ($P= 0,010$) wie bei Stimulation mit LPS ($P= 0,036$).

Weiterhin wurde die IL-1beta mRNA Expression in den Gruppen der Individuen mit mindestens einem vorhandenen 3020insC Allel im Vergleich zu der Expression in der Gruppe der Double-dose Individuen ohne die 3020insC Mutation verglichen. Siehe Abbildung 4.4.

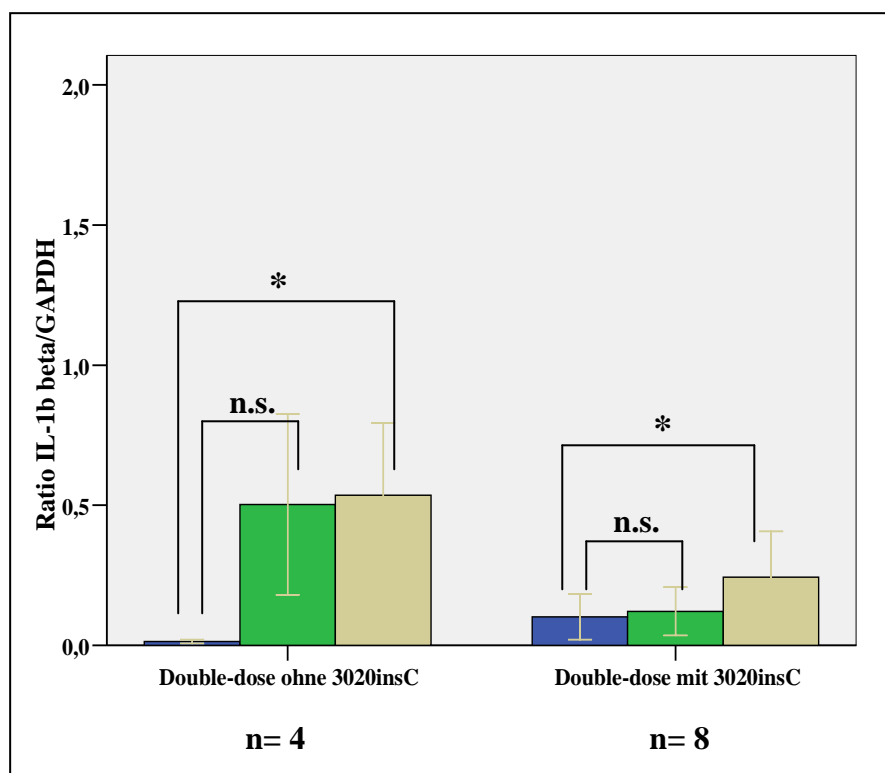


Abb.4.4: **IL-1beta mRNA Expression** in der Gruppe der Double-dose Individuen mit und ohne der 3020insC Mutation nach Stimulation mit MDP bzw. LPS
 Blau: Medium/unstimuliert
 Grün: 100ng /MDP
 Gelb: 100ng /LPS
 *: $p \leq 0,05$
 n.s.: nicht signifikant

In der Gruppe der Double-dose Individuen ohne das 3020insC-Allel ist ein Anstieg der Expression von IL-1beta mRNA Expression sowohl nach Stimulation mit LPS als auch mit MDP zu verzeichnen. Dieser Anstieg ist jedoch nicht mehr signifikant bei der Stimulation mit MDP ($P= 0,143$), was möglicherweise aufgrund der niedrigen Zahl an untersuchten Individuen beruht. In der Gruppe der Double-dose Individuen mit mindestens einem 3020insC Allel ist nach Stimulation mit MDP kaum noch eine Antwort zu verzeichnen ($P= 0,903$) im Vergleich zu nicht stimulierten Monozyten. Bei Stimulation mit LPS hingegen ist es in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der IL-1beta mRNA Expression gekommen ($P= 0,036$ sowie $P= 0,043$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mRNA Expression von IL-1beta bei Stimulation mit LPS in allen untersuchten Gruppen signifikant angestiegen ist. Bei Stimulation mit MDP kommt es sowohl in der Gruppe der Individuen mit mindestens einem vorhandenen Wildtyp NOD2 Allel, als auch in der Gruppe der Individuen mit 2 mutierten NOD2 Allelen zu einem signifikanten Anstieg der IL-1beta mRNA Expression, obwohl dieser Anstieg in der Gruppe der Double-dose Individuen viel schwächer ist. Nach Aufteilung in Abhängigkeit von Vorhandensein der 3020inC Mutation bei Double-dose Individuen zeigte sich, dass während in Monozyten von Double-dose Individuen ohne die 3020inC Mutation noch eine Antwort auf MDP zu sehen ist, diese in Monozyten von Double-dose Individuen mit mindestens einer 3020inC Mutation völlig gestört ist.

4.3 Basale und MDP/LPS-induzierte mRNA Expression von Interleukin 10 in Abhängigkeit vom *NOD2*-Genotyp

Bei der Betrachtung der mRNA Expression für IL-10 (Interleukin 10) sind erneut die Gruppen Wildtyp-Allel-vorhanden und Double-dose, sowie die beiden Gruppen 3020inC-Allel vorhanden und nicht vorhanden gebildet worden. In der Gruppe der Wildtyp-Allel-vorhanden sind die *NOD2* Wildtypen Individuen mit und ohne Morbus Crohn und die Gruppe der *NOD2* einfach heterozygoten Individuen zusammengefasst. In der Gruppe der Double-dose sind jene Individuen eingeschlossen, die 2 mutierte *NOD2*-Allele aufweisen. Darin sind die Genotypen homozygot und compound-heterozygot für die Varianten R702W, G908R und 3020insC enthalten. Die mRNA-Expression für IL-10 ist in Abbildung. 4.5 aufgezeigt.

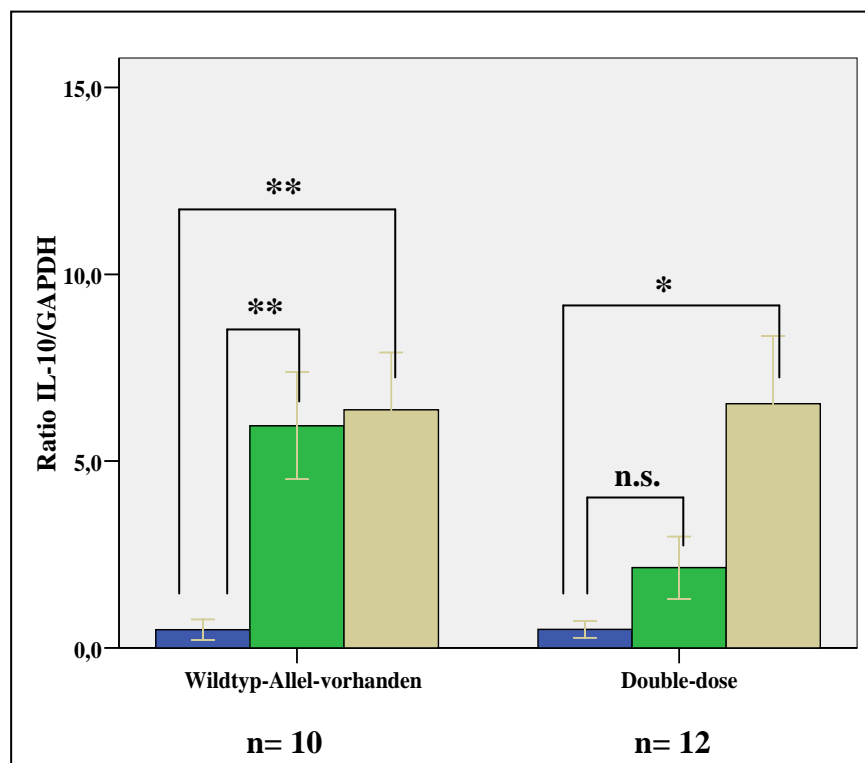


Abb.4.5: **IL-10 mRNA Expression** in den Gruppen *NOD2* Wildtyp-Allel-vorhanden und *NOD2* Double-dose nach Stimulation mit MDP und LPS
Blau: Medium/unstimuliert
Grün: 100ng / MDP
Gelb: 100ng / LPS
*: $p \leq 0,05$
***: $p \leq 0,01$
n.s.: nicht signifikant

In der Gruppe der Monozyten vom *NOD2* Wildtyp Individuen erfolgt ein signifikanter Anstieg der IL-10 mRNA Expression bei Stimulation mit MDP im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten ($P=0,005$). Bei Stimulation mit LPS in derselben Gruppe kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 mRNA Expression ($P=0,005$). In der Gruppe der Double-dose Individuen kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 mRNA Expression bei Stimulation mit LPS ($P=0,012$). Hingegen ist bei MDP Stimulation der Anstieg deutlich niedriger und es besteht kein signifikanter Unterschied mehr im Vergleich mit den unstimulierten Monozyten ($P= 0,347$).

Des Weiteren wurden die Gruppen der Double-dose NOD2 Monozyten untersucht im Hinblick auf das Vorhandensein eines 3020insC Allels. Siehe Abbildung 4.6.

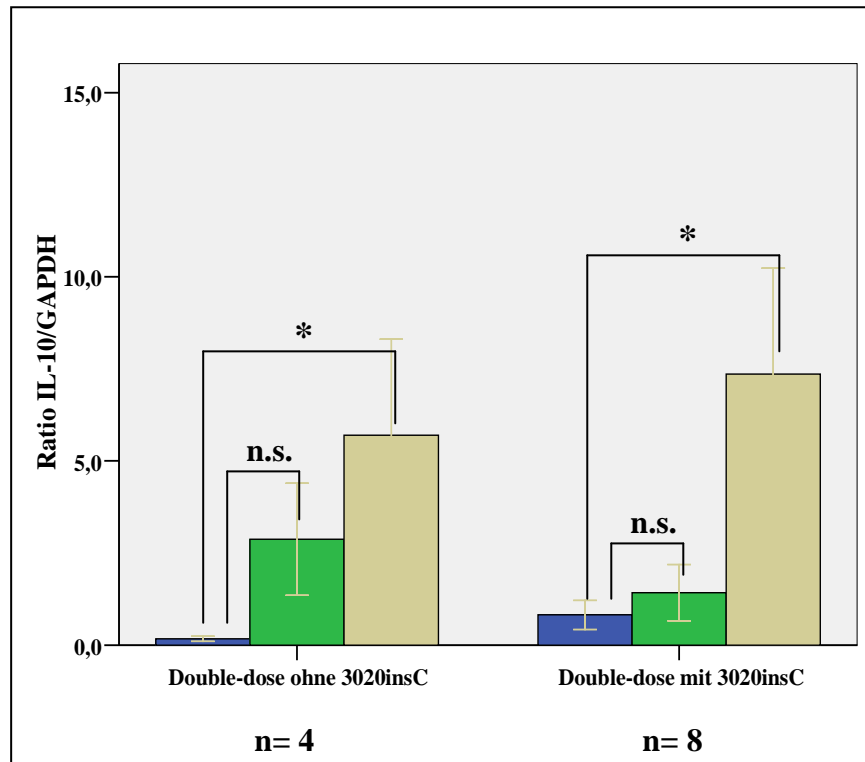


Abb.4.6: **IL-10 mRNA Expression** in den Gruppen Double-dose mit und ohne der 3020insC Mutation nach MDP bzw. LPS Stimulation
 Blau: Medium/unstimuliert
 Grün: 100ng /MDP
 Gelb: 100ng /LPS
 *: $p \leq 0,05$
 n.s.: nicht signifikant

Es ist zu verzeichnen, dass, sowohl in der Gruppe mit mindestens einem 3020insC Allel wie auch in der Gruppe ohne dieses Allel, es zu einem signifikanten Anstieg der IL-10 mRNA Expression nach Stimulation mit LPS gekommen ist ($P=0,028$ und $P=0,043$). Bei Stimulation mit MDP ist eine nicht signifikante Antwort in der Gruppe der Double-dose ohne 3020insC zu beobachten ($P= 0,068$), jedoch fehlt diese Antwort in der Gruppe der Monozyten von Individuen mit mindestens einem 3020insC Allel gänzlich ($P= 0,889$).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Expression von IL-10 bei LPS Stimulation unverändert hoch bleibt, unabhängig vom NOD2-Genotyp. Jedoch ist diese Expression bei Stimulation mit MDP gestört, sodass in der Gruppe der Double-dose mit 3020insC Allel kaum noch ein Anstieg der IL-10 mRNA Expression nach Stimulation mit MDP zu verzeichnen ist.

4.4 Basale und MDP/LPS-induzierte Expression von Interleukin 12 p40 mRNA in Abhängigkeit vom *NOD2*-Genotyp

Für die Untersuchung zur mRNA Expression von IL-12 p40 (Interleukin 12) sind identische Gruppen wie bei den bereits besprochenen Zytokinen gebildet worden. Es erfolgte zunächst der Vergleich zwischen Monozyten von Individuen mit vorhandenem *NOD2* Wildtyp-Allel und Monozyten von Individuen mit zwei mutierten *NOD2* Allelen: Wildtyp-Allel-vorhanden und Double-dose. Siehe Abbildung 4.7.

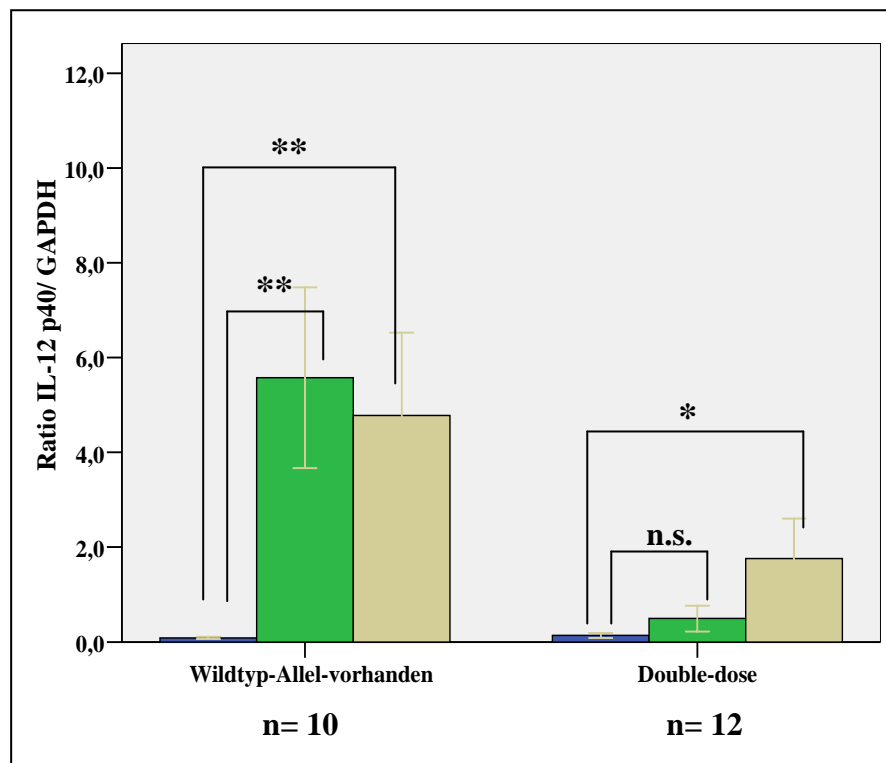


Abb.4.7: **IL-12p40 mRNA Expression** in den Gruppen *NOD2* Wildtyp-Allel-vorhanden und *NOD2* Double-dose nach Stimulation mit MDP und LPS
Blau: Medium/unstimuliert
Grün: 100ng /MDP
Gelb: 100ng /LPS
*: $p \leq 0,05$
**: $p \leq 0,01$
n.s.: nicht signifikant

Es ist zu erkennen, dass es bei der Stimulation mit MDP zu einem signifikanten Anstieg der IL-12 p40 mRNA Expression in der Wildtyp-Gruppe kommt im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten ($P=0,005$). In der Gruppe der Double-dose *NOD2* mutierten Monozyten ist nur ein geringer Zuwachs zu erkennen im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten ($P=0,388$). Bei der LPS Stimulation ist der Anstieg der IL-12p40 mRNA Expression sowohl in der Gruppe der Wildtyp Monozyten wie auch in der Gruppe mit den zwei mutierten Allelen im *NOD2*-Gen signifikant ($P=0,005$ und $P=0,012$).

Bei der weiteren Untersuchung zur IL-12p40 mRNA Expression sind die Gruppen Double-dose mit mindestens einem 3020insC Allel und ohne dieses Allel betrachtet worden. Siehe Abbildung 4.8.

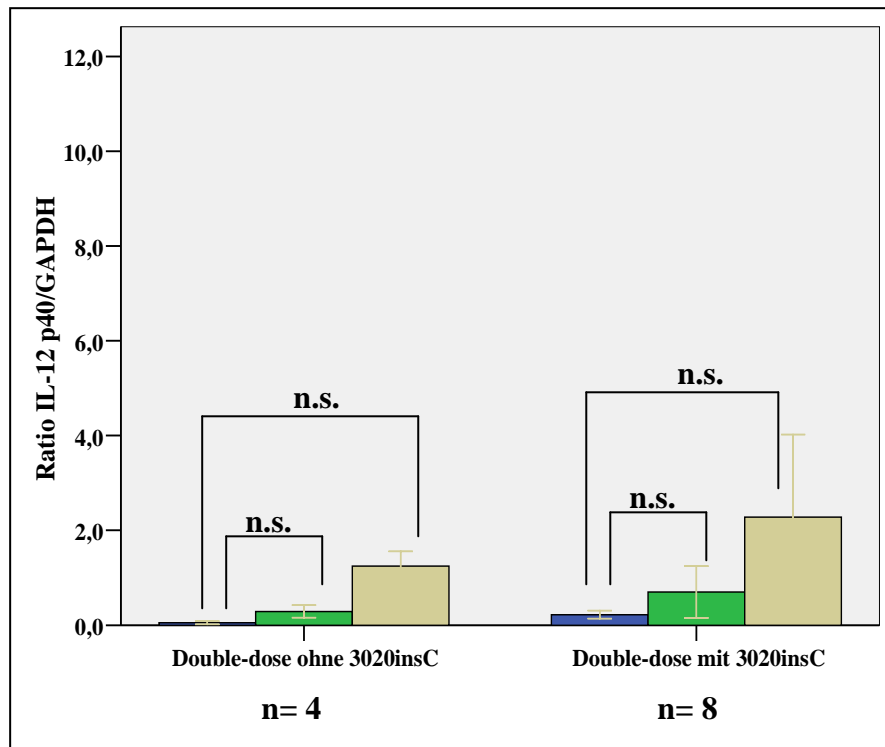


Abb.4.8: **IL-12p40 mRNA Expression** in den Gruppen Double-dose mit und ohne der 3020insC Mutation nach Stimulation mit MDP und LPS
 Blau: Medium/unstimuliert
 Grün: 100ng /MDP
 Gelb: 100ng /LPS
 n.s.: nicht signifikant

Sowohl bei der Stimulation mit MDP, wie auch mit LPS ist es zu keinem signifikanten Anstieg der IL-12p40 mRNA Expression gekommen im Vergleich zu den unstimulierten Proben.

Dennoch ist zu vermerken, dass nach Stimulation mit LPS es doch zu einem Anstieg der IL-12 p40 mRNA Expression gekommen ist. Das Fehlen der statistischen Signifikanz kann hier aufgrund der relativ geringen Gruppenstärke entstanden sein. Im Vergleich hierzu, war der Anstieg der mRNA Expression für IL-12p40 nach Stimulation mit MDP, sowohl in der Gruppe der Monozyten von Double-Dose Individuen mit mindestens einem 3020ins C Allel als auch in der Gruppe der Monozyten von Double-dose Individuen ohne das 3020ins C Allel zu einem viel schwächeren Anstieg der IL-12 p40 mRNA Expression gekommen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression von IL-12p40 mRNA bei LPS Stimulation kaum verändert wird bei variablem NOD2-Genotypus, jedoch ist die Expression bei MDP Stimulation in Monozyten von Individuen mit zwei mutierten NOD2 Allelen signifikant gestört.

4.5 Basale und MDP/LPS-induzierte Expression von *NOD2* mRNA in Abhängigkeit vom *NOD2*-Genotyp

Bei der Auswertung der Ergebnisse der *NOD2* mRNA Expression wurde die Gruppe Wildtyp-Allel-vorhanden der Gruppe Double-dose gegenübergestellt. Siehe Abbildung 4.9.

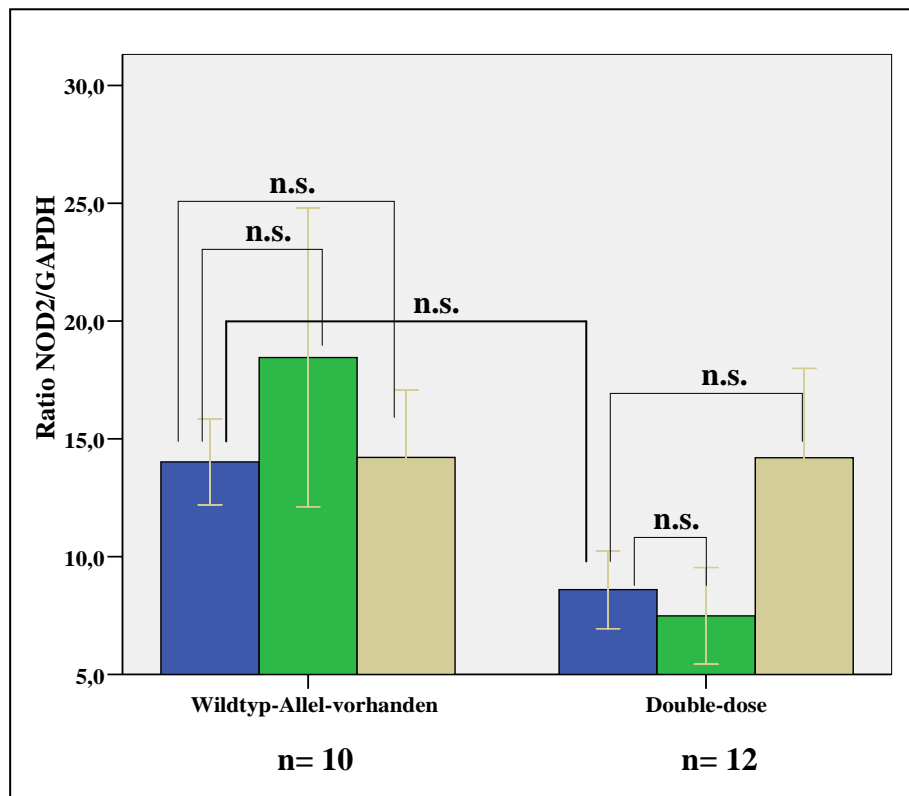


Abb.4.9: **NOD2 mRNA Expression** in den Gruppen Wildtyp-Allel-vorhanden und Double-dose basal und nach Stimulation mit MDP bzw. LPS: Blau: Medium/unstimuliert Grün: 100ng /MDP Gelb: 100ng /LPS n.s.: nicht signifikant

Zunächst konnte beobachtet werden, dass in der basalen Expression von *NOD2* mRNA keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vorhanden sind. In der Gruppe Wildtyp-Allel-vorhanden kam es bei Stimulation mit MDP oder LPS zu keinem signifikanten Anstieg der *NOD2*-Expression ($P=0,878$) bzw. ($P=0,721$) im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten. In der Gruppe der Double-dose war weder bei MDP, noch bei LPS Stimulation ein signifikanter Anstieg der *NOD2* Expression nachweisbar MDP ($P= 0,937$), LPS ($P= 0,263$).

Weiterhin wurden die Gruppen Double-dose mit mindestens einem 3020insC Allel und die Double-dose Gruppe ohne dieses mutierte Allel untersucht. Siehe Abbildung 4.10.

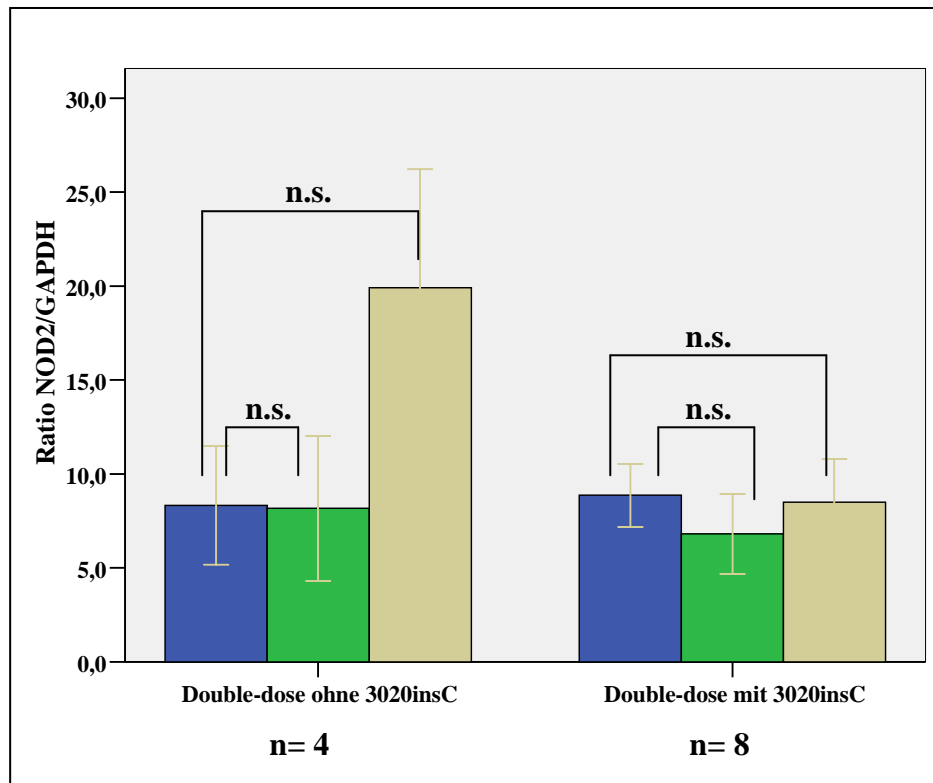


Abb.4.10: **NOD2** mRNA Expression in den Gruppen Double-dose mit und ohne der 3020insC Mutation basal und nach Stimulation mit MDP bzw. LPS
 Blau: Medium/unstimuliert
 Grün: 100ng /MDP
 Gelb: 100ng /LPS
 n.s.: nicht signifikant

Bei dieser Unteranalyse konnte unabhängig vom Genotyp ebenfalls keine signifikante Änderung der NOD2 mRNA Expression nach Stimulation mit MDP oder LPS gesichert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die basale mRNA Expression für NOD2 unabhängig vom NOD2-Genotyp ist. Weiterhin zeigte sich, dass die Expression von NOD2 kaum beeinflusst werden konnte durch die Stimulation mit MDP oder LPS. Im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten ist die Expression in den stimulierten Monozyten gleich geblieben. Dieses Bild war bei allen untersuchten Gruppen zu verzeichnen.

5. Diskussion

5.1 Allgemeine Vorgehensweise

In dieser Untersuchung wurde der Einfluss von NOD2-Mutationen auf die zelluläre Antwort von Monozyten nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen untersucht. Hierfür wurde eine Studienpopulation gewählt, in welcher Individuen (sowohl gesunde Kontrollpersonen als auch Morbus Crohn Patienten) mit verschiedenen NOD2-Genotypen vorhanden waren. Die häufigsten NOD2 Mutationen sind Leu1007fs/3020insC, R702W und G908R und bewirken im NOD2-Gen die Fertigstellung eines veränderten NOD2-Proteins. In der Studienpopulation waren Wildtyp, homozygote, einfach heterozygote, compound-heterozygote und homozygote Individuen vertreten. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde die Gruppe Wildtyp-Allel-vorhanden gebildet. In dieser waren die NOD2-Genotypen Wildtyp (Kontrollen und Patienten mit Morbus Crohn) und einfach heterozygote Individuen enthalten. Diese Einteilung wurde gewählt, da aus Literaturangaben und aus unseren eigenen Betrachtungen kein Unterschied in der Zytokinexpression zwischen Wildtyp NOD2 Patienten mit Morbus Crohn und Wildtyp Kontrollpersonen festzustellen war. Des Weiteren konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Zytokinexpression zwischen den NOD2 einfach heterozygoten Individuen und der NOD2 Wildtyp-Population verzeichnen. Siehe Abbildung 4.1. Dieser Gruppe wurde die Gruppe Double-dose, mit 2 mutierten NOD2 Allelen gegenüber gestellt. Darin waren alle Individuen mit 2 mutierten NOD2 Allelen enthalten; homozygot und compound-heterozygot unabhängig für die 3 NOD2 Mutationen (R702W, G908R und Leu1007fs/3020insC). Eine weitere Gegenüberstellung erfolgte zwischen den Gruppen Double-dose mit und ohne einem 3020insC Allel. Diese Einteilung erfolgte aufgrund des in vorausgegangen Studien belegten starken Einflusses dieser Variante auf die Rezeptorfunktion in transfizierten Zelllinien. In der Gruppe Double-dose ohne 3020insC waren alle Individuen mit 2 mutierten Allelen enthalten, von denen keines die 3020insC Mutation enthielt. In der Vergleichsgruppe waren Individuen mit 2 mutierten NOD2 Allelen enthalten, die mindestens ein 3020insC Allel enthielten.

Anhand des NOD2 Genotyps wollten wir untersuchen inwieweit sich die monozytäre Zytokinexpression verändert. Hierfür haben wir 3 Zytokine betrachtet. Diese sind das pro-inflammatorische IL-1beta, das anti-inflammatorische IL-10 und das pro-inflammatorische Mediatorzytokin IL12. Aus mehrfach bestätigten Studien ist gesichert, dass Mutationen im NOD2-Gen eine gestörte NF- κ B Aktivierung nach sich zieht (Vidal, 2001; Fritz, 2005; Inuma, 1995; Todate; 2001; Abbott, 2004; Kobayashi, 2002; Wehkamp, 2004). Diese Aktivierung hat unterschiedliche

Konsequenzen auf die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, welche in der Literatur kontrovers diskutiert werden.

Diese Expression haben wir untersucht, nachdem wir isolierte Monozyten mit verschiedenen NOD2 Genotypen unterschiedlich behandelt haben. Einmal mit dem NOD2-Liganden MDP, einmal mit dem TLR4-Liganden LPS stimuliert und einmal unstimuliert gelassen. Durch die Stimulation mit MDP wurde der Signalweg über den intrazellulären Rezeptor NOD2 beschriftet und dadurch die Zytokinexpression eingeleitet. Bei LPS-Stimulation wurde die Signalkaskade über den TLR4-Rezeptor weitergeleitet, die unabhängig von der des NOD2-Rezeptors ist. Dadurch konnten die Effekte der unterschiedlichen Signalkaskaden verglichen werden und in Relation zu den unstimulierten Monozyten gesetzt werden.

5.2 Die Interleukin 1beta mRNA Expression

Eines der pro-inflammatorischen Zytokine, welches durch den Kernfaktor NF- κ B vermehrt induziert wird, ist das Interleukin 1beta. IL-1beta ist als Zytokin ein wichtiger Mediator der akuten Phase und der zellulären Immunantwort (Giovine, 1990). Es wird hauptsächlich von Monozyten exprimiert aber auch andere Zellen sind hierzu in der Lage (Dinarelo, 1984; Fenton, 1987). Es gehört als Vertreter der Akuten-Phase-Reaktion zum angeborenen Immunsystem und kann im weiteren Verlauf der Infektion eine Vermittlung zur adaptativen Immunantwort bewirken. Es verhilft dem Organismus eingedrungene Bakterien mit Hilfe unspezifischer Mechanismen abzuwehren und eine Homöostase im Intestinum wiederherzustellen. Bei Fortbestehen des infektiösen Reizes kann die Immunantwort zu spezifischen Abwehrmechanismen umgeleitet werden, wodurch eine effektivere Pathogenbekämpfung möglich gemacht wird.

In der Literatur sind zur Expression von IL-1beta in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp unterschiedliche Ergebnisse berichtet worden. Eine Gruppe berichtete, dass es nach Stimulation von NOD2 mutierten Makrophagen in Mäusen zur erhöhten Expression von IL-1beta mRNA von proIL-1beta und von maturem IL-1beta gekommen ist (Maeda, 2005). Dadurch wurde der 3020insC ähnlichen NOD2 Mutation ein positiver Effekt im Sinne eines Funktionszuwachses „gain of function“ zugeschrieben (Eckmann, 2005). Andere Gruppen haben Gegenteiliges beschrieben. Hierbei kam es in Untersuchungen an Monozyten an Morbus Crohn befallenen Individuen zu einer gestörten Expression von IL-1beta und IL-1beta mRNA nach Stimulation mit MDP (Li, 2004). Daher wurde die Theorie des Funktionsverlusts „loss of function“ erwogen, welche Mutationen in NOD2-Gen eine herabgesetzte

Funktion des NOD2-Protein zuschreiben, wodurch es im weiteren Verlauf zu einer Verringerung der Aktivierung der Signalkaskade kommt mit verminderter Expression von IL-1beta (Eckmann, 2005).

Wir haben in unserer Untersuchung beobachtet, dass es bei Stimulation mit MDP in den Monozyten abhängig vom NOD2-Genotyp zu unterschiedlichen Expressionsmustern bei IL-1beta kommt. In der Gruppe mit einem Wildtyp-Allel war ein signifikanter Anstieg bei MDP Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Monozyten zu beobachten. In der Gruppe der Monozyten mit 2 mutierten NOD2 Allelen war dieser Anstieg niedrig, aber ebenfalls noch signifikant. In der Gruppe der Double-dose mit mindestens einem 3020insC Allel war dieser Anstieg kaum zu verzeichnen. Hingegen bei Stimulation mit LPS war der Anstieg der Expression in allen untersuchten Gruppen signifikant.

Bei Stimulation der Monozyten mit MDP kommt es zur deutlichen Zunahme der Expression von IL-1beta im Vergleich zu unstimulierten Monozyten. Dies kann als Erkennung des MDP durch das NOD2-Protein und der Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade interpretiert werden. Diese Aktivierung ist am deutlichsten in der Gruppe der Monozyten von Individuen mit noch einem Wildtyp NOD2 Allel vorhanden. Es kann so verstanden werden, dass mindestens ein intaktes Allel vorhanden ist und für ein funktionsfähiges NOD2-Protein codieren kann. Dieses Protein fungiert als intrazellulärer Rezeptor für MDP und bewirkt eine Antwort der zellulären Abwehr gegen Pathogene, was in der Expression von Zytokinen geschieht, wie hier in Form von IL-1beta. Bei Mutationen im NOD2 kommt es zur Synthetisierung von einem veränderten NOD2-Protein, was in seiner Funktion eingeschränkt sein könnte und als Konsequenz zu einer geringeren Expression von IL-1beta führen könnte. In der Gruppe der zweifach mutierten Individuen ist die Expression im Vergleich zu unstimulierten Monozyten zwar noch signifikant angestiegen, jedoch vermindert im Vergleich zu der Antwort der Monozyten der Wildtyp Gruppe. Dieser geringere Anstieg der IL-1beta Expression kann als Folge der 2 mutierten Allele interpretiert werden. In der Gruppe der doppelt mutierten Monozyten mit mindestens einem 3020insC Allel fehlt die Antwort auf den MDP Reiz fast gänzlich. Dies weist auf die besondere Bedeutung der 3020insC Mutation hin. Diese Mutation bedingt im NOD2-Protein eine Verkürzung des MDP-erkennenden Bereiches um 33 Aminosäuren. In Anbetracht der oben genannten Theorien „gain of function“ und „loss of function“ trifft die letztere gut auf unsere Ergebnisse zu. In unseren Ergebnissen konnten wir keine vermehrte Expression von IL-1beta in NOD2 mutierten Monozyten verzeichnen, weder bei Double-dose Individuen mit der 3020insC Mutation, noch bei Individuen ohne diese Mutation, noch bei Betrachtung aller zweifach mutierten Individuen unserer Studienpopulation. Hingegen konnten wir einen geringeren Anstieg der IL-1beta mRNA Expression nach Stimulation mit MDP, die bei Anwesenheit von 2 mutierten Allelen und davon einem oder zwei 3020insC Allele, am deutlichsten ausgeprägt war. Bei der Stimulation mit LPS ist es zu einheitlicheren Ergebnissen gekommen. LPS wurde verwendet als Kontrolle für die Expression von

IL-1beta. LPS wird über den TLR4 Rezeptor erkannt und führt über die Aktivierung von NF- κ B zur Expression von zahlreichen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, unter anderem auch Interleukin 1beta (Janeway, 2002; Shi, 2006; Kobayashi, 2002; Rosenstiel, 2003; Strober, 2006). Bei Stimulation mit LPS würden wir eine von NOD2-Genotyp unabhängige Antwort auf den Reiz erwarten im Sinne einer signifikanten Expressionszunahme im Vergleich zu unstimulierten Monozyten. Das ist auch in unseren Untersuchungen der Fall gewesen, in allen Genotyp-Gruppen konnte ein signifikanter Anstieg der IL-1beta mRNA Expression nach LPS beobachtet werden.

Interleukin 1beta ist ein Zytokin welches Monozyten und andere Zellen in Anwesenheit von Pathogenen produzieren. Es schützt gemeinsam mit vielen anderen pro-inflammatorischen Zytokinen die Zelle am Leben und den Zellverband funktionsfähig zu halten. Dieser Schutz basiert auf der Aktivierung von unspezifischen Abwehrmechanismen und bei Persistenz des Pathogens auf spezifischen Abwehrmaßnahmen im Zuge der adaptativen Immunantwort. Kommt es im Zuge von Mutationen im NOD2-Gen zu einer verminderten Erkennung und Signalweiterleitung und zu einer geringeren Expression von IL-1beta, so wäre es durchaus denkbar, dass dadurch eine Lücke in der Abwehr entstehen könnte. Diese Lücke würde, bei alleiniger Betrachtung von IL-1beta, den pathogenen Mikroorganismen erlauben vermehrt in die Zellen der Mukosa einzuwandern und sich dort zu vermehren. Dies würde zu einer lokalen Entzündungsreaktion führen, die sich im weiteren Verlauf ausbreiten könnte. Dieses Bild mit einer lokalen oder ausgedehnten Entzündung der Mukosa des Intestinums ist beim Morbus Crohn zu erkennen. Bei Persistenz der Mikroorganismen kann es zu chronisch rezidivierenden Entzündungen kommen, da der Körper nicht in der Lage ist die Pathogene zu beseitigen. Mit Fokus auf IL-1beta könnte eine mangelnde Expression hiervon zu einer verminderten Immunabwehr führen, die eine komplette Eliminierung der Pathogene behindert.

5.3 Interleukin 10 mRNA Expression im Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp

Interleukin 10 wird von Monozyten und vielen weiteren Zellarten exprimiert. Es gehört zu den Zytokinen, die eine Entzündungsreaktion hemmen und beenden können. Dies geschieht durch die Hemmung der Effekte und der Signalkaskaden unter anderem von IL-1beta und TNF-alpha. Eine weitere Funktion ist die Lenkung der adaptiven Immunantwort von der Th-1 zur Th-2-vermittelten Abwehr (Fiorentino, 1989; Donnelly, 1999; Riley, 1999; Rennick, 2000; Li, 2003).

Morbus Crohn ist eine granulomatöse Entzündungsreaktion des Intestinums mit einem Überwiegen der Th-1-gewichteten Abwehrreaktion (Bouma, 2003; Sato, 2005; Cobrim, 2005; Ogura, 2005;

Monteleone, 2005; Madsen, 2002). IL-10 ist, wie oben erwähnt, ein Vermittler der Th-2 gewichteten Antwort und somit könnte seine Abwesenheit im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren eine Th-1 Antwort begünstigen. Weiterhin könnte die Funktion von IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin beim Morbus Crohn von großer Bedeutung sein, da es die Entzündungsreaktion beenden oder mindern könnte.

Beim Morbus Crohn ist im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten die Expression und Bedeutung zahlreicher Zytokine untersucht worden: TNF-alpha, IL-6, IL-1beta usw. (Fantini, 2007; Van Assche, 2007). Bis dato gibt es jedoch kaum Daten zur monozytären Expression von IL-10 in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp.

Unsere Untersuchungen haben sich mit der Expression von IL-10 bei M. Crohn assoziierte Varianten im NOD2-Gen beschäftigt. In der Gruppe der Individuen mit mindestens noch einem vorhandenen Wildtyp-Allel im NOD2-Gen war bei Stimulation mit MDP im Vergleich zu unstimulierten Monozyten ein signifikanter Anstieg der IL-10 mRNA Expression zu beobachten. In der Gruppe der zweifach mutierten Individuen, in der homozygote- wie auch compound-heterozygote Träger der Mutationen R702W, G908R und Leu1007fs enthalten waren, war ein kleiner Anstieg der IL-10 mRNA Expression nach Stimulation mit MDP noch zu ersehen, jedoch blieb dieser Anstieg nicht signifikant im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten. Im Vergleich zu den Individuen mit zwei mutierten NOD2-Allelen ohne die 3020insC-Mutation, war bei NOD2-zweifachmutierten Individuen kaum eine Antwort auf MDP zu verzeichnen. Bei der Stimulation mit LPS war in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg der IL-10 mRNA Expression zu verzeichnen.

Somit konnten wir zeigen, dass ähnlich wie für IL-1beta, in Individuen mit zwei mutierten NOD2-Allelen, die IL-10 mRNA Expression nach Stimulation mit MDP gestört ist. In Individuen mit noch einem Wildtyp-Allel im NOD2-Gen ist es zu keiner Störung der IL-10 mRNA Expression nach Stimulation mit MDP gekommen. Somit sind die NOD2-Wildtyp und NOD2-einfach heterozygote Individuen in der Lage IL-10 nach Kontakt mit MDP zu exprimieren, was zeitgleich mit der Expression von anderen pro-inflammatorischen Zytokinen geschieht. Dies ist deswegen sinnvoll, da eine Entzündung nach Elimination des Pathogens beendet werden sollte, um nicht weiteren Schaden im Gewebe zu verursachen. Bei verminderter Expression von IL-10 könnte eine Entzündungsreaktion länger als nötig anhalten und im besonderen Fall chronifizieren.

Bei Untersuchung der 3020insC Mutation ist festzustellen, dass die IL-10 mRNA Expression nach Kontakt mit MDP deutlich gemindert ist im Vergleich zu zweifach mutierten Individuen ohne diese Mutation. Die 3020insC Mutation bewirkt im NOD2 Protein eine Verkürzung der LRR-Region, die von Bedeutung für die Erkennung von MDP ist (Inohara, 2001). Die Strukturveränderung in diesem Bereich, bedingt durch dieses Allel, mündet in einer fehlenden Rezeptorfunktion des Proteins, welches

im Falle eines ebenfalls mutierten zweiten Allel, nicht kompensiert werden kann. Bei Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS war in allen untersuchten Gruppen die mRNA Expression für IL-10 signifikant angestiegen, im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten. Die Erkennung von LPS ist unabhängig vom NOD2 und bewirkt identische Effekte in Anbetracht der Zytokinexpression (Janeway, 2002). Somit konnten wir zeigen, dass Mutationen im NOD2 eine gestörte IL10 mRNA Expression nur nach Stimulation mit dem spezifischen Stimulus MDP führen, wobei die Antwort auf andere pathogene Bestandteile erhalten ist.

Interleukin 10 ist als Vertreter der anti-inflammatorischen und der Th-2-gewichteten Immunantwort bei der Abwehr gegenüber pathogenen Mikroorganismen von großer Bedeutung. IL-10 wird, wie viele andere Zytokine auch, bei Konfrontation von Zellen der Immunabwehr mit Pathogenen zum Schutz des Organismus exprimiert. Bei Mutationen im NOD2-Gen kommt es nach Kontakt mit MDP zu einer verminderten Antwort der Monozyten im Sinne einer herabgesetzten Expression von IL-10. Diese Expression ist am deutlichsten herabgesetzt beim Vorhandensein der 3020insC Mutation in zweifach mutierten Individuen. Als Folge davon könnte es, bei alleiniger Betrachtung von IL-10, zu einer verstärkten und länger andauernden Immunantwort kommen, was sein Korrelat in einer chronischen Entzündung wiederfindet, wie es im Bild des Morbus Crohn zu erkennen ist. Des Weiteren ist das Bild des Morbus Crohn durch eine Th-1-gewichtete Immunantwort gekennzeichnet, was unter vielen weiteren Faktoren auch durch eine Mindersekretion von IL-10 geschehen könnte.

5.4 Interleukin 12 p40 mRNA-Expression in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp

Interleukin 12 gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und besteht aus einer p35 und aus einer p40 Untereinheit (Kobayashi, 1989). Es wird von phagozytierenden Zellen wie Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert und sezerniert (D'Andrea, 1992; Macatonia, 1995). Einer der Effekte von IL-12 ist die Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins Interferon gamma und die Differenzierung von indifferenten T-Lymphozyten zu Th-1-Lymphozyten (Hsieh, 1993; Manetti, 1993).

Im Rahmen des Morbus Crohn wurden in Biopsaten aus Mukosa von Betroffenen erhöhte Expressionen von IL-12 und Interferon gamma gefunden (Monteleone, 1997). Weiterhin ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt, dass der Th-1-gewichteten Immunantwort beim Morbus Crohn IL-12, als Bindeglied zwischen angeborener und adaptativer Immunantwort, möglicherweise eine

tragende Rolle zukommt (Bouma, 2003; Sato, 2005; Cobrim, 2005; Ogura, 2005; Monteleone, 2005; Madsen, 2002, Podolsky, 2002).

In einer vorausgegangenen Untersuchung zur IL-12 Expression ist an Mäusen beobachtet worden, dass eine Ausschaltung des NOD2-Gens eine selektive Erhöhung der IL-12 Expression nach Kontakt mit bakteriellem Peptidoglykan (PGN) als Folge hat (Watanabe, 2004). Dies wurde auf eine hemmende Wirkung des NOD2-Proteins auf die IL-12 Expression nach Kontakt mit PGN zurückgeführt, welche beim Vorhandensein von NOD2-Mutationen nicht mehr ausgeübt werden kann. Eine Studie hatte Gegenteiliges berichtet: hier kam es beim mutierten NOD2-Gen zu einer Abnahme der IL-12 Expression nach Stimulation mit bakteriellem Peptidoglykan (Kobayashi, 2005).

Unsere Untersuchung hat alleine die Zytokinexpression nach selektiver Stimulation von NOD2 im Fokus und kann daher eingeschränkt mit den oben genannten Studien verglichen werden. Es ist beobachtet worden, dass es bei Stimulation mit MDP in Individuen mit mindestens einem Wildtyp-NOD2-Allel zu einer signifikanten Zunahme der IL-12 mRNA Expression gekommen ist. In der Gruppe der Individuen mit 2 mutierten NOD2-Allelen, ist noch ein kleiner Zuwachs der IL-12 mRNA Expression nach MDP zu verzeichnen, dieser ist jedoch nicht signifikant gegenüber unstimulierten Monozyten. Beim Betrachten der 3020insC Mutation ist in Monozyten von zweifach mutierten Individuen mit mindestens einem 3020insC Allel kaum noch ein Anstieg der IL-12 mRNA Expression nach Stimulation mit MDP zu verzeichnen. Bei Stimulation der Monozyten mit LPS war in allen Gruppen ein Zuwachs der IL-12 mRNA Expression zu verzeichnen.

MDP ist ein Bestandteil der Zellwand von grampositiven und gramnegativen Bakterien (Girardin, 2003). Aus Studien wird vermutet, dass es an die LRR-Region des NOD2-Proteins bindet und eine nachgeschaltete Signalkaskade auslöst, die es der Zelle ermöglicht das eingedrungene Pathogen mit Hilfe von zahlreichen Mechanismen abzuwehren. Mutationen im NOD2-Gen haben Konsequenzen auf die Funktion des NOD2 Rezeptors, was man unter anderem an einer veränderten Zytokinexpression erkennen kann. In unserer Untersuchung war die Antwort auf den NOD2-Liganden MDP bei Monozyten von Wildtyp NOD2-Individuen regelrecht. Es erfolgte ein Anstieg der IL-12p40 mRNA Expression. Diese ist ein Zeichen dafür, dass der Ligand erkannt wurde und in der Zelle eine Reaktion ausgelöst hat. In der Gruppe der Monozyten von Individuen mit 2 mutierten NOD2-Allelen, welche die 3 am häufigsten mit dem Morbus Crohn assoziierten NOD2-Mutationen enthielten, war die Antwort auf MDP, bzw. der Anstieg der IL-12p40 mRNA-Expression nicht signifikant im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten der selben Gruppe. Dies kann als eine Veränderung im Antwortverhalten auf den MDP Reiz gewertet werden, bei dem es aufgrund von Mutationen im NOD2 es zur Bildung ausschließlich eines funktionsgeminderten NOD2-Proteins gekommen ist, welches nicht adäquat MDP erkennt. In diesem Zusammenhang ist die 3020insC Mutation gesondert betrachtet

worden. Dafür wurden die Gruppen der Double-dose mutierten Monozyten mit und ohne ein 3020insC Allel gebildet. Die Antwort auf MDP war in beiden Gruppen nur sehr gering ausgeprägt, jedoch war die Antwort in der Gruppe mit der 3020insC Mutation fast fehlend. Die 3020insC Mutation bewirkt eine Verkürzung des NOD2-Proteins um 33 Aminosäuren in der funktionell wichtigen LRR-Region, die in unserem Fall dazu führt, dass kein IL-12p40 mRNA nach Kontakt mit MDP gebildet wird.

Unsere Ergebnisse sind nur bedingt mit den oben angeführten Studien (Watanabe, 2004; Kobayashi, 2005) vergleichbar. In diesen Studien ist zusätzlich zu den Mutationen im NOD2-Gen noch ein weiterer Faktor herangezogen worden. Hier wurde als Stimulus bakterielles Peptidoglykan (PGN) verwendet, welches zwar MDP enthält (und damit über NOD2 auch erkannt wird), aber abgesehen davon enthält es auch weitere pathogene Bestandteile, welche mittels den Toll-like-Rezeptor (TLR)-2 bzw. mittels Peptidoglykanrezeptoren erkannt werden. Aufgrund der Ergebnisse der ersten Studie (Watanabe, 2004) wurde vermutet, dass es Interaktionen zwischen NOD2 und TLR2 gibt, welche in der Regulation der IL-12 Expression nach Kontakt mit bakteriellem PGN eine Rolle spielen (Eckmann, 2005). Diese Interaktionen wurden in unserer Studie nicht untersucht. Wir haben als weiteren Vergleich die Stimulation mit LPS, einem TLR4 Liganden, vorgenommen. Hierbei ist in allen untersuchten Gruppen ein Anstieg der IL-12p40 mRNA Expression verzeichnet worden. Lediglich nach Aufteilung der Gruppe der zweifach mutierten Individuen in Abhängigkeit vom Vorhandensein der 3020insC Mutation ist es in beiden Untergruppen zu einem statistisch nicht signifikanten Anstieg der IL-12p40 mRNA Expression gekommen. Das Fehlen der statistischen Signifikanz könnte aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Personen (n=4 und n=8) mit zusätzlich großer Streuung der Expressionsmuster entstanden sein. Dennoch kann man einen Anstieg der IL-12p40 mRNA Expression bei der LPS Stimulation verzeichnen, der in beiden Gruppen deutlich höher war, als bei Stimulation mit MDP. Siehe Abbildung 4.8.

Interleukin 12 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und bewirkt neben der Aktivierung weiterer pro-inflammatorischen Zytokine eine Differenzierung der Lymphozyten im Sinne einer Spezialisierung. Diese beiden Effekte sind von großer Bedeutung für die Abwehr gegenüber eindringender Mikroorganismen. Eine verminderte Expression von IL-12 hätte möglicherweise Konsequenzen auf die Fähigkeit den Erreger effektiv zu eliminieren. Dies könnte zu einem vermehrten Eindringen und zur Persistenz von pathogenen Mikroorganismen, die ihrerseits eine lokale oder sich ausbreitende Entzündung zur Folge haben könnte. Wir haben hier gezeigt, dass Mutationen im NOD2-Gen zu einer verminderten Expression von IL-12p40 mRNA führen, mit besonderer Schwere bei dem Vorhandensein der 3020insC Mutation. Dies könnte zur Folge haben, dass es im Falle von mutiertem NOD2 den Darmbakterien leichter fällt in die Mukosa oder weiter interstitiell einzudringen. Durch die geringere Wirkung von IL-12, könnte diesen Pathogenen weniger entgegengesetzt werden und dies

könnte zu einer akuten und im weiteren Verlauf zu einer chronischen Entzündung der Mukosa führen, sowie es im Bild des Morbus Crohn zu beobachten ist.

Eine Besonderheit des IL-12 ist sein heterodimerer Aufbau. Die beide Untereinheiten (p35 und p40) sind Produkte von zwei verschiedenen Genen, die unabhängig voneinander lokalisiert sind und unterschiedlich kontrolliert werden (Sieburth, 1992). Während p35 ubiquitär exprimiert und posttranskriptionell reguliert wird (Aste-Amezaga, 2000; Ma, 1996), ist p40 auf Phagozyten und dendritische Zellen beschränkt und erliegt lediglich einer transkriptionellen Regulierung (Trinchieri, 2003). Im Vergleich zum biologisch aktiven IL-12 und zum p35, wird p40 10-1000mal mehr sezerniert (Trinchieri, 1998). In unserer Untersuchung wurde die Expression der p40 Untereinheit gemessen. Die p40 Untereinheit kann als eigenständiges Zytokin mit separaten Funktionen betrachtet werden. Diese Möglichkeit eröffnet sich beim Betrachten weiterer Zytokine, die ebenfalls die p40 Untereinheit oder p40 verwandte Untereinheiten besitzen. Solche wären das Interleukin 23, indem p40 mit einer p19 kombiniert ist (Cua, 2003) und das Interleukin 27, das aus einer p28 und der mit p40 verwandten Untereinheit EB13 besteht (Pflanz, 2002). Siehe Abbildung 5.1. Ein weiteres Indiz für die Eigenständigkeit von p40 ist der frühe Anstieg der p40 Konzentration (2-3st) im Vergleich zu der p35 bzw. der p75 Untereinheiten (6-12st) (Abdi, 2002). Dies macht p40 vergleichbar mit den unspezifischen Proteinen der akuten Phase CRP (C-reaktives Protein) oder MBL (mannose binding lektin), die ihrerseits ebenfalls eigenständige Funktionen besitzen. Eine weitere potentielle Funktion der p40 Untereinheit wäre die eines Shuttlemoleküls da, wie oben beschrieben, p40 Teil anderer Zytokine ist, aber nur an die p40 spezifischen Untereinheit des agonistischen Rezeptors (IL-12 β 1) bindet (Oppmann, 2000). Dadurch könnte die Wirkung der akzessorischen Untereinheit eventuell moduliert werden oder andere Rezeptoren angesteuert werden. Zytokine mit dieser p40 Untereinheit (IL-23, IL-27) sind kürzlich in den Fokus der Untersuchungen zur Pathogenese des Morbus Crohn gerückt und könnten evtl. zum weiteren Verständnis der Ätiologie beitragen.

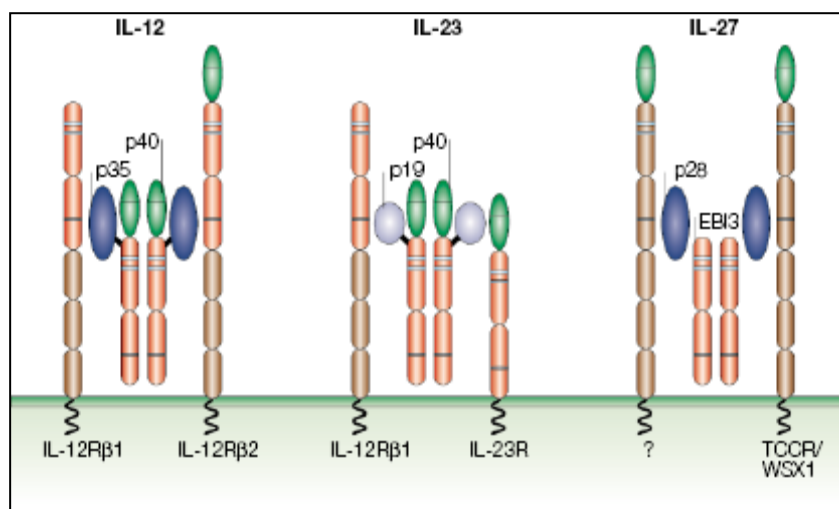


Abbildung 5.1: Zytokine, die die p40 Untereinheit oder deren Verwandten beinhalten und deren Rezeptoren (nach Trinchieri, 2003)

5.5 NOD2 mRNA-Expression in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp

Das nucleotide-binding oligomerization domain (NOD2) gehört zu einer Gruppe von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, siehe Abbildung 1.14, und erkennt spezifisch MDP, einen Bestandteil der Zellwand gramnegativer und grampositiver Bakterien (Inohara, 2003, Girardin, 2003). Die Erkennung von MDP erfolgt in der LRR-Region des Proteins. Nach Bindung von MDP an das Protein kommt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, mit nachgeschalteter Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine.

Beim Morbus Crohn sind zahlreiche Mutationen im NOD2-Gen beschrieben worden, von denen die R702W, die G908R und die frameshift Mutation Leu1007fs am häufigsten mit der Erkrankung assoziiert sind (Hugot, 2001; Ogura, 2001). Diese 3 Mutationen befinden sich allesamt in der bzw. in der Nähe der MDP Erkennungsstelle und bewirken eine Funktionsänderung des Proteins.

In dieser Untersuchung wurde die mRNA Expression von NOD2 in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp untersucht. Dafür wurde für die quantitative PCR ein Primer verwendet, der nicht in der LRR-Region bindet und somit die Erkennung sowohl mutierter als auch Wildtyp-Kopien ermöglicht. Zunächst wurde die basale mRNA Expression für NOD2 in Abhängigkeit vom Genotyp untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der basala NOD2-Expression in der Gruppe der Monozyten von Individuen mit mindestens einem Wildtyp-NOD2-Allel und zweifachmutierten Individuen festgestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die monozytäre NOD2 mRNA-Expression unabhängig vom NOD2-Genotyp ist.

Weiterhin wurde der Einfluss einer Stimulation mit MDP bzw. LPS auf die monozytäre NOD2 mRNA-Expression in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp untersucht. Dafür haben wir zunächst die Gruppe der Monozyten von Individuen mit noch mindestens einem vorhandenen Wildtyp-Allel betrachtet. In dieser Gruppe war zu erkennen, dass bei der Stimulation mit MDP es zu einer Zunahme der NOD2-mRNA-Expression gekommen ist. Diese Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten. In der Gruppe der Double-dose mutierten Monozyten, unabhängig vom Vorhandensein eines 3020insC Allel, war keine signifikante Änderung der NOD2 mRNA Expression im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten zu verzeichnen. Bei der Stimulation mit LPS war identisches zu beobachten. In keiner der untersuchten Gruppen hatte der NOD2-Genotyp eine Auswirkung auf die NOD2 mRNA-Expression.

In der Gruppe der Wildtyp-Monozyten konnte ein leichter Anstieg der NOD2 Expression bei Stimulation mit MDP beobachtet werden. Dieser war nicht signifikant, jedoch erlaubt dieser Anstieg zu vermuten, dass es dazu nicht zufällig gekommen ist. Es könnte zu einer positiven Rückkopplung hierbei gekommen sein, nach einstiger Stimulation des MDP Rezeptors. Aus immunologischer Sicht

wäre dies erklärbar, da ein vermehrtes Eindringen bzw. erhöhte Aufnahme von Bakterienbestandteilen, die einen immunologischen Reiz auslösen, zu einer erhöhten Bereitschaft zur Erkennung der Eindringlinge führen sollte und die sich anschließende Abwehr einleiten sollte. In der Gruppe der Monozyten von Individuen mit zwei mutierten NOD2-Allelen oder nach der Stimulation mit LPS, war dies nicht zu beobachten.

5.6 Bedeutung der Ergebnisse für Morbus Crohn und Ausblick

Im Rahmen unserer Untersuchung konnten wir feststellen, dass in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp es zu Unterschieden in der Expression der Zytokine IL-1beta, IL-10 und IL-12p40 nach Stimulation mit MDP kommt.

Bei Stimulation mit MDP ist es bei Individuen mit mindestens einem Wildtyp-NOD2-Allel zu einer regelhaften Antwort der Monozyten auf den Reiz gekommen, im Sinne einer Erhöhung der Zytokinexpression. Bei Monozyten von Individuen mit zwei mutierten Allelen im NOD2 war die Expression für alle untersuchten Zytokine gemindert. Von den drei häufigsten NOD2-Mutationen beim M. Crohn (Leu1007fs (3020insC), R702W, und G908R) hat sich die 3020insC Mutation als die folgenreichste herausgestellt, da es bei Anwesenheit von mindestens einem 3020insC Allel zu einem fast fehlenden Anstieg der Zytokinexpression nach Stimulation mit MDP gekommen ist.

Die Zytokine IL-1beta, IL-10 und IL-12 sind Effektoren des Immunsystems, die z.B. nach Kontakt mit einem bakteriellen Stimulus exprimiert werden. In unserem Fall war dieser Stimulus MDP, die spezifische Peptidoglykan-Untereinheit, die durch NOD2 erkannt wird. Diese Zytokine bewirken ein sofortiges Einleiten einer Immunabwehr, Akute-Phase Reaktion (IL-1beta), bewirken eine Spezialisierung der Immunzellen, um dem Pathogen noch differenzierter entgegenzutreten zu können, mit einem Wechsel der Antwort zu Th-1 (IL-12), oder leisten einen Schutz des Organismus indem sie eine Hemmung oder Beendigung der Entzündung, mit Chance auf Reparationsvorgänge, bewirken (IL-10). Eine Störung der Expression dieser Zytokine nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen, so wie es bei Morbus Crohn assoziierten NOD2-Mutationen der Fall ist, kann eine Beeinträchtigung der Homöostase bewirken und zu Störungen in der Barrierefunktion des Gastrointestinaltraktes führen.

Der Gastrointestinaltrakt ist von zahlreichen, verschiedenen Bakterienspezies bewohnt, die mit dem Menschen eine Symbiose zu beider Vorteil eingehen. Hierbei wird eine Grenzzone durch das Immunsystem gezogen, welches die Integrität des menschlichen Organismus aufrechterhält, damit es nicht zu einem Bevölkern des Menschen durch die Bakterien kommt. Zusätzlich kann das

Immunsystem zwischen schädlichen und nützlichen Bakterien unterscheiden bzw. welche es zu bekämpfen oder zu tolerieren gilt. Dieses empfindliche Gleichgewicht kann leicht durch endogene oder exogene Reize gestört werden. Diese Störung bedarf einer regelhaften Immunantwort, um die gewünschte Homöostase wiederherzustellen. Ist eine regelhafte Immunantwort aufgrund von, unter anderem denen in dieser Arbeit aufgezeigten genetischen Defekten, nicht möglich, könnte es zu einem Eindringen und Persistieren von pathogenen Mikroorganismen kommen, die nicht adäquat abgewehrt werden können. Diese Persistenz kann zum einen eine weitere Ausbreitung zu Folge haben oder die Persistenz der Mikroorganismen kann eine andauernde, da nicht erfolgreiche, Immunantwort nach sich ziehen. Diese Immunantwort kann in Form einer lokalen oder systemischen Entzündung an den Tag treten und zu zahlreichen intra- und extraintestinalen Manifestationen führen, wie sie im Bild des Morbus Crohn vorherrschen.

Jedoch können die beschriebenen genetischen Defekte im NOD2-Gen nicht alleine für das Bild des Morbus Crohn verantwortlich gemacht werden. Es kommen noch zahlreiche andere genetische Faktoren sowie auch Umweltfaktoren hinzu, welche einzeln sicher nicht die Fähigkeit besitzen die Pathogenese des Morbus Crohn zu erklären. Hingegen können diese Faktoren gemeinsam oder zumindest als prädisponierende Faktoren zur Entstehung des Morbus Crohn beitragen.

6. Zusammenfassung

Morbus Crohn ist eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung multifaktorieller Ätiologie. Zur Pathogenese tragen sowohl zahlreiche genetische Faktoren wie auch Umweltfaktoren bei.

Das erste stark mit M. Crohn assoziierte Gen ist das NOD2-Gen im IBD1-Locus auf dem Chromosom 16. Drei Hauptmutationen im NOD2 wurden mit M. Crohn assoziiert (Leu1007fs, R702W und G908R) und diese führen zu einem bis zu 40fach erhöhten Erkrankungsrisiko, wenn sie in homozygoter oder compound-heterozygoter Form auftreten. Das NOD2-Gen codiert für einen intrazellulären Rezeptor, der für die Erkennung von bakteriellem Muramyl-dipeptid (MDP) verantwortlich ist. Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die Mutationen im NOD2 Gen zu einer gestörten NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit MDP führen. Bezüglich der Auswirkung auf die nachgeschaltete Zytokinfreisetzung gibt es unterschiedliche Vorergebnisse: die meisten Arbeiten sprechen für eine „loss of function“, bzw. eine verminderte Zytokinfreisetzung beim Vorhandensein von NOD2-Mutationen, wobei es auch einige Ergebnisse gibt, welche z.B eine vermehrte Freisetzung von unter anderem IL-1beta gezeigt haben (Eckmann, 2005).

In unsere Arbeit wurde die monozytäre mRNA Expression ausgewählter Zytokine, in Abhängigkeit vom NOD2-Genotyp, bei der Stimulation mit MDP untersucht. Als Vergleich wurde eine Stimulation mit LPS, welches als TLR4-Ligand unabhängig vom NOD2 erkannt wird, verwendet.

Hierbei haben wir festgestellt, dass die monozytäre mRNA Expression der Interleukine IL-1beta, IL-10 und IL-12p40 nach Stimulation mit MDP, bei Anwesenheit von zwei mutierten NOD2-Allelen, vermindert ist. Dies war der Fall für alle untersuchten Zytokine. Das Vorhandensein mindestens eines Wildtyp-Allels, ist jedoch für diese Funktion ausreichend.

Weiterhin haben wir festgestellt, dass bei dem Vergleich der 3 Hauptmutationen die Leu1007fs/3020insC Mutation sich am schwerwiegendsten auf die Expression der untersuchten Zytokine nach Kontakt mit MDP auswirkt. Es kam bei Individuen mit 2 mutierten Allelen, von denen mindestens eines die Leu1007fs/3020insC Mutation trug zu einem fast fehlenden Anstieg der Zytokinexpression.

Anhand dieser Ergebnisse können wir die „gain of function“ Theorie (nach Eckmann, 2005), bei der es bei Mutationen im NOD2-Gen zu einem Zuwachs der IL-1beta Expression kommen sollte, nicht

unterstützen. Unsere Ergebnisse unterstützen die sog. „loss of function“ Theorie, da es bei uns zu einer verminderten Expression aller untersuchten Zytokine, IL-1beta, IL-10 und IL-12 bei Mutationen im NOD2-Gen gekommen ist.

Unsere Funde könnten dahingehend interpretiert werden, dass es bei Mutationen im NOD2-Gen mutationsabhängig zu einer verminderten Antwort des angeborenen Immunsystems kommt. Diese könnte zu einer geringeren Fähigkeit des Organismus führen, das mukosale Eindringen von Bakterien in der ersten Phase zu verhindern, und eine Belastung des Körpers durch die Pathogenen selbst oder durch die nachgeschaltete überproportionierte adaptive Immunantwort bewirken. Eine exazerbierte und zeitlich lang anhaltende Entzündungsreaktion der Mukosa, so wie es beim M. Crohn der Fall ist, könnte die Folge dieser gestörten Immunantwort sein.

7. Literaturverzeichnis

Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol*. 2004 Dec 29;14(24):2217-27

Abdi K. IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand J Immunol*. 2002 Jul;56(1):1-11

Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Arditi M. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002a Jun 7;277(23):20431-7.

Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002b Sep;123(3):679-88.

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 Apr;122(4):854-66. Erratum in: *Gastroenterology*. 2003 Jul;125(1):281

Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001 Jun;15(6):731-48

Airoidi I, Gri G, Marshall JD, Corcione A, Facchetti P, Guglielmino R, Trinchieri G, Pistoia V. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):6880-8

Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Lin XY, Zhou Z, Daly M, Katz S, Levine J, Present D, Gelb B, Desnick R, Mayer L, Silver J. The IBD1 locus for susceptibility to Crohn's disease has a greater impact in Ashkenazi Jews with early onset disease. *Am J Gastroenterol*. 2001 Apr;96(4):1127-32

Annese V, Latiano A, Bovio P, Forabosco P, Piepoli A, Lombardi G, Andreoli A, Astegiano M, Gionchetti P, Riegler G, Sturniolo GC, Clementi M, Rappaport E, Fortina P, Devoto M, Gasparini P,

Andriulli A. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus-a GISC study. *Eur J Hum Genet.* 1999 Jul;7(5):567-73.

Annunziato F, Cosmi L, Santarasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th-17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849–61.

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25: 187-191

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; author reply 309

Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. 2004. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun.* 5:417–25

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 2003 Jun;55(2):241-69

Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol.* 1998 Jun 15;160(12):5936-44. Erratum in: *J Immunol* 2000 May 15;164(10):5330

Bacon CM, Petricoin EF 3rd, Ortaldo JR, Rees RC, Larner AC, Johnston JA, O'Shea JJ. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7307-11

Bairead E, Harmon DL, Curtis AM, et al. 2003. Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogenous Irish population. *Eur. J. Hum. Genet.* 11:237–44

Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, et al. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut* 2007;56: 1171–1173.

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005 May 11;21(3):389-95

Barnich N, Hisamatsu T, Aguirre JE, Xavier R, Reinecker HC, Podolsky DK. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):19021-6

Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM 2nd, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology*. 1996 Sep;111(3):573-9

Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest*. 1995 Nov;96(5):2339-47

Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut*. 2003 Jun;52(6):840-6.

Binder V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004 Jun;18(3):463-79

Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Nov;10(6):848-59

Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2003 Feb;124(2):521-36

Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521-33

Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 2006 Mar;55(3):342-7. Epub 2005 Jul 6.

Buning C, Genschel J, Buhner S, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:1073-8.

Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1989 Dec;34(12):1841-54

Camoglio L, Te Velde AA, Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SG. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4: 285-90.

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

Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, Magarry GR, Butler WJ, Eaden JA, Roberts-Thomson IC, Pavli P, Wilson SR, Callen DF. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet*. 2003 Jan;67(Pt 1):35-41.

Cavanaugh JA, Callen DF, Wilson SR, Stanford PM, Sraml ME, Gorska M, Crawford J, Whitmore SA, Shlegel C, Foote S, Kohonen-Corish M, Pavli P. Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet*. 1998 Jul;62(Pt 4):291-8.

Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1992 Apr 3;256(5053):97-100

Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor:

characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med.* 1991 Apr 1;173(4):869-79

Chen, C.M., Gong, Y., Zhang, M., and Chen, J.J. (2004). Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J. Biol.Chem.* 279, 25876–25882.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Merkal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1984 Dec;29(12):1073-9

Cho JH, Abraham C. Inflammatory bowel disease genetics: Nod2. *Annu Rev Med.* 2007a;58:401-16.

Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 23;95(13):7502-7.

Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2007b Oct;133(4):1327-39.

Cho JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev Gastroenterol Disord.* 2003;3 Suppl 1:S18-22.

Chung KF, Patel HJ, Fadlon EJ, Rousell J, Haddad EB, Jose PJ, Mitchell J, Belvisi M. Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br J Pharmacol.* 1999 Jul;127(5):1145-50

Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:277-95

Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med.* 2000. May;67(3):263-8

Croucher PJ, Mascheretti S, Foelsch UR, Hampe J, Schreiber S. Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations. *Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1919-20

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003 Feb 13;421(6924):744-8

Cummings JR, Cooney R, Pathan S, et al. Confirmation of the role of ATG1611 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:941-946.

Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology*. 1998 Nov;115(5):1066-71.

Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 867-874

Dalziel TK. Chronic interstitial enteritis. *Br J Med*. 1913;2:1068-1070

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med*. 1992 Nov 1;176(5):1387-98

Davey MP, Martin TM, Planck SR, Lee J, Zamora D, Rosenbaum JT. Human endothelial cells express NOD2/CARD15 and increase IL-6 secretion in response to muramyl dipeptide. *Microvasc Res*. 2006 Mar;71(2):103-7.

D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology*. 1998 Feb;114(2):262-7

DiGiovine FS, Duff GW. Interleukin 1: the first interleukin. *Immunol Today*. 1990 Jan;11(1):13-20

Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med*. 1984 Nov 29;311(22):1413-8

Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 Jun;19(6):563-73

Dubinsky MC, Wang D, Picornell Y, et al. IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:511–5.

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet*. 2000 Jun;66(6):1857-62. Epub 2000 Apr 3

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461–3

Eckmann L, Karin M. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity*. 2005 Jun;22(6):661-7

Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004 Dec;99(12):2393-404

Edwards DR, Denhardt DT. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1985 Mar;157(1):127-43

Ekbom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet*. 1994 Aug 20;344(8921):508-10

Ekbom A. The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Feb;10 Suppl 1:S32-4

Fantini MC, Monteleone G, Macdonald TT. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Nov;13(11):1419-23.

Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Cherikuri A, O'Toole D, Mahmud N, Keeling PW, Weir DG, Kelleher D. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology*. 2000 Feb;118(2):279-88

Fearnley IM, Carroll J, Shannon RJ, Runswick MJ, Walker JE, Hirst J. GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem*. 2001 Oct 19;276(42):38345-8

Fenton MJ, Clark BD, Collins KL, Webb AC, Rich A, Auron PE. Transcriptional regulation of the human prointerleukin 1 beta gene. *J Immunol*. 1987 Jun 1;138(11):3972-9

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989 Dec 1;170(6):2081-95

Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Loeschke K, Fricke H. Antineutrophil and pancreatic autoantibodies in first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1998 May;33(5):523-8

Folwaczny C, Noehl N, Tschop K, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H. Goblet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology*. 1997 Jul;113(1):101-6

Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in

inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987-992

Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, et al. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 35:2459–70

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4+ lamina propria lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261–70.

Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis.* 2000 Feb

Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, et al. New genes in inflammatory bowel disease: Lessons for complex diseases? *Lancet* 2006;367:1271–84

Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet.* 1994 Mar 26;343(8900):766-7

Gerard CJ, Olsson K, Ramanathan R, Reading C, Hanania EG. Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer Res.* 1998 Sep 1;58(17):3957-64

Ghosh S. Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol Res.* 1999;19(2-3):183-9

Gillessen S, Carvajal D, Ling P, Podlaski FJ, Stremlo DL, Familletti PC, Gubler U, Presky DH, Stern AS, Gately MK. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol.* 1995 Jan;25(1):200-6

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8869-72

Grohmann U, Belladonna ML, Bianchi R, Orabona C, Ayroldi E, Fioretti MC, Puccetti P. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity*. 1998 Sep;9(3):315-23

Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41701-5

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*. 2001b Jun 16;357(9272):1925-8.

Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:

Hampe J, Frenzel H, Mirza MM, Croucher PJ, Cuthbert A, Mascheretti S, Huse K, Platzer M, Bridger S, Meyer B, Nurnberg P, Stokkers P, Krawczak M, Mathew CG, Curran M, Schreiber S. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):321-6.

Hampe J, Lynch NJ, Daniels S, Bridger S, Macpherson AJ, Stokkers P, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2001a Feb;48(2):191-7.

Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet*. 1999a Mar;64(3):808-16.

Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet.* 1999 Dec;65(6):1647-55

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94

Helio T, Halme L, Lappalainen M, et al. 2003. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 52:558–62

Herrlinger K, Fellermann K, Stange EF. Standard therapy of ulcerative colitis. Evidence- and consensus-based recommendations, *Internist (Berl).* 2002 Nov;43(11):1367-8, 1371-5

Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2003 Apr;124(4):993-1000.

Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut.* 2003 May;52(5):759-66

Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, Arnott ID, Satsangi J. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 288-296

Hoffmann RM, Kruis W. Probiotics and prebiotics--a renaissance?. *Internist (Berl).* 2002 Nov;43(11):1400-6

Holtmann M, Mudter J, Galle PR, Neurath MF. [The mucosal immune system. How clear is the pathophysiology?] *Internist (Berl).* 2002 Nov;43(11):1343-4, 1347-53

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 1993 Apr 23;260(5107):547-

Hue S, Ahern P, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives innate and T-cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006;203:2473–83.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, 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 May 31;411(6837):599-603

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996 Feb 29;379(6568):821-3

Hugot JP. [Role of NOD2 gene in Crohn's disease] *Gastroenterol Clin Biol*. 2002;26(1):13-5.

Iinuma H, Nerome K, Yoshioka Y, Okinaga K. 1995. Characteristics of cytotoxic T lymphocytes directed to influenza virus hemagglutinin elicited by immunization with muramyl dipeptide-influenza liposome vaccine. *Scand. J. Immunol.* 41:1–10 in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype/genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1489-1495

Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR Proteins: Role in Host- Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annu Rev Biochem* 2005 Jul;74:355- 83.

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14560-7.

Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*. 2003b May;3(5):371-82.

Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2551-4.

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.* 2003a Feb 21;278(8):5509-12.

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Feb;5(1):76-80.

Isaacs, K.L., and Sartor, R.B. (2004). Treatment of inflammatory bowel disease with antibiotics. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 33, 335–345.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216

Jick H, Walker AM. Cigarette smoking and ulcerative colitis. *N Engl J Med.* 1983 Feb 3;308(5):261-3

Kakazu T, Hara J, Matsumoto T, Nakamura S, Oshitani N, Arakawa T, et al. Type 1 T-helper cell predominance in granulomas of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 2149–55.

Kambe N, Nishikomori R, Kanazawa N. The cytosolic pattern-recognition receptor Nod2 and inflammatory granulomatous disorders. *J Dermatol Sci.* 2005 Aug;39(2):71-80

Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* 2004; 72: 1487-1495

Kobayashi K, Blaser MJ, Brown WR. Immunohistochemical examination for mycobacteria in intestinal tissues from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1989 Apr;96(4):1009-15

Kobayashi K, Brown WR, Brennan PJ, Blaser MJ. Serum antibodies to mycobacterial antigens in active Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1988 Jun;94(6):1404-11

Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature.* 2002 Mar 14;416(6877):194-9

Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005 Feb 4;307(5710):731-4

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989 Sep 1;170(3):827-45

Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G. Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):211-22

Kugathasan S, Loizides A, Babusukumar U, et al. 2005. Comparative phenotypic and CARD15 mutational analysis among African American, Hispanic, and white children with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis*. 11:631-38

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):263-74

Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations

Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003 Jul;125(1):47-57

Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet*. 2001 Mar 1;10(5):445-56

Lee JC, Lennard-Jones JE. Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first-degree relatives. *Gastroenterology*. 1996 Sep;111(3):587-96

Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2-6; discussion 16-9

Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Jun 15;17(12):1465-70.

Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamailard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP, EPWG-IBD Group, EPIMAD Group, GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.* 2002 Apr;70(4):845-57.

Lewis JD, Deren JJ, Lichtenstein GR. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999 Jun;28(2):459-77

Li J, Moran T, Swanson E, Julian C, Harris J, Bonen DK, Hedl M, Nicolae DL, Abraham C, Cho JH. Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Hum Mol Genet.* 2004 Aug 15;13(16):1715-25

Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2004 Mar 1;10(5):620-5

Libioulle C, Louis E, Hansoul S, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of the PTGER4. *PLoS Genet* 2007;3:e58.

Lichtenstein GR, Cuffari C, Kane SV, Hanauer S, Present DH. Maintaining remissions across the lifespan: a roundtable discussion with Crohn's disease experts. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Jul;10 Suppl 2:S11-21

Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ, Kuipers EJ, Wilson JH, de Rooij FW. Card15 and Crohn's disease: healthy homozygous carriers of the 3020insC frameshift mutation. *Am J Gastroenterol.* 2003 Mar;98(3):613-7

Lockhart-Mummery JP. Discussion on ulcerative colitis. *Proc. R. Soc. Med.* 2, 1909, 92 Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2002. Mar;31(1):1-20

Lotz M, Gutle D, Walther S, Menard S, Bogdan C, Hornef MW. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2006;17:973– 84.

Lynch HT, Brand RE, Locker GY. Inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews: implications for familial colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2004;3(3-4):229-32

Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, Dzialo R, Trinchieri G. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*. 1996 Jan 1;183(1):147-57

Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI, Yang H. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 Nov;5(4):271-8

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5071-9

Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1920-5

Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*. 2005 Jun;115(2):153-62

Madsen K. Combining T cells and IL-10: a new therapy for Crohn's disease? *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):2140-4

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 Feb 4;307(5710):734-8. Erratum in: *Science*. 2005 Apr 29;308(5722):633

Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*. 1993 Apr 1;177(4):1199-204

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W, Yang Z; Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2004 Nov 11;351(20):2069-79

McAlindon ME, Hawkey CJ, Mahida YR. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998 Feb;42(2):214-9

McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WO, Jewell DP. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1245-1250

McLaren LC, Gitnick G. Ulcerative colitis and Crohn's disease tissue cytotoxins. *Gastroenterology*. 1982 Jun;82(6):1381-8

Mitchell DN, Rees RJ. Agent transmissible from Crohn's disease tissue. *Lancet*. 1970 Jul 25;2(7665):168-71

Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. 1997 Apr;112(4):1169-78.

Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandroni L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2005 Mar;128(3):687-94

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90

Negoro K, McGovern DP, Kinouchi Y, et al. Analysis of the IBD5 locus and potential gene-gene interactions in Crohn's disease. *Gut* 2003;52:541-546.

Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Girardin SE, Kullberg BJ, van der Meer JW. NOD2 3020insC mutation and the pathogenesis of Crohn's disease: impaired IL-1beta production points to a loss-of-function phenotype. *Neth J Med*. 2005 Sep;63(8):305-8

Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, Drenth JP, Van der Meer JW. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol*. 2004 Jul;34(7):2052-9

Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*. 2007 Apr;149(4):173-86.

Newman B, Silverberg MS, Gu X, Zhang Q, Lazaro A, Steinhart AH, Greenberg GR, Griffiths AM, McLeod RS, Cohen Z, Fernandez-Vina M, Amos CI, Siminovitch K. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2004 Feb;99(2):306-15.

Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007 Nov;133(5):1670-89

Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Ho GT, Tenesa A, Smith L, Anderson N, Arnott ID, Satsangi J. The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 129: 1854-1864

Nuyts S, Van Mellaert L, Lambin P, Anne J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. *J Microbiol Methods*. 2001 Apr;44(3):235-8

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*. 2001a May 31;411(6837):603-6

Ogura Y, Imamura Y, Murakami Y, Takesue Y, Yokoyama T, Sueda T, Hiyama E. Intracellular cytokine patterns of peripheral blood T cells as a useful indicator of activeness of Crohn's disease. *Hiroshima J Med Sci*. 2005 Mar;54(1):1-8

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*. 2001b Feb 16;276(7):4812-8

Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, Zimmermann E, Tretiakova M, Cho JH, Hart J, Greenson JK, Keshav S, Nunez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*. 2003 Nov;52(11):1591-7

Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*. 1996 Oct;5(10):1679-83.

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):715-25

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991 Jan 10;324(2):84-8

Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology*. 2003 Jun;124(7):1866-78.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007; 39:830–832.

Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, Monteleone I, Sebkova L, Doldo P, Luzzza F, Pallone F. Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):7234-9

Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghoois Y, Verbeke G, Baert F, Vermeire S, Vlietinck R, Rutgeerts P. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113: 802-807

Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts P. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology*. 1996 Sep;111(3):597-603

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471–475.

Pena AS. Genetics of inflammatory bowel diseases--past, present, and future. *Dig Dis*. 2003;21(2):85-90

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):779-90

Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, Vermeire S. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1-8

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002 Aug 8;347(6):417-29

Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007;132: 1665–1671.

Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14002-7

Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol.* 2002 Aug;23(8):375-8

Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, et al. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;39:684 –9.

Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94:174–81.

Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000 Jun;278(6):G829-33

Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem.* 1999 Jun 4;274(23):16513-21

Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001;29:223–228.

Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 2000 Jun;66(6):1863-70. Epub 2000 Apr 21

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39:596–604.

Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med.* 1997 Mar 3;185(5):825-31

Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003 Apr;124(4):1001-9

Russel MG, Pastoor CJ, Janssen KM, van Deursen CT, Muris JW, van Wijlick EH, Stockbrugger RW. Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1997;223:88-91

Russell RK, Satsangi J. IBD: A family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:525–39

Sandler RS, Sandler DP, McDonnell CW, Wurzelmann JI. Childhood exposure to environmental tobacco smoke and the risk of ulcerative colitis. *Am J Epidemiol*. 1992 Mar 15;135(6):603-8

Sato T, Nakai T, Tamura N, Okamoto S, Matsuoka K, Sakuraba A, Fukushima T, Uede T, Hibi T. Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. *Gut*. 2005 Sep;54(9):1254-62

Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet*. 1996 Oct;14(2):199-202

Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003;11:175–9.

Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Jan;11(1):16-23

Schreiber S, Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Stoll M, Folsch UR. [Genetics and the environment. Has the picture become clearer?]. *Internist (Berl)*. 2002 Nov;43(11):1335-41

Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet.* 2005 May;6(5):376-88

Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet.* 2002 Jan 5;359(9300):62-9.

Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis.* 2000 May;6(2):107-15

Shi D, Das J, Das G. Inflammatory bowel disease requires the interplay between innate and adaptive immune signals. *Cell Res.* 2006 Jan;16(1):70-4

Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, Li X, Lasota J, LaForgia S, Kelleher K, Huebner K, Wasmuth JJ, Wolf SF. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics.* 1992 Sep;14(1):59-62

Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G, Dinarello CA. IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 6;98(23):13249-54

Silverberg MS, Duerr RH, Brant SR, et al. Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease. *Eur J Hum Genet* 2007;15:328– 335.

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

Simpson SJ, Shah S, Comiskey M, de Jong YP, Wang B, Mizoguchi E, Bhan AK, Terhorst C. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *J Exp Med.* 1998 Apr 20;187(8):1225-34

Singh SB, Davis AS, Taylor GA, et al. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006;313:1438–1441.

Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Schölmerich J, Reinisch W; European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006 Mar;55 Suppl 1:i1-15.

Staples KJ, Bergmann M, Barnes PJ, Newton R. Stimulus-specific inhibition of IL-5 by cAMP-elevating agents and IL-10 reveals differential mechanisms of action. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 14;273(3):811-5. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Aug 28;275(2):713

Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T-cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139–45.

Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLADR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45: 395-401

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36: 476-480

Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jan;6(1):9-20

Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*. 1997 Mar 3;185(5):817-24

Takaesu, G., Surabhi, R.M., Park, K.J., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Gaynor, R.B. (2003). TAK1 is critical for I κ B kinase-mediated activation of the NF- κ B pathway. *J. Mol. Biol.* 326, 105– 115.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992 Apr 30;356(6372):768-74

Todate A, Suda T, Kuwata H, et al. 2001. Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 70:723–29

Torok 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 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003 Feb;3(2):133-46

Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol.* 1998;16(3-4):365-96

Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut.* 1988 Jul;29(7):990-6

Van Assche G. Emerging drugs to treat Crohn's disease. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2007;12:49 –59.

Van der Poll T, Jansen J, Levi M, ten Cate H, ten Cate JW, van Deventer SJ. Regulation of interleukin 10 release by tumor necrosis factor in humans and chimpanzees. *J Exp Med.* 1994 Nov 1;180(5):1985-8

Van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, McGovern DP, Onnie C, Negoro K, Goldthorpe S, Foxwell BM, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet.* 2005 May 21-27;365(9473):1794-6

Van Limbergen JE, Russell RK, Nimmo ER, et al. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut* 2007;56:1173–4.

Vara DS, Punshon G, Sales KM, Salacinski HJ, Dijk S, Brown RA, Hamilton G, Seifalian AM. Development of an RNA isolation procedure for the characterisation of human endothelial cell interactions with polyurethane cardiovascular bypass grafts. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(18):3987-93

Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Belaiche J, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Vlietinck R, Merlin F, Zouali H, Thomas G, Colombel JF, Hugot JP; Belgian Group of Infliximab Expanded Access Program and Fondation Jean Dausset CEPH, Paris, France. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002c Jul;123(1):106-11.

Vidal V, Dewulf J, Bahr GM. 2001. Enhanced maturation and functional capacity of monocyte-derived immature dendritic cells by the synthetic immunomodulator Murabutide. *Immunology* 103:479–87

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: 1421-1427

Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, Pounder RE. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol*. 1993 Apr;39(4):345-53

Wang D, Sadee W. Searching for polymorphisms that affect gene expression and mRNA processing: example ABCB1 (MDR1). *AAPS J* 2006; 8: E515-E520

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 Aug;5(8):800-8

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004 Nov;53(11):1658-64

Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. 1980 Sep;32(5):651-62

Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661–678.

Wilks S, Morton W. *Lectures on Pathological Anatomy*, 2nd ED. Lindsay and Blakiston, PA, USA, 1875, 408-409

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 1999 May 15;270(1):41-9

Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 1997 Jan;22(1):176-81

Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):427-34

Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutino T, Rodriguez-Perez JM, Villarreal-Garza C, Granados J. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003; 64: 119-123

Yamamoto-Furusho JK. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007 Nov 14;13(42):5594-7

Yamamoto-Furusho JK. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2007 Apr 7;13(13):1893-6.

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet* 2004; 49: 664-668

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet.* 2002;47(9):469-72. Erratum in: *J Hum Genet.* 2003;48(7):397.

Yoo, N.J., Park, W.S., Kim, S.Y., Reed, J.C., Son, S.G., Lee, J.Y., and Lee, S.H. (2002). Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 β processing through the interaction with pro-caspase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 652–658.

Yoon, C., Johnston, S.C., Tang, J., Stahl, M., Tobin, J.F., Somers, W.S. Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12. *EMBO J.* v19 pp.3530-3541, 2000. Jul 17;19(14):3530-41.

Yoon, S.I., Logsdon, N.J., Sheikh, F., Donnelly, R.P., Walter, M.R. Conformational changes mediate IL-10R2 binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J.Biol.Chem.*, 2006. Nov 17; 281(46):35088-96. Epub 2006 Sep 18.

Zhang J, Yang J, Roy SK, Tininini S, Hu J, Bromberg JF, Poli V, Stark GR, Kalvakolanu DV. The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 5;100(16):9342-7

Zhang M, Gong J, Presky DH, Xue W, Barnes PF. Expression of the IL-12 receptor beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. *J Immunol.* 1999 Feb 15;162(4):2441-7

Zhou M, Zhang XQ, Shi ZD, Cao YC. [Cloning and sequencing of prolactin gene cDNA in three chicken breeds] *Yi Chuan Xue Bao.* 2001;28(7):614-20

8. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Folwaczny für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Dafür, dass ich Teil des Teams sein durfte und dass es dazu die Möglichkeiten gab.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Török für die geistige und besonders die wissenschaftliche Stütze bedanken, die immer und sehr engagiert für mich und meine Arbeit da war.

Besonderen Dank gilt „Papa und Mama“ Lohse für den Teil meiner Arbeit Großhadern. Ohne deren Hilfe ich nicht ansatzweise fertig geworden wäre.

Und abschließend möchte ich Herrn Tonenchi für seine Hilfe, moralisch und psychologisch, während der Zeit meiner Mitarbeit im Labor danken. Merci!

9. Lebenslauf

KONTAKTADRESSE

Schubertstr. 5
D – 83395 Freilassing
Tel: +49 (0)86545894455
Mobil: +49 (0)162 3587081
E-Mail: sebastian.cotofana@pmu.ac.at



PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 24.12.1981
Geburtsort: Hermannstadt (Sibiu/Rumänien)
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch

STUDIUM / SCHULAUSSBILDUNG

Seit 06/2008 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Anatomie und Muskuloskelettale Forschung an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg/Austria

04/2002 05/2008 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Note: 2,5)

06/2004 – 07/2008 Doktorarbeit im Bereich der molekularen Genetik
Thema: „Untersuchungen monozytären Zytokinexpressionsmuster beim Morbus Crohn in Abhängigkeit des CARD15/NOD2-Genotyp“ an der chirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU-München-Innenstadt Abt.Chirurgie (Prof. Dr. med. C. Folwaczny)

03/2004 Physikum (Note: 3,3)

09/1994 – 07/2001 Asam-Gymnasium, München
Abschluss: Abitur (Note: 2,2)

09/1993 – 07/1994 Gymnasium Dorfen

09/1991 – 17/1993 Grundschule Moosen/Vils

09/1990 – 07/1991 Ludwig-Thoma Grundschule München

09/1988 – 07/1990 Staatliche Grundschule Hermannstadt (Rumänien)

PRAKTIKA

02/2007 – 01/2008 Praktisches Jahr
1.Tertial: Unfall-, Viszeral-, Gefäßchirurgie/Kreisklinik Altötting
2.Tertial: Anästhesie-, Intensiv-, Transfusionsmedizin/Klinikum Garmisch-Partenkirchen
3.Tertial: Kardio- und Pulmonologie/Klinikum Ingolstadt

10/2006 – 11/2006 Famulatur in der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Jichidai/Japan

09/2006 – 10/2006	Famulatur in der Notaufnahme des Pretoria Academic Hospital in Pretoria/Südafrika
03/2006 – 04/2006	Famulatur in der radiologischen Abteilung der Polyklinik LMU-München-Innenstadt
03/2005 – 04/2005	Famulatur in der staatlichen Klinik für Geburtsheilkunde und Gynäkologie in Ploiesti/Rumänien
07/2002 – 08/2002	Praktikum in der Viszeralchirurgie in der Erler-Klinik in Fürth (PD. Dr. med. B. Eibel-Eibesfeld)

SPORTLICHE AKTIVITÄTEN

Seit 03/1998	Lizenzierter Radrennsport und Teilnahme an Amateurradrennen Trainer C im Bereich Radsport
2000 – 2004	Mitglied der Seniorenauswahl des ERSC Ottobrunn für Eisschnelllauf
1998 – 1999	Mitglied Bayernauswahl MTB
1994 – 1998	Mitglied der Skirennmannschaft des TSV 1860 München

SONSTIGE TÄTIGKEITEN

09/2004 – 11/2004	Co-Assistent im Kursus der Makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)
2003 - 2004	Übungsleiter der Jugendmannschaft für Eisschnelllauf im ERSC Ottobrunn
2001 - 2003	Übungsleiter der Jugendmannschaft für Radsport im TSV Forstenried
07/2001 – 04/2002	Zivildienstleistender im Krankenhaus München Schwabing Abt. Internistische Intensivstation der pädiatrischen Klinik (PD. Dr. med. J. Peters)
09/1998 – 07/1999	Schülersprecher am Asam-Gymnasium, München

SPRACHKENNTNISSE

Deutsch	Muttersprache
Rumänisch	Muttersprache
Englisch	Verhandlungssicher
Latein	Grundkenntnisse

EDV-KENNTNISSE

Sicherer Umgang mit Word, Excel, Powerpoint, SPSS, Internet

INTERESSEN

Radsport, Skilanglauf, Kunst und Kultur