

**Die Bedeutung der KIR-Rezeptoren bei Morbus Crohn
und Colitis ulcerosa**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Huber, Johanna Franziska

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. F. Graepler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	6
1.1.1 Definition, Klinik, Komplikationen, Klassifikation und Therapie	6
1.1.1.1 Morbus Crohn	6
1.1.1.2 Colitis ulcerosa	8
1.1.2 Epidemiologie	13
1.1.3 Ätiologie	14
1.1.3.1 Genetik	14
1.1.3.2 Umweltfaktoren	15
1.1.3.3 Immunologische Vorgänge in der Pathogenese	17
1.2 KIR-System auf natürlichen Killerzellen als Teil des Immunsystems	21
1.2.1 Natürliche Killerzellen	21
1.2.2 Regulation der natürlichen Killerzellen über Rezeptoren und Zytokine	22
1.2.3 KIR-Rezeptoren	23
1.2.4 KIR-Liganden	25
1.2.5 <i>KIR</i> -Haplotypen	26
1.2.6 <i>KIR</i> und Krankheit	28
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	30
2 Proben, Material und Methoden	31
2.1 Proben	31
2.1.1 Ethikvotum	31
2.1.2 Studienteilnehmer	31
2.1.3 DNA-Proben	32
2.2 Material	32
2.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits	32
2.2.1.1 Real-Time PCR	32
2.2.1.2 Gelelektrophorese	33

2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	33
2.2.2.1 Real-Time PCR.....	33
2.2.2.2 Gelelektrophorese	34
2.3 Methoden.....	35
2.3.1 Real-Time PCR	35
2.3.2 Gelelektrophorese.....	39
2.4 Software und Statistik	40
3 Ergebnisse.....	41
3.1 Ergebnisse der Real-Time PCR.....	41
3.2 Ergebnisse der Gelelektrophorese	44
3.3 Ergebnisse der <i>KIR</i> -Genotypisierung	45
3.4 Darstellung der Kohorten Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Kontrollgruppe	46
3.4.1 Altersverteilung der Kohorten.....	48
3.4.2 Geschlechterverteilung der Kohorten	49
3.4.3 Einteilung der Morbus Crohn-Patienten nach der Montreal- Klassifikation	51
3.4.3.1 Krankheitslokalisierung	51
3.4.3.2 Befallsmuster	52
3.5 Ermittlung des <i>KIR</i> -Haplotyps und des <i>B-Content-Scores</i>	53
3.6 Vergleich der 17 <i>KIR</i> -Gene bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung mit gesunden Personen	55
3.6.1 Vergleich der <i>KIR</i> -Gene bei Morbus Crohn versus Kontrollgruppe ..	56
3.6.2 Vergleich der <i>KIR</i> -Gene bei Morbus Crohn des Kolons versus Kontrollgruppe.....	59
3.6.3 Vergleich der <i>KIR</i> -Gene bei Morbus Crohn des Dünndarms (Ileum und Ileokolon) versus Kontrollgruppe	62
3.6.4 Vergleich der <i>KIR</i> -Gene bei Morbus Crohn ohne Komplikationen versus Kontrollgruppe	65
3.6.5 Vergleich der <i>KIR</i> -Gene bei Morbus Crohn mit Strikturen versus Kontrollgruppe.....	68
3.6.6 Vergleich der <i>KIR</i> -Gene bei Morbus Crohn mit Penetrationen versus Kontrollgruppe.....	71
3.6.7 Vergleich der <i>KIR</i> -Gene bei Colitis ulcerosa versus Kontrollgruppe	74
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse	77

4 Diskussion	78
4.1 Kritische Beurteilung des angewandten Studiendesigns	78
4.2 <i>KIR</i> -Genotypisierung mittels Real-Time PCR	79
4.3 Vergleich der <i>KIR</i> -Gen-Häufigkeiten mit der „ <i>Allele Frequency Net-Database</i> “	81
4.4 Abgleich der demografischen Patientendaten mit Daten aus der Literatur	83
4.5 Ergebnisse der univariaten Analysen der <i>KIR</i> -Profile zwischen CED-Patienten und gesunden Kontrollpersonen	84
4.6 Die Rolle und mögliche Relevanz von natürlichen Killerzellen und <i>KIR</i> in der Pathogenese von CED	88
4.7 Schlussfolgerungen	92
4.8 Konsequenzen, Ausblicke und Ansätze für mögliche weiterführende Experimente und Studien.....	92
5 Zusammenfassung.....	94
6 Literaturverzeichnis	96
7 Abbildungsverzeichnis	118
8 Tabellenverzeichnis	119
Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
BC-Score	<i>B-Content-Score</i>
bp	Basenpaar
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CU	Colitis ulcerosa
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HLA	<i>human leukocyte-antigen</i>
<i>HLA</i>	Gen des <i>human leukocyte-antigen</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKP	Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie
IL	Interleukin
ITAM	<i>immune-receptor-tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immune-receptor-tyrosine-based inhibitory motif</i>
JAK	Januskinase
kb	Kilobasen
KG	Kontrollgruppe
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like-receptor</i>
<i>KIR</i>	Gen des <i>killer cell immunoglobulin-like-receptor</i>
KI	Konfidenzintervall
MC	Morbus Crohn
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	<i>NOD-like Rezeptor</i>
<i>NOD</i>	<i>nukleotide-binding oligomerization domain</i>

OR	Odds-Ratio
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
SSO	Sequenz-spezifische Oligonukleotide
SSP	Sequenz-spezifische Primer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind die beiden Hauptvertreter der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)¹. Beide Erkrankungen befallen vorwiegend den Gastrointestinaltrakt, können aber prinzipiell jedes Organ betreffen. Dabei liegt der Großteil der Betroffenen im Kindes- und jungen Erwachsenenalter. Die Inzidenz und Prävalenz dieser CED haben in den letzten Jahrzehnten zugenommen, was eine Intensivierung der Erforschung ihrer Ursachen erforderlich macht².

1.1.1 Definition, Klinik, Komplikationen, Klassifikation und Therapie

1.1.1.1 Morbus Crohn

Der MC ist eine diskontinuierlich und segmental auftretende Entzündung des Gastrointestinaltraktes. Am häufigsten sind das terminale Ileum (daher auch „Ileitis terminalis“) und das proximale Kolon betroffen. Es kann, wie in Abbildung 1 gezeigt, jedoch der gesamte Trakt vom Mund bis zum Anus befallen sein³.

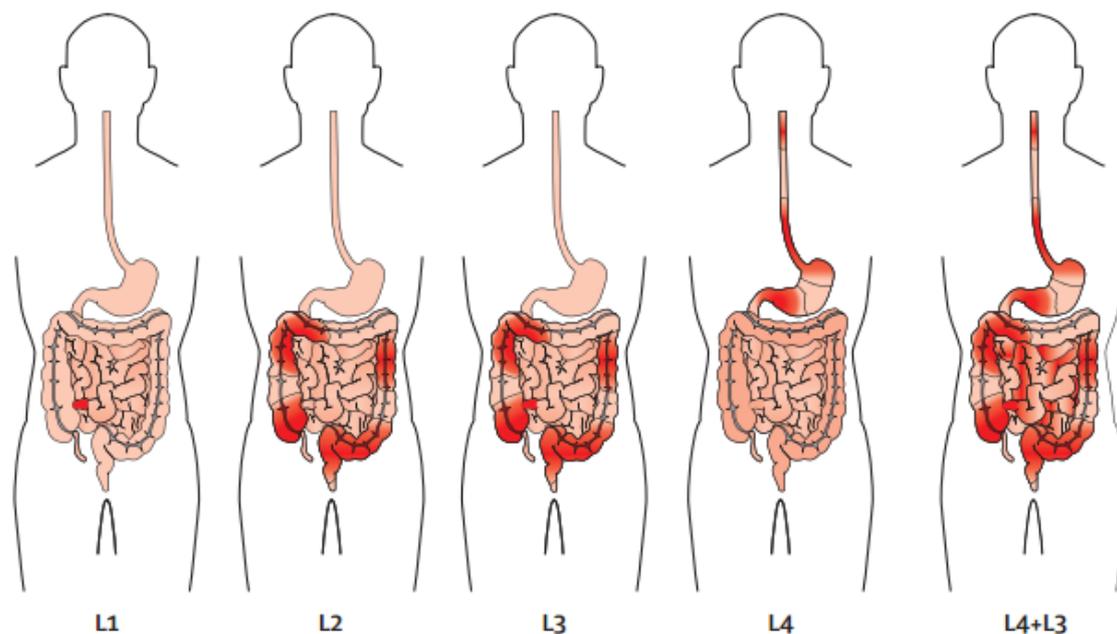


Abbildung 1: Die verschiedenen anatomischen Lokalisationen bei Morbus Crohn (Mund bis Anus): L1=terminales Ileum, L2=Kolon, L3=Ileokolon, L4=oberer Gastrointestinaltrakt, L4+L3=oberer Gastrointestinaltrakt und distaler Befall aus⁴

Makroskopisch findet sich eine transmurale Entzündung mit ödematösen und fibrotischen Verdickungen der Darmwand. Weitere Charakteristika sind aphthoide Läsionen, lineare, scharf begrenzte Ulzera („Schnecken Spuren“) und kleine Schleimhauteinblutungen (*pin-point lesions*). Es entsteht das typische Bild des sogenannten „Pflastersteinreliefs“^{3, 5}.

Diese entzündlichen Prozesse lassen sich gut in einer endoskopischen Untersuchung darstellen, wie in Abbildung 2 zu erkennen ist.

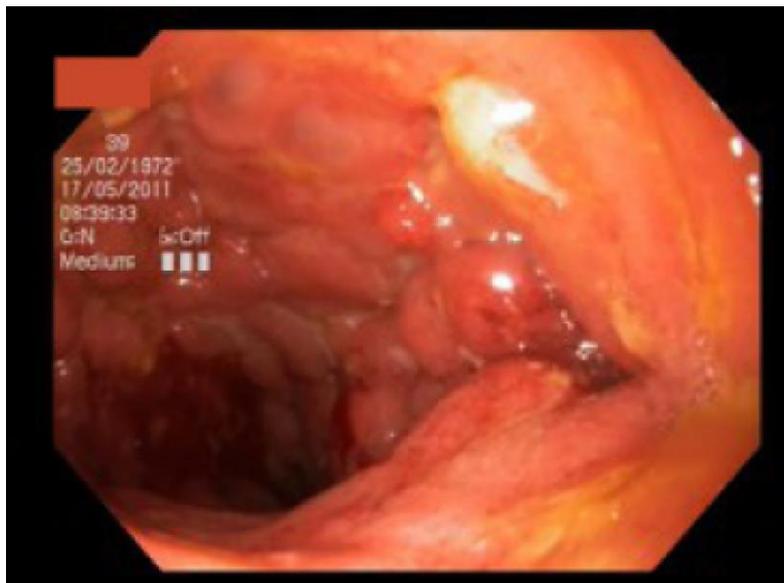


Abbildung 2: Endoskopisches Bild des terminalen Ileums bei Morbus Crohn mit Schwellung der Schleimhaut und charakteristischem Pflastersteinrelief aus⁶ (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Rössle)

Histologisch sind Epitheloidzellgranulome (in 40 %) und mehrkernige Riesenzellen zu finden. Meist kommt es zu einer Hyperplasie der zugehörigen Lymphknoten (bei 70 %). Es können sich eine Lymphangiektasie sowie aphthenähnliche Geschwüre der Schleimhaut mit Fissuren und Fisteln bilden³.

Aufgrund des unterschiedlichen Befallsmusters kann die Klinik des MC sehr vielfältig sein. Die häufigsten Symptome sind chronische, d. h. mindestens sechs Wochen andauernde, Durchfälle (meist ohne Blut), Abdominalschmerzen und/oder Gewichtsverlust. Die kolikartigen Schmerzen sind oft im rechten Unterbauch lokalisiert und lassen sich teilweise nur schwer von einer Appendizitis unterscheiden. Bei starkem Befall des terminalen Ileums kann eine druckschmerzhaft Resistenz getastet werden. Darüber hinaus sind häufig systemische Symptome, wie Abgeschlagenheit und Fieber zu beobachten.

Bei Kindern kann es zu Dystrophie, Gedeihstörungen und Wachstumsverzögerungen kommen^{3,7}.

Mögliche Komplikationen sind Fisteln, anorektale Abszesse und segmentale Darmstenosen mit konsekutivem Ileus und gelegentlich Perforationen. Im späteren Verlauf kann es sehr selten zur Ausbildung einer Amyloidose kommen. Außerdem ist das Risiko für frühe Dünndarmkarzinome und Kolonkarzinome erhöht^{3,8,9}.

1.1.1.2 Colitis ulcerosa

Die CU breitet sich im Gegensatz zum MC vom distalen Rektum ausgehend kontinuierlich nach proximal aus³. Neben dem üblichen Kolonbefall ist eine Beteiligung des terminalen Ileums möglich. Man spricht hier von einer „Backwash-Ileitis“¹⁰. Die Entzündung ist auf die oberflächliche Schleimhaut begrenzt. Die Kolonschleimhaut ist gerötet und geschwollen. Neben Kontaktblutungen können kleine Schleimhautulzera mit Fibrinbelägen entstehen (siehe Abbildung 3)³.



Abbildung 3: Endoskopisches Bild der Colitis ulcerosa mit oberflächlichen Erosionen und Schleimhautblutungen aus¹¹ (mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Klaus)

In der Histologie sind sogenannte „Kryptenabszesse“ (Granulozyteninfiltrate der Schleimhaut mit Eiter in den Krypten) typisch. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zur zunehmenden Schleimhautzerstörung mit Verlust des normalen Faltenreliefs. Die restlichen Schleimhautinseln bilden sogenannte „Pseudopolypen“. Es kommt zur Infiltration von Lymphozyten und Histozyten mit Schleimhautatrophie und –dysplasie (DALM= *dysplasia associated lesion or mass*), der Vorstufe einer karzinomatösen Entartung³.

Die Symptomatik der CU ist der des MC sehr ähnlich. Die Durchfälle sind häufiger blutig und schleimig, es tritt jedoch seltener ein Gewichtsverlust auf¹².

Typische Komplikationen sind das toxische Megakolon und massive Blutungen. Eine seltene Spätkomplikation ist auch hier die Amyloidose. Zudem haben Patienten mit CU ein nachgewiesen erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome. Falls es zum Auftreten einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) kommt, ist auch das Risiko für das cholangiozelluläre Karzinom erhöht^{3, 9, 13}.

Beide Erkrankungen verlaufen meist schubweise, wobei die Rezidivhäufigkeit mit der Krankheitsdauer zunimmt. Bei einer Persistenz der Symptome über sechs Monate spricht man von einem chronisch aktiven Verlauf³.

Sowohl MC als auch CU können außerhalb des Darmes weitere Organe befallen, sogenannte extraintestinale Manifestationen. Diese treten mit einer Häufigkeit von 6 % bis 47 % auf¹⁴.

Es kann fast jedes Organsystem betroffen sein¹⁵. Am häufigsten betroffen sind die Haut (Zinkmangeldermatosen, Aphthen, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum u. a.), Augen (Episkleritis, Iritis, Uveitis, Keratitis u. a.), Gelenke (Arthritis, ankylosierende Spondylitis, meist *human leukocyte antigen (HLA)-B27* positiv) und Gallengänge (PSC).

Die ersten drei genannten treten häufiger bei MC auf. PSC wird hingegen häufiger im Zusammenhang mit CU beobachtet^{3, 15}.

Die häufigsten extraintestinalen Manifestationen sind in Abbildung 4 dargestellt.

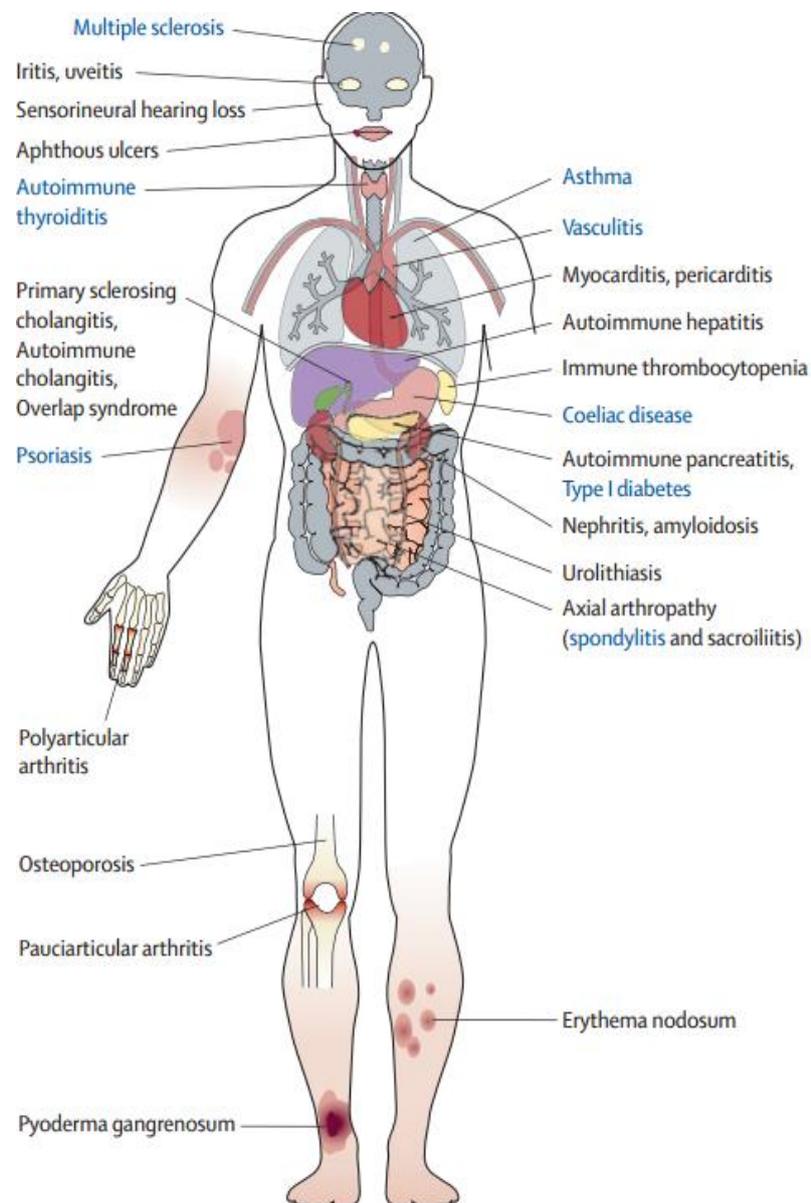


Abbildung 4: Extraintestinale Manifestationen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und assoziierte Autoimmunerkrankungen (blau) aus⁴

Die Diagnose des MC und der CU wird aufgrund charakteristischer Nachweise aus klinischen, laborchemischen, endoskopischen, histologischen und radiologischen Untersuchungen gestellt^{7, 12}.

Nach der Diagnosestellung sollten die Patienten nach definierten Kriterien in Subgruppen unterteilt werden. Dies ist besonders für die Wahl der geeigneten Therapie und die Einschätzung der Prognose entscheidend.

Für den MC wurde hierfür 1998 im Rahmen des "World Congress of Gastroenterology" die sogenannte Wiener-Klassifikation entworfen, welche die Erkrankung nach den Hauptkriterien Erkrankungsalter (A), anatomische Lokalisation (L) und Krankheitsverlauf/Befallsmuster (B) einteilte. Diese wurde 2005 in der noch aktuellen Montreal-Klassifikation überarbeitet.

Darüber hinaus wurde eine Einteilung für die CU entworfen. Diese enthält die möglichen Krankheitsausdehnungen (E1-E3) sowie die Krankheitsschwere (S0-S3). Eine Übersicht ist in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet¹⁶⁻¹⁸.

Tabelle 1: Klassifikation des Morbus Crohn nach Wien und Montreal im Vergleich aus¹⁶⁻¹⁸

	Wiener-Klassifikation	Montreal-Klassifikation
Alter bei Erstdiagnose	A1 < 40 Jahre	A1 < 16 Jahre
	A2 > 40 Jahre	A2 zwischen 17 und 40 Jahren
		A3 > 40 Jahre
Lokalisation	L1 Ileum	L1 Ileum
	L2 Kolon	L2 Kolon
	L3 Ileum und Kolon	L3 Ileum und Kolon
	L4 oberer Gastrointestinaltrakt	L4 isoliert oberer Gastrointestinaltrakt
Befallsmuster	B1 nicht strikturierend, nicht penetrierend	B1 nicht strikturierend, nicht penetrierend
	B2 strikturierend	B2 strikturierend
	B3 penetrierend	B3 penetrierend
		p perianale Beteiligung

Tabelle 2: Klassifikation der Colitis ulcerosa (CU) nach Montreal aus^{17, 18}

Montreal-Klassifikation für die Krankheitsausdehnung der CU	
Krankheitsausdehnung (E)	
E1	ulzerierende Proktitis
E2	Linksseitenkolitis (distale CU)
E3	extensive CU (Pankolitis)
Montreal-Klassifikation für die Schwere der CU	
Krankheitsschwere (S)	
S0	klinische Remission
S1	milde CU
S2	moderate CU
S3	schwere CU

Die Therapie der CED richtet sich am Patienten individuell aus. Sie beinhaltet eine Anpassung des Lebensstils (bsp. Nikotinabstinenz) sowie die Möglichkeiten einer medikamentösen Behandlung (Steroide, 5-Aminosalicylate, Antibiotika, Immunsuppressiva, Biologika) oder bei fortgeschrittener Erkrankung die operative Therapie.

Während die CU durch eine Proktokolektomie geheilt werden kann, ermöglichen alle weiteren Therapiemaßnahmen nach momentanem Forschungsstand lediglich eine Verbesserung der Symptomatik^{1, 3}.

1.1.2 Epidemiologie

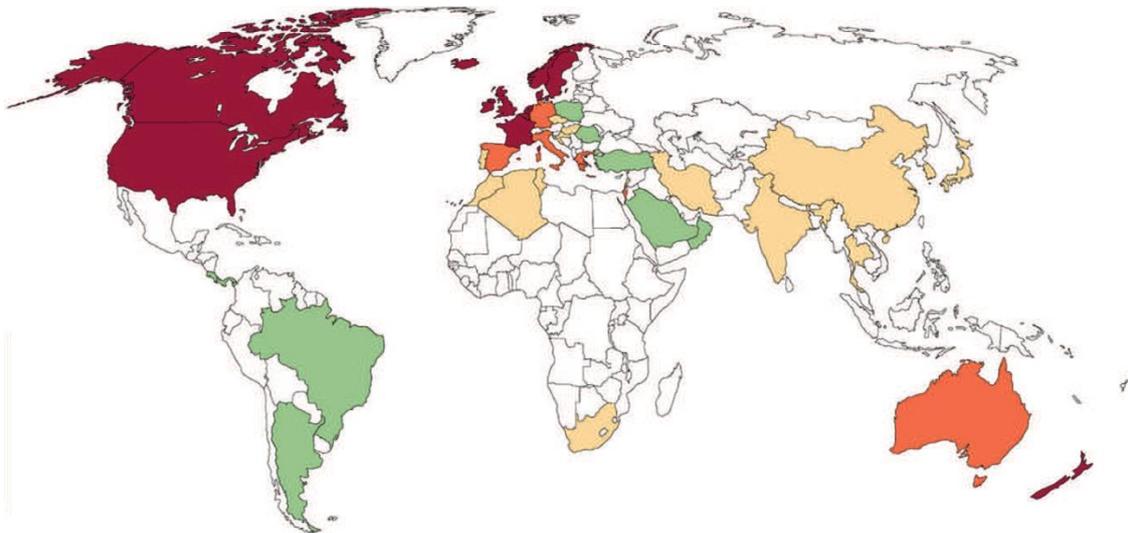


Abbildung 5: Epidemiologie von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn: weltweit unterschiedliches Auftreten, Rot=jährliche Inzidenz $>10/10^5$, Orange=jährliche Inzidenz $5-10/10^5$, Grün=jährliche Inzidenz $<4/10^5$, Gelb=niedrige Inzidenz mit kontinuierlichem Wachstum aus¹⁹

Das Auftreten der CED variiert weltweit (siehe Abbildung 5). Mit Ausnahme von Canada, Australien und einigen Ländern in Europa tritt die CU häufiger auf als der MC¹⁹⁻²¹. Die höchsten Inzidenzen und Prävalenzen haben Nordamerika und Nordeuropa. Im Süden und Osten, vor allem in Entwicklungsländern, sind die Raten niedriger²⁰.

Die höchsten Inzidenzen und Prävalenzen von CU und MC aus dem vor kurzem veröffentlichten *Review* zu populationsbasierten Studien²⁰ sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Die weltweit höchsten Inzidenzen und Prävalenzen von Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) nach²⁰

Land/Kontinent	Inzidenz CU (pro 100.000/ Jahr)	Inzidenz MC (pro 100.000/ Jahr)	Prävalenz CU (pro 100.000)	Prävalenz MC (pro 100.000)
Canada	19,2	20,2	248	319
Nordeuropa	24,3	10,6	505	322
Australien	17,4	29,3		

In Deutschland liegen die zuletzt angegebenen Inzidenzen bei 3.0-3.9/100.000 für CU und 5.2-6.6/100.000 für MC^{22, 23}. Die Erkrankungsraten steigen in allen ethnischen Gruppen²⁰.

Mit Ausnahmen weniger Studien^{24, 25} ist weltweit ein Nord-Süd-, West-Ost- und Stadt-Land-Gefälle zu beobachten²⁶, wobei sich die geografischen Unterschiede allmählich angleichen²⁰.

Der Altersgipfel liegt bei MC zwischen 20-30 Jahren und bei CU zwischen 30-40 Jahren. Einige Studien berichten von einem zweiten Häufigkeitsgipfel der beiden Erkrankungen zwischen 60-70 Jahren¹⁹.

Bezüglich der Geschlechterverteilung sind die Aussagen in verschiedenen Studien (Zusammenfassung in Molodecky *et al.* 2012) sehr kontrovers, sodass von keinem Geschlechterunterschied auszugehen ist²⁰.

1.1.3 Ätiologie

Die genaue Ursache von CED ist bisher ungeklärt. Daher gibt es noch keine kausale Therapie für die Patienten^{27, 28}. Aktuell geht man von einem multimodalen Zusammenspiel von genetischen, immunologischen und äußeren Umweltfaktoren aus. Vermutlich resultiert die chronische Entzündung bei genetisch prädisponierten Individuen aus einer inadäquaten Immunantwort auf die Darmflora^{1, 29-31}.

1.1.3.1 Genetik

Der genetische Einfluss auf CED ist einer der am häufigsten untersuchten Faktoren.

Beobachtete familiäre Häufungen und große Zwillingskonkordanzstudien weisen auf eine genetische Komponente hin³²⁻³⁴. Außerdem wurde gezeigt, dass bestimmte Bevölkerungsgruppen, vor allem Ashkenazi-Juden, zwei- bis viermal häufiger an CED erkranken als andere ethnische Gruppen und zwar unabhängig ihrer geografischen Lokalisation, was ebenfalls auf die genetische Bedeutung hindeutet³⁵⁻³⁷.

Es wurde ein stärkerer genetischer Einfluss bei MC als bei CU beobachtet³⁸. Verglichen mit der Allgemeinbevölkerung haben Verwandte ersten Grades ein zehnfach erhöhtes Risiko an CED zu erkranken³³. Bis Ende 2012 wurden bisher 163 Suszeptibilitätsgene für MC und CU identifiziert³⁹⁻⁴¹.

Die meisten Gene spielen auch bei anderen entzündlichen immunvermittelten Erkrankungen, am deutlichsten bei der ankylosierenden Spondylitis, bei der Psoriasis und dem Diabetes mellitus Typ I eine Rolle⁴¹.

Bedeutende Genregionen umfassen die *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD2)*, Autophagiegene (*ATG16L1*) und Komponenten des Interleukin (IL) 23-T-Zellen Weges (*IL23R, JAK2, STAT3, p40*)¹.

Das erste mit CED, speziell mit MC assoziierte Gen, das *NOD2*-Gen, später als *caspase activating recruitment domain (CARD) 15* bezeichnet, wurde erstmals 2001 beschrieben^{42, 43}.

Neben einem erhöhtem Krankheitsauftreten konnte für *NOD2*- und Januskinase (*JAK*)-Mutationen auch eine Assoziation zur Krankheitsschwere hergestellt werden⁴⁴.

Die deutlichste Verbindung zu CU konnte in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) mit der *major histokompatibility complex (MHC) class II Region* nahe *HLA-DRA* beobachtet werden¹.

Selbst durch diese beachtliche Anzahl an bekannten Genorten kann nur ein geringer Anteil der Heredität (ca. 20 %) der CED erklärt werden. Es konnte weder für MC noch für CU ein einfacher Erbgang nachgewiesen werden, was die genetische Komplexität unterstreicht und die Beteiligung weiterer Faktoren an der Krankheitsentstehung erfordert^{4, 41}.

1.1.3.2 Umweltfaktoren

Die schnelle Zunahme der Inzidenzen der CED, das erhöhte Krankheitsrisiko des erstgeborenen Zwillings sowie hohe Diskonkordanzraten geben Hinweise auf die bedeutende Rolle umweltbedingter Triggerfaktoren neben genetischen Faktoren in der Entstehung der CED^{35, 38, 45}.

Neben den regionalen Nord-Süd- und West-Ost-Gefällen fallen ebenfalls erhöhte Inzidenzen in Städten verglichen mit ländlichen Regionen und in wirtschaftlich entwickelten Gegenden (Canada, USA, Westeuropa) gegenüber Entwicklungsländern (Indien, China) auf²⁰.

Mit zunehmender Industrialisierung bisher weniger betroffener Länder steigen die Inzidenzraten auch dort an⁴⁶⁻⁴⁸. Als mögliche Erklärung für diese nicht mehr rein geografisch erklärbaren Veränderungen, wird eine Veränderung in den Lebensgewohnheiten dieser Bevölkerungsgruppen genannt. Verbesserte Hygieneverhältnisse sind verbunden mit einer geringeren Keimexposition im Kindesalter und weniger durchgemachten Infektionen. Entsprechend dieser „Hygienehypothese“ könnte eine inadäquate Immunantwort bei späterer Exposition gegenüber Mikroorganismen entstehen⁴⁹⁻⁵¹.

Ein weiterer häufig untersuchter Faktor ist das Rauchen. Frühes Rauchen steigert signifikant das Auftreten von MC. Bei CU hingegen scheint Rauchen protektiv zu wirken⁵²⁻⁵⁵.

Ein gehäuftes Auftreten von MC und CU wurde nach bakteriellen gastrointestinalen Infektionen beobachtet. Es wird vermutet, dass akute intestinale Infektionen die Darmflora verändern könnten und dadurch den Beginn der CED triggern^{56, 57}. Bei MC wurde eine Dysbiose der mukosalen Darmflora und eine erhöhte Anzahl intramukosaler Bakterien, vor allem adhäsiver Spezies, berichtet^{58, 59}.

Insgesamt können einige Umweltfaktoren aufgezeigt werden, jedoch konnte bisher der genaue Mechanismus, wie diese Faktoren bei der Entstehung der CED interagieren und inwieweit einige Faktoren eher krankheitsmodulierend wirken, nicht herausgefunden werden.

1.1.3.3 Immunologische Vorgänge in der Pathogenese

Eine wichtige Rolle in der Entstehung der CED spielt die Interaktion des angeborenen und erworbenen intestinalen Immunsystems mit der vorherrschenden Darmflora.

Mikrobiota

Den menschlichen Darm besiedeln vorwiegend die vier Bakterienstämme Bacteroides, Firmicutes, Actinobacteria und Proteobacteria, bestehend aus 50-100 Bakterienspezies. Diese unterstützen u. a. die Verdauung und modulieren die mukosale Immunabwehr⁶⁰. Die Verteilung und Zusammensetzung variieren individuell, alters- und nahrungsabhängig⁶¹⁻⁶³. Bei MC und zum Teil bei CU wurde ein Verlust der Vielfalt und eine Häufung bestimmter Stämme, besonders der Firmicutes- und Bacteroidesstämme beobachtet⁶⁴. Der Einfluss nicht-pathogener Keime wird auch im Tiermodell ersichtlich, bei dem gentechnisch veränderte Tiere nach der Kolonisation mit kommensalen Darmkeimen eine chronische Darmentzündung entwickeln, aber unter keimfreien Bedingungen krankheitsfrei bleiben^{65, 66}. Studien am Menschen lassen eine potentielle Bedeutung der Darmflora auf die Krankheitsschwere und den Phänotyp vermuten^{67, 68}.

Intestinale Barriere

Das mucusbedeckte Epithel zur Trennung der luminalen Flora von den Wirtsimmunzellen stellt die äußerste Schutzbarriere des mukosalen Immunsystems dar. Außerdem findet dort die Synthese antimikrobieller Peptide statt²¹.

Bei CU ist die Synthese einiger kolonischer Muzinsubtypen (Muzin 2) vermindert⁶⁹. Auch bei MC konnte im entzündeten terminalen Ileum eine verminderte Expression der Muzingene *MUC1*, *MUC3*, *MUC4* und *MUC5B* gefunden werden, wodurch die bedeckende Muzinschicht insuffizient wird⁷⁰.

Eine intakte mukosale Barriere verhindert den parazellulären Durchtritt luminaler Antigene. Sowohl bei MC als auch bei CU sind die *Tight Junctions*, welche die Epithelzellen beim Gesunden dicht miteinander verknüpfen, durchlässig⁷¹⁻⁷³.

Neben der Muzinschicht und dem Epithel sorgen antimikrobielle Peptide, welche vor allem von Paneth-Zellen im Dünndarm sezerniert werden, und die Produktion von Immunglobulin (Ig) A für eine weitere Abwehr luminaler Mikroorganismen. Neue Erkenntnisse sehen einen Mangel an Defensinen als mögliche Ursache in der Pathogenese der CED⁷⁴⁻⁷⁶. Dies könnte dazu führen, dass sich die luminalen Mikroorganismen direkt an die Oberfläche der Darmepithelien anlagern und durch direkten Kontakt mit Immunzellen eine Entzündungsreaktion hervorrufen^{74, 77}.

Immunsystem

Zur Abwehr eingedrungener Antigene und Keime stehen dem Immunsystem zwei große Abwehrmechanismen zur Verfügung. Das angeborene (unspezifische) Immunsystem und das erworbene (adaptive, spezifische) Immunsystem, bestehend aus B- und T-Lymphozyten. Weiterhin werden humorale von zellulären Komponenten unterschieden.

Immunzellen des unspezifischen Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen)) erkennen mit ihren *pattern recognition receptors* (PRRs) eindringende Mikroorganismen anhand typischer Muster oder Molekülen, den sogenannten *pathogen/mikroben-assoziierten Mustern*. Ein weites Spektrum an PRRs, einschließlich *Toll-like Rezeptoren* (TLR) und *NOD-like Rezeptoren* (NLR), tragen vor allem dendritische Zellen, welche die weiteren Schritte in Richtung Abwehr oder Toleranz einleiten. Bei CED korreliert ihre Verteilung und ihr Phänotyp mit der Krankheitsaktivität⁷⁸⁻⁸⁰. Bei CU und MC vermindern Polymorphismen und eine erhöhte Expression normalerweise weniger vorkommender TLR (TLR2 und TLR4) die Toleranz des erworbenen Immunsystems^{81, 82}.

NLR (NOD1 und NOD2) spielen bei MC eine Rolle. *NOD2*-Polymorphismen sind neben einer gestörten Defensinproduktion der Paneth-Zellen mit einer schwächeren Zytokinantwort gegenüber Muramyl-dipeptiden, einer ineffektiven Autophagie und IL-10 Transkription verbunden^{76, 83-85}.

Eine gestörte Autophagie invasiver Mikroorganismen und eine fehlende T-Zell-Toleranz werden auch bei *ATG16L* mutierten Zellen beobachtet^{86, 87}.

Das adaptive Immunsystem wird durch die Präsentation von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen an naive T-Zellen in sekundär lymphatischen Organen des Darms (Peyer'sche Plaques, Lymphknoten, usw.) aktiviert. Abhängig von der Art der antigenpräsentierenden Zelle und dem Zytokinmilieu differenzieren die *clusters of differentiation* (CD)⁴⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Subgruppen (Th1, Th2, induzierbare regulatorische T-Zellen und Th17) mit charakteristischem Zytokinprofil⁸⁸⁻⁹¹. Bei CED wurden Dysregulationen intestinaler CD⁴⁺ T-Zell-Subgruppen mit gestörtem Gleichgewicht zwischen regulatorischen und Effektor-T-Zellen festgestellt. Bei MC werden beispielsweise das Th-17 Zytokin IL-17 und die Th1-Zytokine Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α vermehrt produziert^{92, 93}. Bei CU sind hingegen IL17 und vor allem Th2-Zytokine erhöht⁹²⁻⁹⁴. Eine atypische Th2-Antwort wird hier durch natürliche Killer-T-Zellen über die Produktion von IL-5 und IL-13 vermittelt. Natürliche Killer-T-Zellen, welche viele Th2-Zytokine produzieren, wurden vermehrt in der Lamina propria von CU-Patienten gefunden. IL-13 hat zytotoxische Funktionen gegen epitheliale Zellen, was wiederum zur gesteigerten Permeabilität führen kann und übt ein positives Feedback auf natürliche Killer-T-Zellen aus^{71, 94, 95}.

Eine zentrale Rolle für die Th17-Zell-Funktion erfüllt der IL-23 Pfad, für welchen zahlreiche polymorphe Genvarianten mit CU und MC assoziiert werden konnten⁴¹.

Die Rolle der B-Zellen im Zusammenhang mit CED ist wenig erforscht worden. Im Darm produzieren sie Ig A-Antikörper zur Immunabwehr. In Tiermodellen bei Kolitis hatten sie anti- und proinflammatorische Effekte^{96, 97}. Der Nachweis antimikrobieller Antikörper, z. B. Anti-Flagellin-Antikörper und Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper bei MC und perinukleäre anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper bei CU, gibt Hinweise auf eine vorhandene B-Zell-Aktivität^{98, 99}.

Zur systemischen Immunkontrolle zirkulieren Leukozyten im Blut. Bei Entzündungsprozessen werden sie durch Chemokine angelockt und deren Migration durch Adhäsionsmoleküle (Selektine, Integrine) vermittelt.

Die schnelle Rekrutierung und Akkumulation von Leukozyten in intestinalem Gewebe ist typisch für CED. Durch hochregulierte Adhäsionsmoleküle, wie *mucosal addressin cellular adhesion molecule-1* auf Gefäßendothelien durch TNF α und IL-1, werden diese verstärkt. Außerdem steigern vermehrte gewebsspezifische Chemokine, wie das CXCL8 (IL-8), die Migration der Leukozyten. Zudem könnten Veränderungen in der mikrovaskulären Struktur zur Entzündung, Ischämie und verminderter mukosaler Heilung beitragen¹⁰⁰⁻¹⁰³. Heute wird dem adaptiven Immunsystem im Gegensatz zu früherer Meinung vielmehr eine entzündungsmodulierende und aufrechterhaltende Rolle zugeordnet.

Eine besondere Bedeutung wird derzeit dem Barrieredefekt in der Darmmukosa zugeschrieben⁷⁴.

1.2 KIR–System auf natürlichen Killerzellen als Teil des Immunsystems

1.2.1 Natürliche Killerzellen

Eine weitere Gruppe der bereits erwähnten Lymphozyten stellen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar.

Sie werden durch ihre Hauptaufgabe, der ungerichteten Spontanabwehr ohne vorausgegangene Sensibilisierung gegenüber virusinfizierten Zellen und Tumorzellen, als Teil des angeborenen Immunsystems betrachtet^{104, 105}. Daneben erfüllen sie jedoch auch einige Eigenschaften des erworbenen Immunsystems, wie z. B. die Bildung lang lebender Gedächtniszellen¹⁰⁶.

Im Darm scheinen sie eine Rolle in der angeborenen mukosalen Immunität und Homöostase zu erfüllen. In Mausmodellen, auf welche im Diskussionsteil noch eingegangen wird, wurde gezeigt, dass NK-Zellen u. a. durch die Sekretion von IFN γ zur Entwicklung einer intestinalen Entzündung beitragen^{107, 108}.

NK-Zellen werden durch einen CD56⁺, CD3⁻-Phänotyp definiert und repräsentieren etwa 10 % der Lymphozyten im Blut^{109, 110}. Verglichen mit T- und B-Lymphozyten sind sie größer und enthalten vorgeformte zytolytische Granula. Außerdem produzieren sie Chemokine und Zytokine vom Typ 1 zur Aktivierung anderer Immunzellen^{104, 105, 107-109}. Sie entwickeln sich aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen¹⁰⁹ und sind danach vor allem im Blut, Milz, Leber, Lunge, Knochenmark und zu einem sehr geringen Teil in Lymphknoten zu finden¹¹¹.

Nach der Expression des Oberflächenmoleküls CD56 unterscheidet man zwei Subgruppen^{109, 112}.

CD56^{dim} CD16⁺ *killer cell immunoglobulin-like-receptor* (KIR)⁺ NK-Zellen sind die meist ausgereiftesten Zellen und machen ca. 90 % der NK-Zellen des peripheren Blutes aus. Sie vermitteln vor allem zytotoxische Immunantworten^{109, 113}. Diese erfolgen u. a. durch die Freisetzung von Perforin und Granzym B aus den vorgeformten Granula, wodurch die Plasmamembran der Zielzellen zerstört und dadurch die Apoptose getriggert wird¹¹⁴.

Die übrigen 10-15 % der NK-Zellen sind CD56^{bright} CD16⁻ KIR^{+/-} Zellen. Diese weniger ausgereiften Zellen sind Vorstufen der CD56^{dim} Zellen.

Ihre Hauptaufgabe liegt vor allem in der Produktion proinflammatorischer Zytokine (IFN- γ , TNF- α , *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* usw.) und weniger in der Zytolyse. In den Lymphknoten sind die regulatorischen CD56^{bright} Zellen die vorherrschende NK-Zellsubgruppe, wo sie unter anderem mit den dendritischen Zellen interagieren^{111, 112, 115-118}.

Darm assoziierte lymphatische Gewebe beherbergen eine spezielle NK-Zell-Untergruppe. Diese ist auf die Produktion von IL-22 spezialisiert, einem proinflammatorischen Zytokin, welches die Abwehr gegen extrazelluläre Pathogene vermittelt¹¹⁹.

1.2.2 Regulation der natürlichen Killerzellen über Rezeptoren und Zytokine

Die zytotoxische Aktivität und die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen der NK-Zellen wird über ein komplexes System aus aktivierenden und hemmenden Rezeptoren (KIR, KLR: *killer cell lectin-like receptors*, LILR: *leukocyte immunoglobulin-like receptors* und NCR: *natural cytotoxicity receptors*) reguliert. Diese sind im Gegensatz zum T-Zell-Rezeptor nicht antigenspezifisch und nicht durch somatisches Rearrangement entstanden^{110, 120-123}. Durch variierende Kombinationen aus aktivierenden und hemmenden Rezeptoren entstehen die verschiedenen Subgruppen der NK-Zellen^{124, 125}.

Zusätzlich zur Steuerung über verschiedene Rezeptoren kann deren Aktivität durch Zytokine (IFN- α/β , IL-2, -18 und -15), welche von dendritischen Zellen, Makrophagen und den pathogenen Geweben sezerniert werden, gesteigert werden¹²⁶.

Zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und fremden Zellen nutzen NK-Zellen den sogenannten „Missing-Self“-Mechanismus. Dazu besitzen sie hemmende Rezeptoren (vor allem KIR), die MHC-I-Moleküle (vom Typ A, B, C und E) erkennen, welche auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert sind. Bei deren Erkennung werden hemmende Signale in das Zellinnere der NK-Zellen geschickt und die Zellen bleiben dadurch vor einem Angriff durch die NK-Zellen geschützt.

Fällt diese Selbsterkennung durch herunterregulierte MHC-I Moleküle beim Befall von Krankheitserregern oder neoplastischer Zellen weg, entfällt auch der hemmende Mechanismus. Die NK-Zellen werden aktiviert und zerstören die entsprechende Zelle durch oben genannte Mechanismen¹²⁷. NK-Zellen können darüber hinaus in einer sogenannten „Lizenzierung“ (und weiteren angenommenen Modellen) durch die Interaktion mit HLA-I-Liganden ihre funktionelle Kompetenz erwerben, selbst wenn diese (noch) keine funktionellen hemmenden Rezeptoren besitzen^{128, 129}.

Zusätzlich zum „Missing-Self“-Mechanismus könnte die Expression von Liganden aktivierender Rezeptoren auf der Zielzellenoberfläche zum Angriff durch NK-Zellen beitragen¹³⁰.

1.2.3 KIR-Rezeptoren

Unter der Vielfalt an Rezeptoren nehmen die KIR-Rezeptoren durch ihre individuelle, heterogene und sehr variable Zusammensetzung eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Entwicklung und Funktion von NK-Zellen ein¹³⁰⁻¹³³.

Momentan besteht die *KIR*-Gen-Familie aus 15 Genen (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*) und zwei Pseudogenen (*KIR 2DP1* und *KIR 3DP1*). Diese werden über eine 100-200 kb lange Region des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes neben weiteren Genen des Immunsystems auf Chromosom 19 (19q13.4) kodiert¹³⁴.

Die KIR-Rezeptoren besitzen entweder zwei oder drei extrazelluläre Ig-Domänen für die Ligandenbindung und ein kurzes oder langes zytoplasmatisches Ende für die Signalübertragung. Je nach Anzahl an Ig-Domänen (zwei oder drei und „D“ für „domain“) und dem Typ des zytoplasmatischen Endes („S“ für „short“ oder „L“ für „long“ und „P“ für Pseudogen) erhält der KIR-Rezeptor nach der gängigsten Nomenklatur seine Bezeichnung¹³⁵. So besitzt der KIR-Rezeptor *KIR2DL1* beispielsweise zwei extrazelluläre Ig-Domänen und ein langes intrazelluläres Ende.

Die letzte Ziffer gibt die Anzahl an Genen an, welche für ein KIR-Rezeptor-Protein mit dieser Struktur kodieren. Die langen Enden triggern hemmende Signale über *immune-receptor-tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs), wohingegen die kurzen Enden über *immune-receptor-tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) in DAP12 Signaladaptern aktivierende Signale triggern¹³⁶. Die Proteinstruktur der verschiedenen KIR-Rezeptoren ist in Abbildung 6 gezeigt.

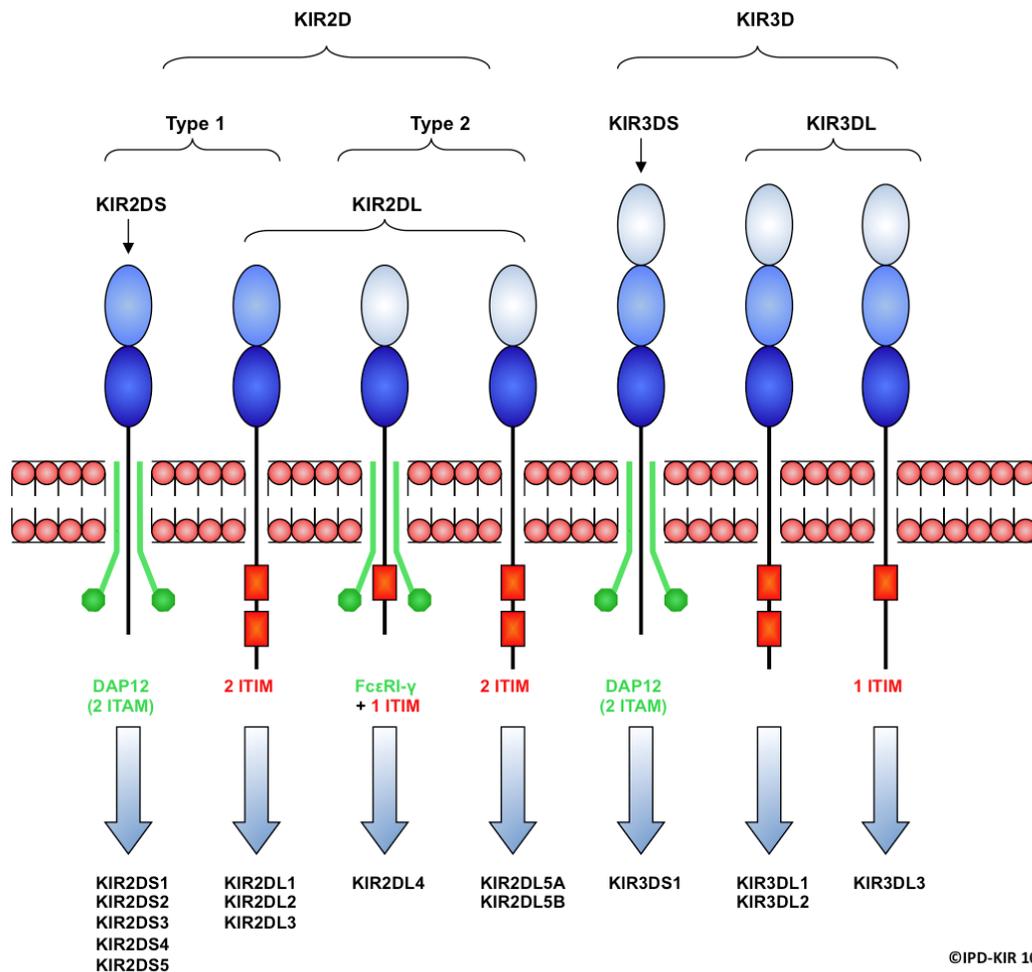


Abbildung 6: Proteinstruktur der verschiedenen KIR-Rezeptoren aus der „IPD-KIR Database“¹³⁷. Gezeigt ist die Proteinstruktur aus zwei und drei Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen. Die Verbindungen der aktivierenden KIR zu Adaptermolekülen sind in Grün, *immune-receptor-tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) der hemmenden KIR in Rot dargestellt.

1.2.4 KIR-Liganden

Die KIR-Rezeptoren binden an verschiedene HLA-Moleküle, welche auf Chromosom 6 kodiert sind¹³⁸⁻¹⁴⁰. Diese können anhand ihrer Aminosäuresequenz in die drei Hauptgruppen HLA-A, B und C eingeteilt werden^{137, 141}. In Abbildung 7 sind die KIR-Rezeptoren und ihre bindenden HLA-Moleküle zusammengefasst.

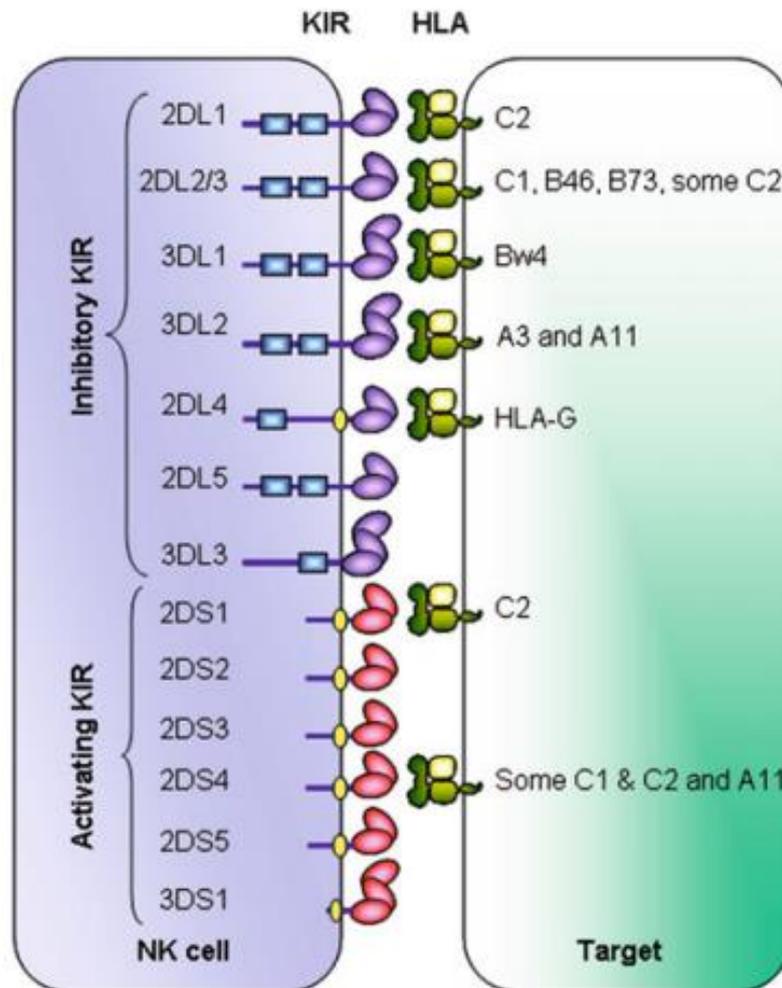


Abbildung 7: Aktivierende (*activating*) und hemmende (*inhibitory*) KIR-Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen mit ihren passenden HLA-Liganden aus¹³⁰

1.2.5 *KIR*-Haplotypen

Basierend auf der variablen Zusammensetzung der *KIR*-Gene zwischen Individuen und Bevölkerungsgruppen existieren verschiedene Haplotypen^{141, 142}. Trotz der unterschiedlichen Anzahl und Typen der vorkommenden Gene sind die vier Gene *KIR2DL4*, *KIR3DP1*, *KIR3DL2* und *KIR3DL3* in nahezu allen Haplotypen vertreten. Sie werden daher auch als Rahmengene bezeichnet¹⁴³.

Der Haplotyp A ist neben den Rahmengen durch die Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1* und *KIR2DP1* festgelegt^{135, 142-144}. Die übrigen Haplotypen werden als Haplotyp B zusammengefasst, welcher eine sehr variable Genzusammensetzung aufweist¹³⁰. Ursprünglich wurde der B Haplotyp durch den Nachweis eines 24 kb Hind III Fragments mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus bestimmt¹⁴².

Dieser Haplotyp unterscheidet sich vor allem durch mehr aktivierende Rezeptoren vom Haplotyp A, welcher nur den einen aktivierenden Rezeptor *KIR2DS4* besitzt. Er besitzt mindestens eines der Gene *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR2DL2*, *KIR2DL5* und *KIR3DS1*^{143, 145-147}. Im Zusammenhang mit der Stammzelltransplantation bei Leukämien wurde eine weitere Unterteilung des Haplotyps B anhand des *B Content-Scores* (0-4) entsprechend den zentromeren und telomeren Genmotiven (siehe unten) entworfen¹⁴⁸.

Beide Haplotypen kommen mit unterschiedlichen Häufigkeiten in verschiedenen Bevölkerungsgruppen vor^{142, 149}.

Die *KIR*-Haplotypen werden durch 14 kb lange *long interspersed elements-repeats* in eine zentromere und telomere Hälfte geteilt, welche jeweils durch die Rahmengene begrenzt werden und dazwischen variable *KIR*-Gene enthalten^{143, 149}.

Die Rekombination aus zentromeren und telomeren Genmotiven während der Meiose trägt weiter zur Vielfalt der Genzusammensetzung bei^{149, 150}. Verschiedene *KIR*-Haplotypen mit ihren zentromeren und telomeren Anteilen sind in Abbildung 8 gezeigt.

1.2.6 *KIR* und Krankheit

Die Entdeckung der unerwarteten Vielfalt unter den *KIR*-Rezeptoren und ihre Bedeutung in der Immunabwehr führten zur Erforschung ihrer Rolle im Zusammenhang mit Krankheiten¹⁵¹. So konnten bereits Verbindungen zwischen den *KIR*-Rezeptoren und/oder ihrer Liganden mit bestimmten Krankheiten in Studien gezogen werden. Beim Vergleich unterschiedlicher *KIR*-*HLA*-Kombinationen wurde gezeigt, dass stark hemmende Verbindungen schützend gegenüber Autoimmunität, jedoch empfänglicher für Infektionen und reproduktive Störungen sind. Umgekehrt fördern stark aktivierende Verbindungen Autoimmunität und das Krebswachstum, aber schützen vor Infektionen¹³⁰. Die Verbindung *KIR2DL3* und *HLA-C1* führt durch ihre schwachen „Hemmungssignale“ zu einer stärkeren Abwehr gegenüber Hepatitis C als andere Genverbindungen infizierter Individuen¹⁵². Präeklampsien und Fehlgeburten wurden mit der starken Hemmung durch die Verbindung *KIR2DL1* und *HLA-C2* beobachtet¹⁵³⁻¹⁵⁵. Weniger Komplikationen in der Schwangerschaft hatten Frauen, welche das telomere Ende des Gruppe B *KIR*- Haplotyps besitzen (*KIR3DS1*, *KIR2DL5A*, *KIR2DS1* und *KIR2DS5*)¹⁵³. Eine starke Assoziation wurde zwischen *KIR2DS2* oder *KIR2DS1* und vielen Autoimmunerkrankungen oder chronisch entzündlichen Erkrankungen herausgefunden (Psoriasis^{156, 157}, Sklerodemie¹⁵⁸, Rheumatoide Arthritis/Vaskulitis¹⁵⁹, Diabetes mellitus¹⁶⁰ etc.). Unter den relativ zahlreichen Studien zu HIV konnte u. a. nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein des aktivierenden Rezeptors *KIR3DS1* die AIDS-Progression bei HIV-Patienten verglichen mit Patienten ohne *KIR3DS1* verlangsamt¹⁶¹. *KIR3DS1* konnte auch als protektiver Faktor für Hepatitis C-Virus-Infektionen gezeigt werden¹⁵². Hingegen wurde auch nachgewiesen, dass die Präsenz des *KIR3DS1* mit der Progression zervikaler Neoplasien durch HPV-16/18 zum Zervixkarzinom verbunden ist¹⁶².

Weitere Zusammenhänge oder auch schützende Effekte konnten mit anderen Infektionskrankheiten (Hepatitis B^{163, 164}, Cytomegalivirus¹⁶⁵, etc.) und malignen Tumorerkrankungen (Nasopharynxkarzinom¹⁶⁶, Hepatozelluläres Karzinom¹⁶⁷, usw.), einschließlich der Leukämien¹⁶⁸ hergestellt werden.

Diese beschriebenen Zusammenhänge von *KIR* und dem Auftreten bestimmter Erkrankungen könnten auch eine solche Assoziation mit CED erwarten lassen. Besonders die Erkrankungen Psoriasis vulgaris, Psoriasis-Arthritis^{156, 157}, Sklerodermie¹⁵⁸ und Diabetes mellitus Typ I¹⁶⁰ sind, wie auch CED, gekennzeichnet durch veränderte Immunprozesse und sind zum Teil MHC-Klasse I assoziiert, was wiederum zu einer Verbindung mit *KIR*-Genen führt¹⁵¹. Außerdem teilen sie zum Teil Suszeptibilitätsgene mit CED⁴¹.

Ein Bezug zu diesen Erkrankungen und CED könnte beispielsweise auch über die extraintestinalen Manifestationen bei CED hergestellt werden, welche, wie auch einige Arthritisformen, teilweise *HLA-B 27*-assoziiert sind und eine verwandte Pathogenese vermuten lassen¹⁶⁹.

In GWAS wurden für CED einige Chromosomenregionen, einschließlich der Region *IBD6* auf Chromosom 19, identifiziert¹⁷⁰. Ein möglicher Zusammenhang zu den *KIR*-Genen könnte auch über deren Nähe zu diesem Locus hergestellt werden, da die *KIR*-Gen-Familie zusammen mit der *IBD6*-Region auf Chromosom 19 lokalisiert ist¹³⁴.

In anderen Ländern konnten bereits Studien zum *KIR*-Profil und CED erste Hinweise zu deren Assoziation geben¹⁷¹⁻¹⁷⁴. Durch die Diversität der *KIR*-Gen-Familie war es somit interessant, ähnliche Untersuchungen bei einer einheimischen Bevölkerungsgruppe zu untersuchen.

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

KIR werden auf natürlichen Killerzellen und zu einem geringen Teil auf T-Zellen exprimiert. Sie steuern über aktivierende und hemmende Signale nach der Bindung mit passenden HLA-Liganden Immunprozesse bei der ungerichteten Spontanabwehr gegenüber Krankheitserregern und malignen Krankheitsprozessen. Sie sind gekennzeichnet durch ihre ausgesprochene Vielfalt zwischen Individuen und ihrer raschen evolutionären Anpassung. Einige Studien haben bereits Assoziationen in der *KIR*-Zusammensetzung und der Entstehung bestimmter Erkrankungen und entzündlicher Prozesse gefunden.

Bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) im Erwachsenenalter oder akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter konnten den KIR-Rezeptoren im Rahmen von Stammzelltransplantationen bereits entscheidende Funktionen zugesprochen werden^{148, 175, 176}.

Die Bedeutung der KIR als Steuerungselemente in der angeborenen und auch erworbenen Abwehr im Zusammenhang mit der Pathogenese von CED ist Gegenstand aktueller Forschung¹⁷¹⁻¹⁷⁴. Die Identifikation bestimmter *KIR*-Gene als Suszeptibilitätsgene der CED wäre ein weiterer Baustein in der bis heute ungeklärten multifaktoriellen Entstehung dieser Krankheitsbilder und Beitrag zur Entwicklung spezifischerer Therapiemöglichkeiten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu überprüfen, ob die genetische Typisierung bezüglich der *KIR*-Gene von Patienten mit MC und CU im Vergleich zu Kontrollpersonen weitere Zusammenhänge in der Pathogenese der CED liefern kann.

Durch deren Vergleich soll die Frage beantwortet werden, ob es einen Unterschied im *KIR*-Profil von Patienten mit CED und Gesunden gibt.

Realisiert wird dies durch eine bereits etablierte und validierte, auf den Nachweis der KIR-Rezeptoren spezifizierte Real-Time PCR.

2 Proben, Material und Methoden

2.1 Proben

2.1.1 Ethikvotum

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen am 05.04.2000 (Studiencode IKP 166) und 27.11.2001 (Studiencode AKP-4) genehmigt. Für *desoxyribonucleic acid* (DNA)-Proben von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen lag die Genehmigung der Ethikkommission des Allgemeinen Krankenhauses Wien vor. Sowohl in der Fall- als auch Kontrollkohorte wurden die Probanden zur Probenentnahme aufgeklärt und haben zur Verwendung ihres genetischen Materials für Untersuchungszwecke in Studien zugestimmt. Nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung wurde venöses Blut entnommen, aus dem die DNA isoliert wurde. Für alle Untersuchungen wurden darüber hinaus die Patientendaten anonymisiert, so dass eine Zuordnung zum Patientenamen unmöglich ist.

2.1.2 Studienteilnehmer

In die Studie wurden insgesamt 200 Patienten (jeweils 100 mit MC und CU) kaukasischer Abstammung mit CED eingeschlossen. Als Kontrollen nahmen 341 Personen kaukasischer Abstammung ohne Nachweis einer CED teil.

Ein Jahr vor der Probenentnahme wurde bei den Patienten die Diagnose der CED durch endoskopische, radiologische und histopathologische Untersuchungen bestätigt.

Zur Bildung von Subgruppen wurden die MC-Patienten nach der modifizierten Montreal-Klassifikation eingeteilt.

2.1.3 DNA-Proben

Für die Untersuchungen wurden jeweils 100 DNA-Proben von Patienten mit MC und CU auf das Vorhandensein von 17 *KIR*-Genen getestet und mit dem *KIR*-Profil von 341 bereits untersuchten Proben von gesunden Personen verglichen. Die DNA-Isolierung wurde nach Standardprotokollen am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart durchgeführt. Die Proben der Kontrollgruppe (KG) waren bereits im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten der Kinderklinik Tübingen *KIR*-genotypisiert worden.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

2.2.1.1 Real-Time PCR

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits für die Real-Time PCR

Reagenz	Hersteller
PeqGOLD DEPC-Water /RNase-free Water	Peqlab Biotechnologie GmbH
KAPA™ SYBR® FAST qPCR Mastermix für Bio-Rad iCycler	Peqlab Biotechnologie GmbH
PCR- Primer	Eurofins MWG Operon GmbH

2.2.1.2 Gelelektrophorese

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits für die Gelelektrophorese

Reagenz	Hersteller
SeaKem® LE Agarose	Biozym Scientific GmbH
GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10.000 x in water	Biotium 3159 Corporate Place Hayward CA 94545, Biotrend Chemikalien GmbH
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE 10 x): 108,0 g Tris 70,9 g Borsäure 7,44 g EDTA-di-Natrium-dihydrat 1 x TBE-Puffer hergestellt aus 100 ml 10 x TBE-Puffer und 900 ml H ₂ O	Apotheke
100 bp DNA-Leiter 50 µg	Peqlab Biotechnologie GmbH
Gel Loading Dye, Orange	Biolabs

2.2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.2.2.1 Real-Time PCR

Tabelle 6: Auflistung der Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Real-Time PCR

Gerät	Hersteller
Gefrierschrank Premium GP 1466-23, -20 °C	Liebherr
Kühlschrank GKPv 6570 ProfiLine, +4 °C	Liebherr
Pipetten: Discovery Comfort DV 10 C: Volumen 0,5-10 µl	Abimed GmbH
Labmate L 20, variabel, Volumen 2-20 µl	Abimed GmbH
Pipetman: Volumen 10-100 µl	Gilson
Pipetman: Volumen 20-200 µl	Gilson
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, INC. BOHEMIA
Zentrifugen: Mikrozentrifuge	Carl Roth GmbH
Mikrozentrifuge Biofuge A	Heraeus Christ GmbH

CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Photometer Gen Quant II	Pharmacia Biotech
Photometer Nano drop	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipettenspitzen: Premium Tips I.R. 0,5-10 µl SafeGuard Filter Tips I.R. 1-200 µl	Biozym Scientific GmbH Peqlab Biotechnologie GmbH
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG
Low Tube Strips	Bio-Rad Laboratories GmbH
Flat Cap Strips Optically clear	Bio-Rad Laboratories GmbH

2.2.2.2 Gelelektrophorese

Tabelle 7: Auflistung der Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Gelelektrophorese

Gerät	Hersteller
Waage: Modell E 400D	Ohaus Europe GmbH
Mikrowelle Even microvave distribution EMD MW 311	De'Longhi Deutschland GmbH
Power PAC: 1000 Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gelkammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Geldokumentationsgerät	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH

2.3 Methoden

2.3.1 Real-Time PCR

Die Expression der *KIR*-Gene in den DNA-Proben wurde mittels *Real-Time Polymerase-Kettenreaktion* (PCR) bestimmt. Die Real-Time PCR ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von Nukleinsäuren, basierend auf der Nachahmung der natürlichen DNA-Replikation. Im Unterschied zur konventionellen PCR, welche 1983 von Kary Mullis entwickelt wurde, ermöglicht die Real-Time PCR die Quantifizierung in Echtzeit, d. h. der Nachweis des gewünschten Amplifikats erfolgt bereits während oder am Ende einer PCR-Reaktion und kann ohne anschließende Gelelektrophorese erfolgen¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Eine PCR-Reaktion verläuft gewöhnlich in drei sich wiederholenden Schritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturstufen.

1. Denaturierung
2. Primer-Anlagerung
3. Elongation (Verlängerung)

Hierfür wurde folgendes Protokoll angewandt:

Tabelle 8: Protokoll zur Real-Time PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Primer-Anlagerung	32	95 °C	3 s
Elongation	1	64 °C	20 s
Schmelzkurve	1	75 °C 90 °C	1 s 0,1 °C/s
Kühlen	1	25 °C	HOLD

Die DNA-Amplifikation erfolgte automatisch im Thermocycler.

Die hier beschriebene Methode wurde in der Kinderklinik Tübingen von Dr. Markus Mezger, Sebastian Michaelis und Dr. Lena Oevermann eingeführt und für diese Untersuchungen zum Thema CED übernommen. Validiert wurde diese Methode durch Vergleich mit den Ergebnissen von DNA-Proben mit bekanntem *KIR*-Genotyp und dem *KIR*-Typing Kit der Firma MILTENYI.

Für jede DNA-Probe wurden insgesamt 198 µl Mastermix bestehend aus 110 µl KAPA™SYBR® FAST qPCR Mastermix und 88 µl DNA mit DEPC-Wasser [Endkonzentration 2,5 ng/µl] hergestellt.

KAPA™ SYBR® FAST qPCR Mastermix ist ein von der Firma Peqlab fertiges Reaktionsgemisch, welches die für die Real-Time PCR nötigen Komponenten enthält. Lediglich Template und Primer müssen diesem Mastermix zusätzlich zugefügt werden.

Vom Mastermix wurden jeweils 9 µl auf 20 Low Tube Strips verteilt (der Rest wurde für eventuelle Wiederholungen eingefroren). Anschließend wurde jeweils 1 µl *KIR*-spezifischer Primermix (siehe Tabelle 9) bestehend aus Forward *KIR*-, Reverse *KIR*-Primer und *GALC* (Forward und Reverse) als Positivkontrolle dazu pipettiert. Die Primerkonzentration betrug dabei 5,0 ng/µl und die *GALC*-Konzentration 2,0 ng/µl.

Es wurde für jeden der 17-*KIR*-Primer ein Mastermix von 1000 µl im Voraus hergestellt. Dabei wurden die Primer von einer Ausgangskonzentration von 100 ng/µl auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl verdünnt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des *KIR*-Primer-Mastermixes für eine Gesamtmenge von 1000 µl

Reagenz	Volumen	Konzentration
H ₂ O	930 µl	
Forward Primer	25 µl	2,5 ng/µl
Reverse Primer	25 µl	2,5 ng/µl
<i>GALC</i> Forward	10 µl	1,0 ng/µl
<i>GALC</i> Reverse	10 µl	1,0 ng/µl
Gesamt	1000 µl	5,0 ng/µl <i>KIR</i> -Primer 2,0 ng/µl <i>GALC</i> -Primer

Es wurden folgende Primersequenzen verwendet (Tabelle 10):

Tabelle 10: Primer für *KIR*-Genotyping aus¹⁸⁰ und Primer 2DS3 aus¹⁸¹,
KG=Kontrollgruppe

<i>KIR</i> -Gen	Forward	Reverse	Schmelzpunkt ¹⁸⁰	Schmelzpunkt-Mittelwert KG	Amplifikat
2DL1	GTT GGT CAG ATG TCA TGT TTG AA	CCT GCC AGG TCT TGC G	81,94 °C	82,42 °C	142 bp
2DL2	AAA CCT TCT CTC TCA GCC CA	GCC CTG CAG AGA ACC TAC A	84,52 °C	84,51 °C	142 bp
2DL3	AGA CCC TCA GGA GGT GA	CAG GAG ACA ACT TTG GAT CA	81,44 °C	81,74 °C	156 bp
2DL4	TCA GGA CAA GCC CTT CTG C	GGA CAG GGA CCC CAT CTT TC	84,32 °C	83,66 °C	131 bp
2DL5	ATC TAT CCA GGG AGG GGA G	CAT AGG GTG AGT CAT GGA G	85,46 °C	84,92 °C	147 bp
3DL1	CCA TYG GTC CCA TGA TGC T	CCA CGA TGT CCA GGG GA	81,58 °C	81,58 °C	108 bp
	TCC ATC GGT CCC ATG ATG TT				109 bp
3DL2	CAT GAA CGT AGG CTC CG	GAC CAC ACG CAG GGC AG	85,27 °C	84,81 °C	131 bp
3DL3	AAT GTT GGT CAG ATG TCA G	GCY GAC AAC TCA TAG GGT A	83,87 °C	84,49 °C	196 bp

2DS1	TCT CCA TCA GTC GCA TGA G	GGT CAC TGG GAG CTG AC	81,44 °C	81,13 °C	96 bp
	TCT CCA TCA GTC GCA TGA A				96 bp
2DS2	TGC ACA GAG AGG GGA AGT A	CCC TGC AAG GTC TTG CA	81,42 °C	81,60 °C	110 bp
2DS3	CTT GTC CTG CAG CTC CT ¹⁸¹	GCA TCT GTA GGT TCC TC CCT ¹⁸¹		84,35 °C	158 bp ¹⁸¹
2DS4	GGT TCA GGC AGG AGA GAA T	CTG GAA TGT TCC GTK GAT G	83,25 °C	83,18 °C	133/111 bp
2DS5	AGA GAG GGG ACG TTT AAC C	CTG ATA GGG GGA GTG AGT	82,92 °C	83,10 °C	147 bp
3DS1	CAT CGG TTC CAT GAT GCG	CCA CGA TGT CCA GGG GA	82,24 °C	81,89 °C	107 bp
	CAT CAG TTC CAT GAT GCG				107 bp
2DP1	CGA CAC TTT GCA CCT CAC	GGG AGC TGA CAA CTG ATG	83,18 °C	82,96 °C	141 bp
3DP1f 1	GTG TGG TAG GAG CCT TAG	GAA AAC GGT GTT TCG GAA TAC	85,13 °C	85,19 °C	279 bp
3DP1f 2	GTA CGT CAC CCT CCC ATG ATG TA	GAA AAC GGT GTT TCG GAA TAC	87,45 °C	87,06 °C	398 bp
Necdin	GGC TGC ACC TGA GGC TAA	GCC CCA AAA GAA CTC GTA TTC	87,50 °C	88,36 °C	335 bp
GALC	TTA CCC AGA GCC CTA TCG TTC T	GTC TGC CCA TCA CCA CCT ATT	75,00 °C	78,43 °C	352 bp

Neben den 17 *KIR*-Primern wurde zu jeder DNA-Probe Necdin und GALC als Positivkontrolle und H₂O als Negativkontrolle mitgeführt.

Der fertige Reaktionsansatz wurde mit Flat Cap Strips verschlossen, zentrifugiert und für die automatische Amplifikation im CFX96™ Real-Time-Thermocycler vorbereitet.

Während des ca. eineinhalbstündigen PCR-Durchlaufes lagert sich der Farbstoff SybrGreen I aus dem oben beschriebenen Sybr® FAST-Gemisch unspezifisch an ds-DNA an. Bei Ansteigen der ds-DNA-Menge durch exponentielle Amplifikation mit Hilfe der DNA-Polymerase vermehrt sich das Signal während den sich wiederholenden Reaktionszyklen.

Die Signalstärke wird nach jedem PCR-Schritt gemessen. Nach dem letzten PCR-Zyklus erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wird die Temperatur von 75 °C beginnend in 0,1 °C-Schritten pro Sekunde bis 90 °C erhöht und für jede Stufe die Signalstärke bestimmt.

2.3.2 Gelelektrophorese

Zur Validierung der Ergebnisse aus der Real-Time-PCR wurde exemplarisch mit zwei Proben eine Gelelektrophorese durchgeführt, deren Banden mit den Schmelzkurven aus der PCR verglichen wurden. Dazu wurde eine Probe, welche für fast alle 17 *KIR*-Gene positiv war (P0529) und eine weitere Probe, bei welcher kaum Gene für die *KIR*-Rezeptoren nachgewiesen wurden (P1146), verwendet, um möglichst alle Ausprägungen abzudecken.

Bei einer Gelelektrophorese können die DNA-Amplifikate auf einem Agarosegel im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Hier wurde ein 3,5%iges Gel verwendet. Zur Gelherstellung wurden 3,5 g Agarose abgewogen und in 110 ml 1-fach TBE Puffer gelöst, indem die Suspension in der Mikrowelle aufgeköcht wurde. Nach kurzem Abkühlen wurden 11 µl Gel Red Nucleic Acid Stain dazu pipettiert. Die Gelkammern wurden mit einem 2x20 Well-Kamm vorbereitet und anschließend das Gel luftblasenfrei eingegossen. Nach einer Wartezeit von 20 min wurden die Kammern herausgenommen, um 45 ° gedreht und 1-fach TBE-Ladepuffer bis zur Markierung eingefüllt. Danach wurden die eingesetzten Kämmen wieder entfernt.

Die ausgewählten PCR-Produkte wurden vor Verwendung nochmals zentrifugiert, für jedes *KIR*-Gen 8 µl Amplifikat entnommen und mit 2 µl Orange 5 × G-DNA-Ladepuffer auf einen Parafilm versetzt, um dann die vermischten 10 µl in die Geltaschen zu pipettieren. Zusätzlich wurden für je eine Probe 4 µl 100 bp DNA-Marker in einer Extrakammer mitgeführt, um bei der Auswertung die Größe des Amplifikats zu bestimmen. Das fertige Agarosegel wurde für 75 min mit 120 V laufen gelassen und zum Schluss mit Hilfe des Geldokumentationssystems ausgewertet.

2.4 Software und Statistik

Zur Analyse und Datenerfassung der Real-Time PCR diente die Software CFX-Manager der Firma Bio-Rad. Aus den Schmelzkurven der PCR, welche in Punkt 2.3.1 beschrieben wurden, wurde für jedes positive *KIR*-Gen die entsprechende Schmelztemperatur in eine Microsoft-Excel-Tabelle übertragen.

Die statistische Auswertung wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Simon Müller durchgeführt. Für diese wurde die Statistik-Software R (Version 2.15.2)¹⁸² und die Pakete coin (Version 1.0-21) und epitools (Version 0.5-7) verwendet.

Zur Analyse der *KIR*-Gene und *KIR*-Haplotypen bei MC und CU versus KG wurde eine logistische Regression durchgeführt. Anhand der Regressionsformel wurden die Odds-Ratios (OR) und deren 95 %-Konfidenzintervalle (95 %-KI) sowie die p-Werte berechnet. Das Odds-Ratio gibt dabei an, wie viel Mal häufiger das entsprechende Gen innerhalb der Fallgruppe auftrat als in der KG. Das Signifikanzniveau für alle Tests wurde bei 5 % festgelegt. Für den Vergleich der *B-Content-Scores* der drei Kohorten wurde der *Cochran-Armitage-Trend-Test*, eine Erweiterung des Chi-Quadrat-Tests, verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Real-Time PCR

Zur Überprüfung der Existenz der 17 *KIR*-Gene in den DNA-Proben der 200 Patienten und 341 Kontrollen wurden diese mittels Real-Time PCR mit spezifischen Primern typisiert.

Aus der am Ende der PCR angezeigten Schmelzkurve konnte das Vorhandensein des *KIR*-Gens anhand eines Kurvenpeaks bei maximaler Signalstärke bei entsprechender Schmelztemperatur abgelesen werden.

In folgenden Abbildungen sind die PCR-Schmelzkurven aller *KIR*-Gene für zwei ausgewählte Proben dargestellt, von welchen zusätzlich zur Validierung der Ergebnisse eine Gelelektrophorese durchgeführt wurde.

In der in Abbildung 9 dargestellten Probe P1146 konnten die *KIR*-Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DP1*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR3DP1f2* nachgewiesen werden. Da diese Probe neben den Rahmengenen die Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1* und *KIR2DP1* enthält, entspricht sie dem *KIR*-Haplotyp A.

Die darauffolgend dargestellte Probe P0529 (Abbildung 10) enthält alle *KIR*-Gene (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DP1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DP1f2* und *KIR3DS1*), außer *KIR3DP1f1*. Diese Probe stellt ein Beispiel für einen *KIR*-Haplotyp B dar.

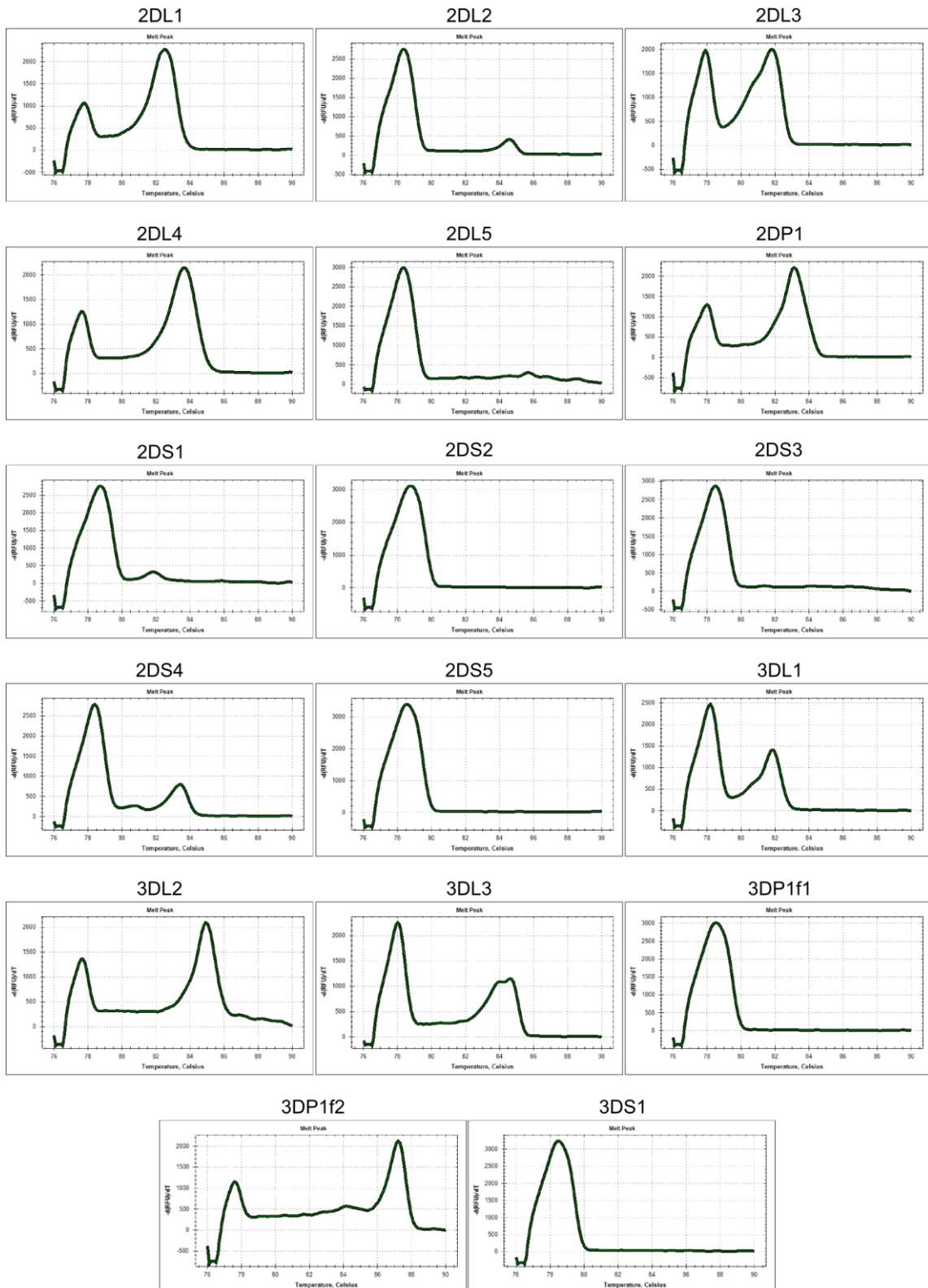


Abbildung 9: PCR-Schmelzkurven der Probe P1146 zu allen 17 *KIR*-Genen: die Probe ist für die *KIR*-Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DP1*, *KIR2DS4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR3DP1f2* positiv

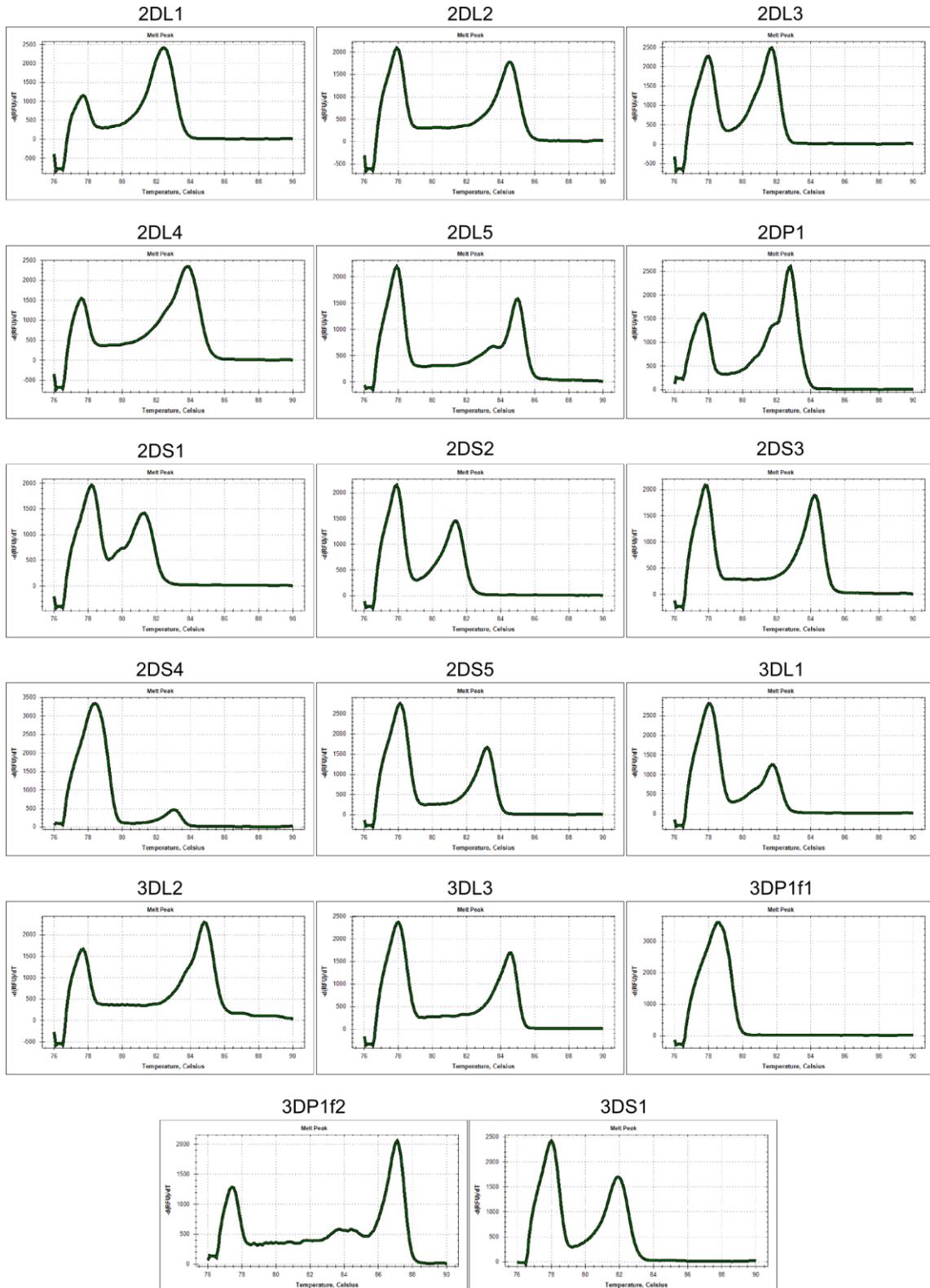


Abbildung 10: PCR-Schmelzkurven der Probe P0529 zu allen 17 *KIR*-Genen: die Probe ist für alle *KIR*-Gene (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR2DP1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DP1f2* und *KIR3DS1*), außer *KIR3DP1f1* positiv

3.2 Ergebnisse der Gelelektrophorese

In den Abbildungen 11 und 12 sind die Ergebnisse der in 2.3.2 beschriebenen Gelelektrophorese der zwei ausgewählten Proben P1146 und P0529 dargestellt.

Es kann eine 100%ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Real-Time PCR gezeigt werden.

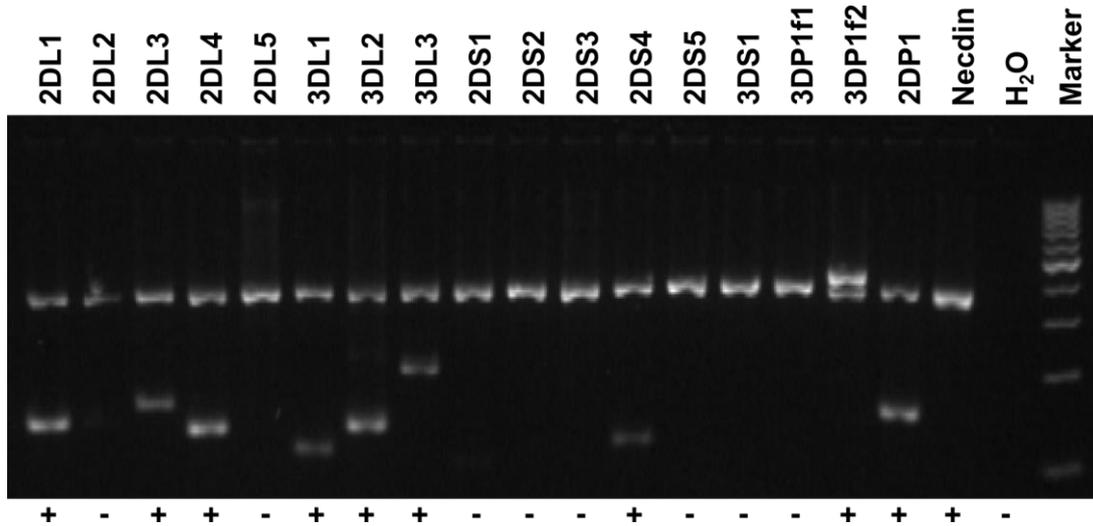


Abbildung 11: Gelelektrophorese der Probe P1146 zu allen 17 *KIR*-Genen: „+“=positives Gen, „-“=negatives Gen, Necdin=Positivkontrolle, H₂O=Negativkontrolle

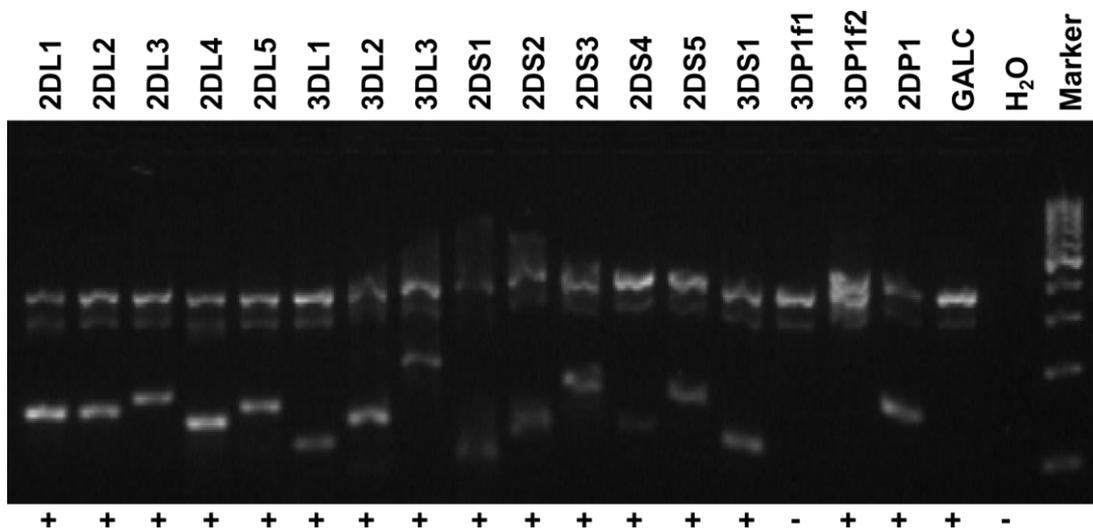


Abbildung 12: Gelelektrophorese der Probe P0529 zu allen 17 *KIR*-Genen: „+“=positives Gen, „-“=negatives Gen, GALC=Positivkontrolle, H₂O=Negativkontrolle

Zusätzlich zu diesen zwei Gelelektrophoresen wurden bereits während der Auswertung der Real-Time PCR zur Kontrolle der Ergebnisse Gelelektrophoresen durchgeführt (nicht dargestellt).

So wurden zum *KIR*-Gen *KIR2DS1* die PCR-Produkte aller Proben aus den Läufen 22 bis einschließlich 33 ebenfalls per Gelelektrophorese ausgewertet, da die hierfür verwendeten Primer zu einem Signal führten, obwohl kein Gen vorhanden war und damit nicht sicher eindeutig ausgewertet werden konnten.

Die Ergebnisse der Gelelektrophorese stimmen mit den aus der Real-Time PCR ausgewerteten Ergebnissen überein. Damit konnte die Validität der PCR-Ergebnisse bestärkt und die Richtigkeit der zuvor nicht sicher interpretierten Schmelzkurven des Gens *KIR2DS1* gezeigt werden.

3.3 Ergebnisse der *KIR*-Genotypisierung

Während den PCR-Analysen mussten acht CU-Proben wegen mangelnder DNA-Qualität und vier MC-Proben wegen doppelten und widersprüchlichen Angaben in den demografischen Daten aus der Wertung genommen werden.

Somit reduzierte sich die Anzahl an Fällen von 100 auf 92 bei CU und von 100 auf 96 bei MC. Von den ursprünglich 341 geplanten Kontrollen mussten vier der Proben wegen doppelten oder unvollständigen PCR-Ergebnissen aus der Auswertung herausgenommen werden. Für die statistischen Auswertungen der Daten aus der PCR wurde die Anzahl aller positiven und negativen Schmelzkurvenwerte für jedes *KIR*-Gen der drei Kohorten addiert.

Die sich daraus ergebende Häufigkeitsverteilung der 17 *KIR*-Gene in den Gruppen MC, CU und KG ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der *KIR*-Gene bei Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollgruppe (KG)

<i>KIR</i> -Gen	MC		CU		gesamt		KG	
Anzahl Proben	96		92		188		337	
2DL1	96	100,00 %	92	100,00 %	188	100,00 %	333	98,81 %
2DL2	51	53,13 %	49	53,26 %	100	53,19 %	188	55,79 %
2DL3	90	93,75 %	83	90,22 %	173	92,02 %	301	89,32 %
2DL4	96	100,00 %	92	100,00 %	188	100,00 %	335	99,41 %

2DL5	54	56,25 %	45	48,91 %	99	52,66 %	175	51,93 %
3DL1	90	93,75 %	89	96,74 %	179	95,21 %	321	95,25 %
3DL2	96	100,00 %	92	100,00 %	188	100,00 %	337	100,00 %
3DL3	96	100,00 %	92	100,00 %	188	100,00 %	337	100,00 %
2DS1	41	42,71 %	33	35,87 %	74	39,36 %	127	37,69 %
2DS2	52	54,17 %	48	52,17 %	100	53,19 %	161	47,77 %
2DS3	31	32,29 %	27	29,35 %	58	30,85 %	92	27,30 %
2DS4	86	89,58 %	84	91,30 %	170	90,43 %	316	93,77 %
2DS5	32	33,33 %	24	26,09 %	56	29,79 %	103	30,56 %
3DS1	42	43,75 %	34	36,96 %	76	40,43 %	125	37,09 %
2DP1	96	100,00 %	92	100,00 %	188	100,00 %	336	99,70 %
3DP1f1	29	30,21 %	29	31,52 %	58	30,85 %	114	33,83 %
3DP1f2	94	97,92 %	88	95,65 %	182	96,81 %	324	96,14 %

Die Rahmengene *KIR3DL2* und *KIR3DL3* sind in allen drei Kohorten zu 100 % vorhanden. Das Rahmengen *KIR2DL4* ist bei den Patienten zu 100 %, bei den Kontrollen zu 99,41 % vorhanden.

3.4 Darstellung der Kohorten Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Kontrollgruppe

Bei der Datenerhebung wurden bei allen Probanden deren Alter und Geschlecht sowie bei den MC-Patienten die Krankheitslokalisation und das Befallsmuster entsprechend der Montreal-Klassifikation erhoben.

Eine zusammenfassende Darstellung der demografischen Daten Alter, Geschlecht, Lokalisation und Befallsmuster zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12: Demografische Daten von Colitis ulcerosa (CU), Morbus Crohn (MC) und Kontrollgruppe (KG), L1+L3=Ileum- und Ileokolonbefall, L1=Ileumbefall, L2=Kolonbefall, L3=Ileokolonbefall, m=männlich, w=weiblich, B1=keine Komplikationen, B2=Strikturen, B3=Penetrationen, BC=B-Content-Score (Tabelle 15)

Parameter	CU	MC	KG
Anzahl	92	96	337
Alter			
Durchschnitt	29,85 (+-11,31)	26,59 (+-8,76)	26,71 (+-7,13)
Min	15,97	15,34	18
Max	67,48	58,12	66
≤17	5	11	0
>17	86	85	337
L1+L3	-	26,36 (+-8,47)	-
L2	-	27,56 (+-10,07)	-
Geschlecht			
m	40	49	181
w	51	47	156
Lokalisation			
L1	-	17	-
L2	-	19	-
L3	-	60	-
Befallsmuster			
nicht bekannt	-	2	-
B1	-	38	-
B2	-	18	-
B3	-	38	-
BC-Score			
0	29	22	94
1	36	46	139
2	19	23	80
3	8	5	20
4	0	0	4

3.4.1 Altersverteilung der Kohorten

Die Altersangaben beziehen sich bei CU und MC jeweils auf das Alter bei der Erstdiagnose und bei der KG auf den Zeitpunkt der Probengewinnung. Bei den CU-Patienten gibt es zu einem Patienten keine Angabe zum Diagnosealter.

Vergleicht man die Verteilungen des Alters der beiden Patientengruppen und der KG paarweise miteinander, so unterscheidet sich die Altersverteilung der KG signifikant jeweils von den Patientengruppen (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p < 0,02$ für MC versus KG und $p < 0,01$ für CU versus KG). Bei der Altersverteilung zwischen MC und CU kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,09$).

Die Abbildung 13 zeigt die Altersverteilung von CU und MC im Vergleich zur KG.

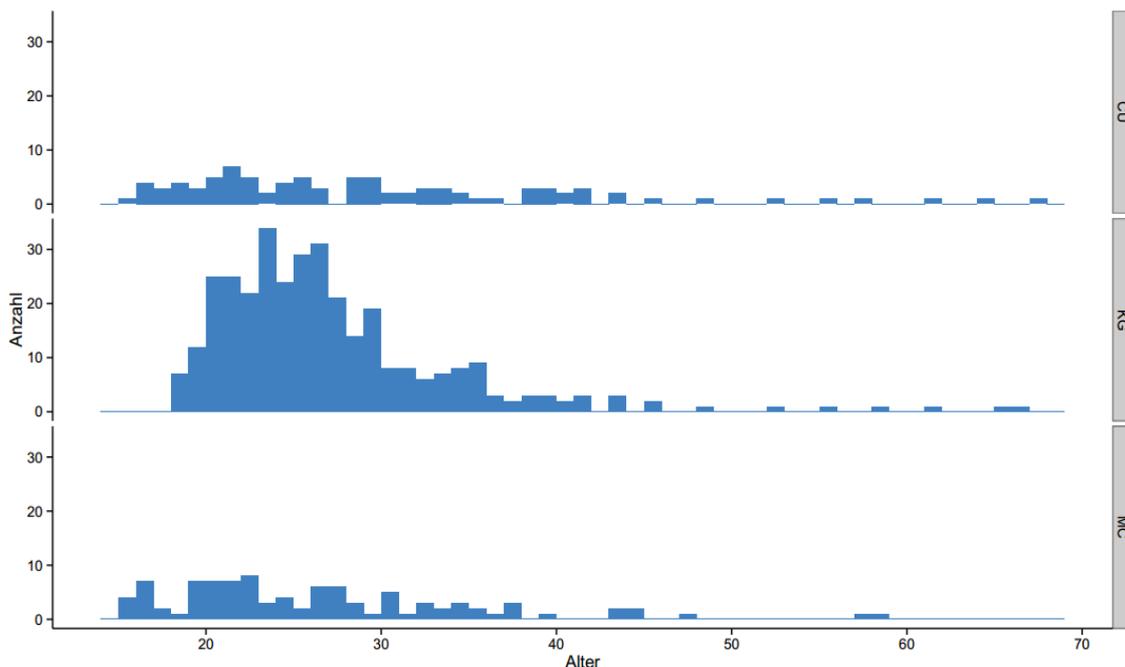


Abbildung 13: Altersverteilungen von Colitis ulcerosa (CU), Kontrollgruppe (KG) und Morbus Crohn (MC)

In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Streuung des Alters bei MC und CU höher ist im Vergleich zur KG, bei der der Schwerpunkt stärker zwischen 20 und 30 Jahren liegt und keine Person unter 17 Jahren ist.

3.4.2 Geschlechterverteilung der Kohorten

Zu einem der 92 CU-Patienten liegt keine Angabe zum Geschlecht vor. Bei den 91 Patienten liegt der Frauenanteil mit 51 Frauen bei 56,04 % und der Männeranteil mit 40 Männern bei 43,96 %.

Unter den MC-Patienten befinden sich 49 Männer (51,04 %) und 47 Frauen (48,96 %). Beim Ileokolonbefall sind die Geschlechter gleichverteilt (L3=30), bei den Lokalisationen L1 und L2 ist jeweils ein Mann mehr als Frauen vertreten (9:8 und 10:9).

Bei den Befallsmustern B2 und B3 sind die Geschlechter gleichverteilt (B2=9, B3=19). Beim Befallsmuster B1 gibt es 2 Männer mehr als Frauen (20:18) und jeweils eine Frau und ein Mann konnten keinem Befallsmuster zugeordnet werden.

Bei den 337 Kontrollpersonen liegt der Männeranteil bei 181 Personen (53,71 %) und der Frauenanteil bei 156 Personen (46,29 %).

Zum Vergleich der Geschlechter zwischen den CED-Patienten und KG wurden diese in zwei getrennten univariaten Analysen ausgewertet.

Die Tabelle 13 zeigt die univariate Analyse des Geschlechts der MC-Patienten verglichen mit der KG.

Dargestellt sind die Lokalisationen L1-L3: alle Lokalisationsmuster gesamt, L1 und L3: Ileum-und Ileokolonbefall und L2: ausschließlich Kolonbefall in deren Geschlechterverteilung bei MC und in der KG.

Mittels einer logistischen Regression wurde das Odds-Ratio und dessen 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Zur Vollständigkeit wurde zudem der p-Wert angegeben.

Tabelle 13: Univariate Analyse Geschlecht: Morbus Crohn (MC) versus Kontrollgruppe (KG) für die Lokalisationen L1-L3=alle Lokalisationen, L1+L3=Ileum- und Ileokolonbefall, L2=Kolonbefall, m=männlich, w=weiblich, KI=Konfidenzintervall

	MC	KG	Odds-Ratio	95 %-KI	p-Wert
L1-L3					
m	49 (51,04 %)	181 (53,71 %)	1,11	(0,70-1,76)	0,64
w	47 (48,96 %)	156 (46,29 %)			
L1+L3					
m	39 (50,65 %)	181 (53,71 %)	1,13	(0,68-1,86)	0,7
w	38 (49,35 %)	156 (46,29 %)			
L2					
m	10 (52,63 %)	181 (53,71 %)	1,04	(0,40-2,69)	1
w	9 (47,37 %)	156 (46,29 %)			

Die Ergebnisse der Tabelle zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Geschlechterverteilung zwischen Kranken und Gesunden (die p-Werte befinden sich über dem 5 %-Signifikanzniveau).

Tendenziell scheint die Frauenquote bei MC (OR>1) höher als bei den Kontrollen zu sein. Dieses Ergebnis unterscheidet sich kaum in den drei vorgenommenen Lokalisationsgruppen mit lediglich minimal deutlicherer Frauentendenz beim Dünndarmbefall (OR=1,13) versus KG im Vergleich zum Dickdarmbefall (OR=1,04), bei dem die Geschlechter nahezu gleich verteilt sind.

Analog dazu wurde getestet, ob ein Geschlechterunterschied zwischen der KG und der CU-Gruppe besteht.

Auch diese ergibt keinen signifikanten Unterschied in den Geschlechterhäufigkeiten zwischen CU und KG ($p=0,12 > 5\%$).

Im Vergleich der Geschlechter zwischen den Gruppen ist der Frauenteil bei CU gegenüber den Kontrollen tendenziell höher.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der univariaten Analyse des Geschlechts zwischen CU und KG aufgeführt.

Tabelle 14: Univariate Analyse Geschlecht: Colitis ulcerosa (CU) versus Kontrollgruppe (KG), m=männlich, w=weiblich, KI=Konfidenzintervall

	CU	KG	Odds-Ratio	95 %-KI	p-Wert
m	40 (43,48 %)	181 (53,71 %)	1,48	(0,93 - 2,37)	0,12
w	51 (55,43 %)	156 (46,29 %)			

3.4.3 Einteilung der Morbus Crohn-Patienten nach der Montreal-Klassifikation

3.4.3.1 Krankheitslokalisation

Zum Zeitpunkt der Diagnose wurden 77 (80,21 %) Patienten mit Dünndarmbefall (L1 und L3) gezählt. Darunter hatten 17 (17,71 %) Patienten nur das Ileum (L1) befallen und 60 (62,5 %) Patienten das Ileum mit angrenzenden Kolonabschnitten (L3).

Bei 19 (19,79 %) der Patienten mit MC war die Krankheit zu diesem Zeitpunkt ausschließlich im Kolon lokalisiert (L2).

In Abbildung 14 sind die Häufigkeiten der Krankheitslokalisationen dargestellt.

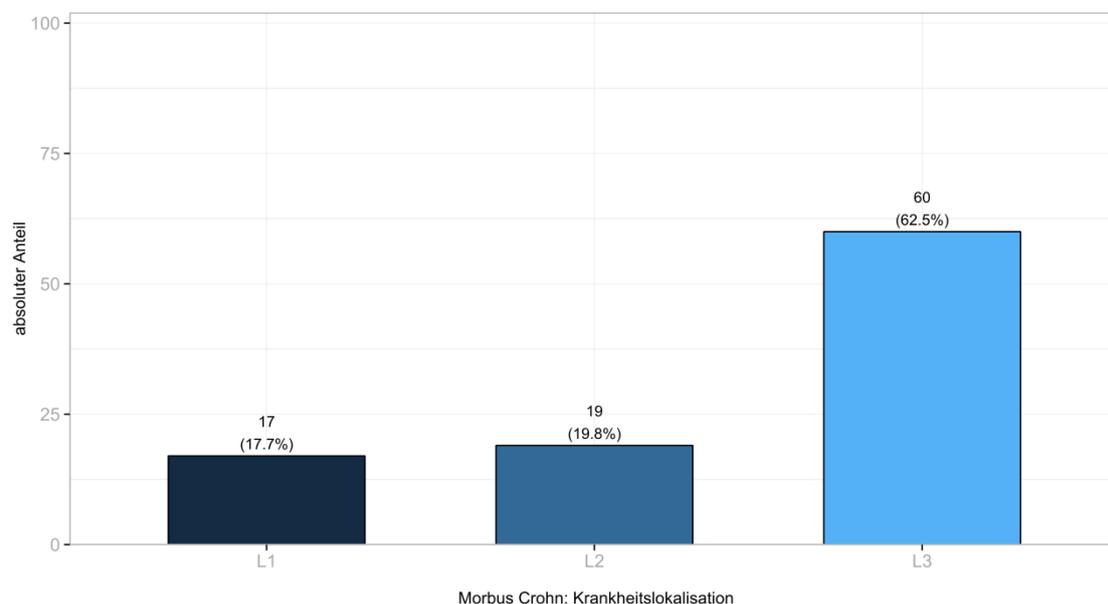


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Krankheitslokalisationen (L1=Ileumbefall, L2=Kolonbefall, L3=Ileokolonbefall) bei Morbus Crohn

3.4.3.2 Befallsmuster

Neben der Einteilung der MC-Patienten nach der Krankheitslokalisation erfolgte eine weitere Einteilung entsprechend dem Befallsmuster der Entzündungsreaktion im Darm.

Von den 96 Patienten hatten 38 (39,58 %) Patienten zum Diagnosezeitpunkt keine Komplikationen im Sinne einer Striktur oder Penetration (B1). 18 (18,75 %) Patienten wiesen bereits Strikturen auf (B2) und weitere 38 (39,58 %) Patienten hatten einen penetrierenden Darm (B3). Bei zwei (2,08 %) Patienten war keine Zuordnung zu den Befallsmustern gemacht worden. Diese Befallsmuster und ihre Häufigkeiten bei den MC-Patienten zeigt Abbildung 15.

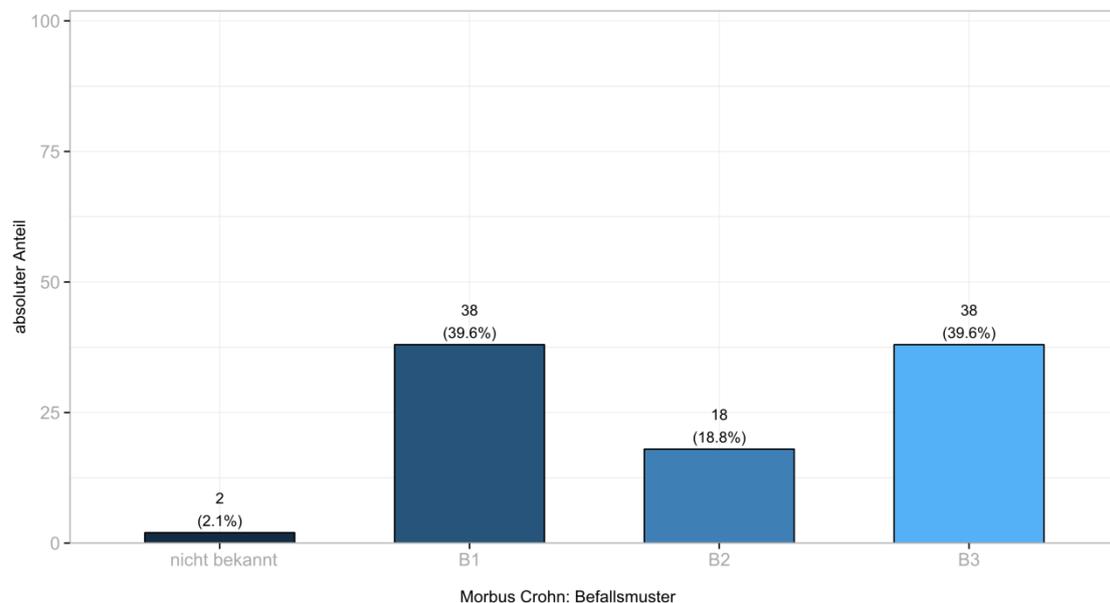


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung des Befallsmusters (B1=keine Komplikation, B2=Strikturen, B3=Penetrationen) bei Morbus Crohn

3.5 Ermittlung des *KIR*-Haplotyps und des *B-Content-Scores*

Aus den positiven und negativen *KIR*-Genen jeder Probe wurde jeweils der *KIR*-Haplotyp für jeden Fall beziehungsweise für jede Kontrolle ermittelt.

Hierbei wurde eine Unterteilung in Haplotyp A und Haplotyp B getroffen. Der *KIR*-Haplotyp B wurde weiter mit Hilfe des *B-Content-Scores* in die Stufen 0-4 unterteilt. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der *KIR*-Haplotypen gezeigt.

Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung (N=Anzahl) der *KIR*-Haplotypen bei der Kontrollgruppe (KG), Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) und Unterteilung des *KIR*-Haplotyps B mit Hilfe des *B-Content-Scores*, Cen=zentromerer Genotyp, Tel=telomerer Genotyp, A/A=homozygoter Genotyp A, B/x=heterozygoter Genotyp B

<i>KIR</i> -Genotyp	<i>B-Content-Score</i>	Cen	Tel	N (%) - KG	N (%) - CU	N (%) - MC	
A/A	0	A/A	A/A	94 (27,89 %)	29 (31,52 %)	22 (22,92 %)	
B/x	1	A/A	A/B	139 (41,25 %)	36 (39,13 %)	46 (47,92 %)	
		A/B	A/A				
	2	A/A	A/B	80 (23,74 %)	19 (20,65 %)	23 (23,96 %)	
		A/B	A/B				
		B/B	A/A				
	3	A/B	B/B	20 (5,93 %)	8 (8,70 %)	5 (5,21 %)	
		B/B	A/B				
	4	B/B	B/B	4 (1,19 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	
	B	gesamt			243 (72,11 %)	63 (68,48 %)	74 (77,08 %)

In Abbildung 16 sind die *B-Content-Scores* aller 3 Kohorten im Vergleich dargestellt.

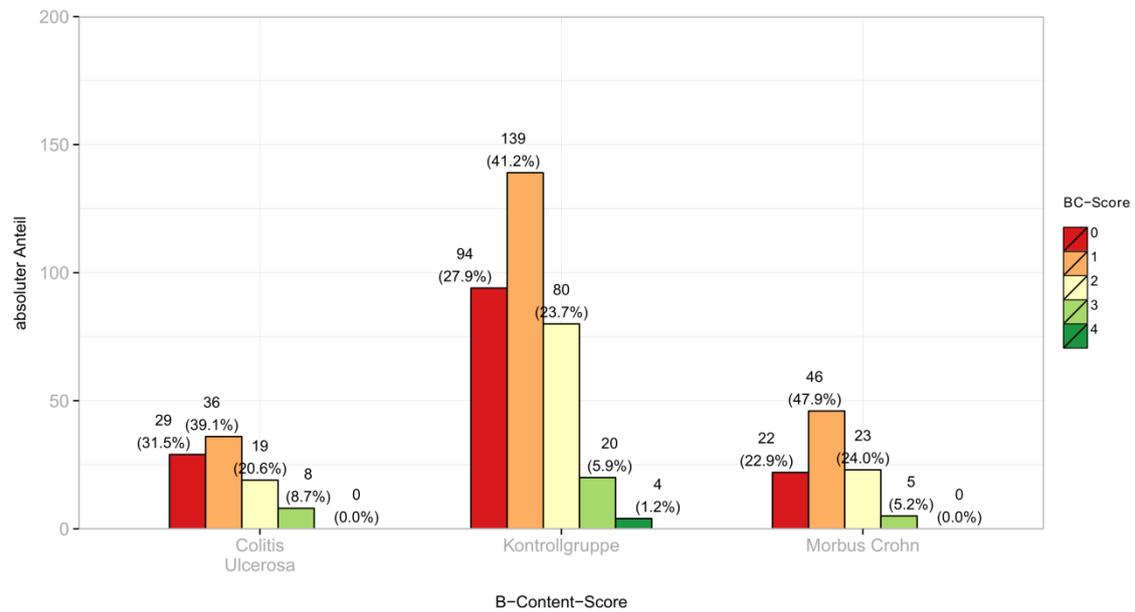


Abbildung 16: Häufigkeiten der *B-Content-Score*-Stufen 0-4 bei Colitis ulcerosa, Kontrollgruppe und Morbus Crohn

In allen drei Kohorten ist die Stufe 1 am häufigsten vertreten, gefolgt von den Stufen 0, 2, beziehungsweise 2, 0 bei MC und 3. Die Stufe 4 kommt ausschließlich in der KG vor.

Insgesamt unterscheiden sich die Gruppen hinsichtlich des *B-Content-Scores* nicht signifikant.

3.6 Vergleich der 17 *KIR*-Gene bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung mit gesunden Personen

Die *KIR*-Genotypisierung zu den Häufigkeitsverteilungen der 17 *KIR*-Gene bei Patienten mit MC und CU unterscheidet sich nicht signifikant zur Verteilung der Gene bei der KG. Abbildung 17 zeigt die Gegenüberstellung der Häufigkeitsverteilungen der *KIR*-Gene in allen drei Gruppen.

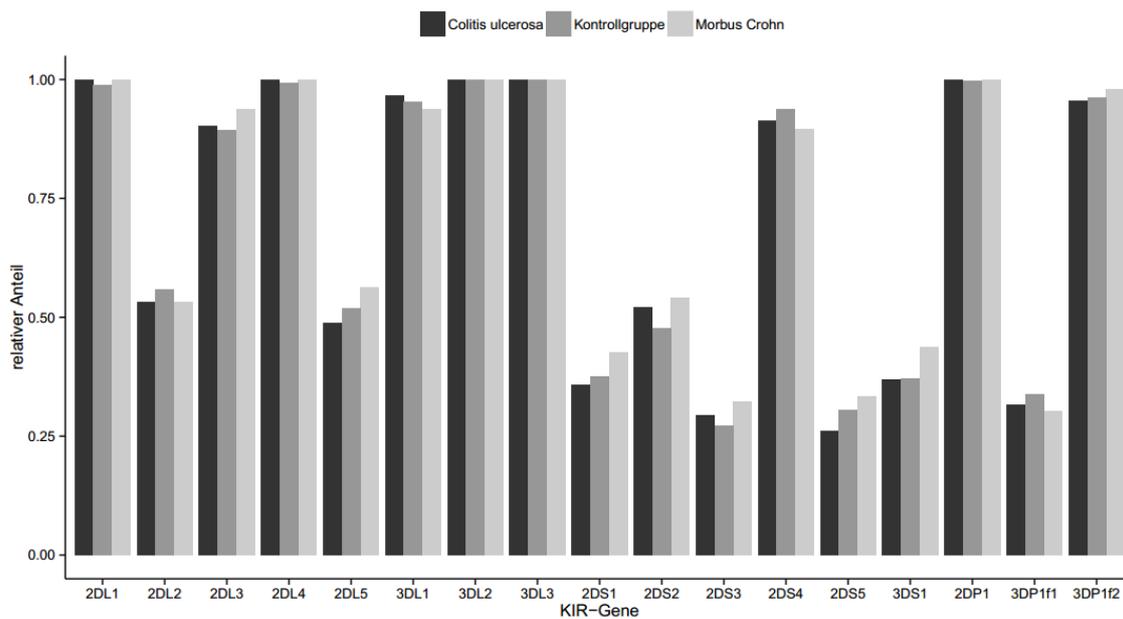


Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung der *KIR*-Gene bei Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Kontrollgruppe

Zur Beantwortung der Frage, ob es einen Zusammenhang der *KIR*-Gene mit CED im Vergleich zu Gesunden gibt, wurde für die statistische Analyse von MC und CU versus KG eine logistische Regression durchgeführt. Deren Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

3.6.1 Vergleich der *KIR*-Gene bei Morbus Crohn versus Kontrollgruppe

In einer ersten Analyse wurden die *KIR*-Gene der MC-Patienten in ihrer Gesamtheit mit denen von den gesunden Proben verglichen.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der univariaten Analyse von MC versus KG zusammengefasst.

Tabelle 16: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC, L1-L3=alle Lokalisationen) versus Kontrollgruppe (KG), OR=Odds-Ratio, KI=Konfidenzintervall

<i>KIR</i> -Gen	MC (L1-L3)	KG	OR (95 %-KI)	p-Wert
2DL1				
ja	96 (100 %)	333 (98,81 %)	-	-
nein	0 (0 %)	4 (1,19 %)		
2DL2				
ja	51 (53,12 %)	188 (55,79 %)	0,9 (0,57 - 1,42)	0,64
nein	45 (46,88 %)	149 (44,21 %)		
2DL3				
ja	90 (93,75 %)	301 (89,32 %)	1,79 (0,78 - 4,85)	0,20
nein	6 (6,25 %)	36 (10,68 %)		
2DL4				
ja	96 (100 %)	335 (99,41 %)	-	-
nein	0 (0 %)	2 (0,59 %)		
2DL5				
ja	54 (56,25 %)	175 (51,93 %)	1,19 (0,76 - 1,89)	0,45
nein	42 (43,75 %)	162 (48,07 %)		
3DL1				
ja	90 (93,75 %)	321 (95,25 %)	0,75 (0,3 - 2,13)	0,56
nein	6 (6,25 %)	16 (4,75 %)		
3DL2				
ja	96 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
3DL3				
ja	96 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		

2DS1				
ja	41 (42,71 %)	127 (37,69 %)	1,23 (0,77 - 1,95)	0,37
nein	55 (57,29 %)	210 (62,31 %)		
2DS2				
ja	52 (54,17 %)	161 (47,77 %)	1,29 (0,82 - 2,04)	0,27
nein	44 (45,83 %)	176 (52,23 %)		
2DS3				
ja	31 (32,29 %)	92 (27,30 %)	1,27 (0,77 - 2,06)	0,34
nein	65 (67,71 %)	245 (72,70 %)		
2DS4				
ja	86 (89,58 %)	316 (93,77 %)	0,57 (0,27 - 1,31)	0,17
nein	10 (10,42 %)	21 (6,23 %)		
2DS5				
ja	32 (33,33 %)	103 (30,56 %)	1,14 (0,69 - 1,83)	0,61
nein	64 (66,67 %)	234 (69,44 %)		
3DS1				
ja	42 (43,75 %)	125 (37,09 %)	1,32 (0,83 - 2,09)	0,24
nein	54 (56,25 %)	212 (62,91 %)		
2DP1				
ja	96 (100 %)	336 (99,70 %)	-	-
nein	0 (0 %)	1 (0,30 %)		
3DP1f1				
ja	29 (30,21 %)	114 (33,83 %)	0,85 (0,51 - 1,37)	0,51
nein	67 (69,79 %)	223 (66,17 %)		
3DP1f2				
ja	94 (97,92 %)	324 (96,14 %)	1,89 (0,51 - 12,2)	0,41
nein	2 (2,08 %)	13 (3,86 %)		
KIR-Haplotyp				
A	22 (22,92 %)	94 (27,89 %)	1,3 (0,77 - 2,26)	0,33
B	74 (77,08 %)	243 (72,11 %)		

B-Content-Score				
0	22 (22,92 %)	94 (27,89 %)		
1	46 (47,92 %)	139 (41,25 %)		
2	23 (23,96 %)	80 (23,74 %)		0,99
3	5 (5,21 %)	20 (5,93 %)		
4	0 (0 %)	4 (1,19 %)		

Im Gesamten betrachtet kann kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der 17 untersuchten *KIR*-Gene zwischen MC-Fällen und KG beobachtet werden (die p-Werte sind größer 5 %).

Bei den *KIR*-Genen *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* und *KIR3DP1f2* ergibt sich ein OR größer eins, was bedeutet, dass hier das Gen im Vergleich zur KG tendenziell häufiger auftritt. Bei den *KIR*-Genen *KIR2DL2*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4* und *KIR3DP1f1* liegt das OR unter eins, das heißt, das Gen kommt hier im Vergleich zur KG tendenziell seltener vor. Da sich die Odds-Ratios nicht signifikant von eins unterscheiden, kann jedoch in beiden Fällen die Hypothese, dass es keinen Unterschied zwischen MC und KG gibt, nicht widerlegt werden. Für die Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR2DP1* können keine Odds-Ratios berechnet werden, da diese Gene in einer oder in den beiden zu vergleichenden Gruppen zu 100 % auftreten. Die Verteilung der *KIR*-Haplotypen bei MC und der KG ergibt 22,92 % gegenüber 27,89 % für Haplotyp A und 77,08 % versus 72,11 % für Haplotyp B.

Bei der Analyse der *KIR*-Haplotypen zwischen MC und KG ergibt sich kein signifikanter Unterschied (OR=1,3, 95 %-KI-Intervall (0,77-2,26), p-Wert=0,33). Tendenziell ist der *KIR*-Haplotyp B bei MC im Vergleich zur KG häufiger vertreten (OR>1), jedoch auch hier von keiner statistischen Signifikanz (p>5 %). Der Vergleich des *B-Content-Scores* zwischen MC und KG mit Hilfe des *Cochran-Armitage-Trend-Tests* ergibt keinen Trend (p=0,99). Es besteht kein Unterschied innerhalb der einzelnen Stufen 0-4 zwischen MC und KG.

3.6.2 Vergleich der *KIR*-Gene bei Morbus Crohn des Kolons versus Kontrollgruppe

Auch der Vergleich der *KIR*-Gene von Patienten mit MC mit Befall des Kolons (L2) mit Gesunden ergibt keinen signifikanten Unterschied (die p-Werte sind größer 5 %). In Tabelle 17 sind die Ergebnisse gezeigt.

Tabelle 17: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit der Lokalisation L2 (Kolonbefall) versus Kontrollgruppe (KG), OR= Odds-Ratio, KI=Konfidenzintervall

<i>KIR</i> -Gen	MC L2	KG	OR (95 %-KI)	p-Wert
2DL1				
ja	19 (100 %)	333 (98,81 %)	-	-
nein	0 (0 %)	4 (1,19 %)		
2DL2				
ja	9 (47,37 %)	188 (55,79 %)	0,71 (0,28-1,81)	0,47
nein	10 (52,63 %)	149 (44,21 %)		
2DL3				
ja	18 (94,74 %)	301 (89,32 %)	2,15 (0,42-39,3)	0,46
nein	1 (5,26 %)	36 (10,68 %)		
2DL4				
ja	19 (100 %)	335 (99,41 %)	-	-
nein	0 (0 %)	2 (0,59 %)		
2DL5				
ja	10 (52,63 %)	175 (51,93 %)	1,03 (0,4-2,65)	0,95
nein	9 (47,37 %)	162 (48,07 %)		
3DL1				
ja	19 (100 %)	321 (95,25 %)	-	-
nein	0 (0 %)	16 (4,75 %)		
3DL2				
ja	19 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
3DL3				
ja	19 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		

2DS1				
ja	10 (52,63 %)	127 (37,69 %)	1,84 (0,72-4,74)	0,2
nein	9 (47,37 %)	210 (62,31 %)		
2DS2				
ja	9 (47,37 %)	161 (47,77 %)	0,98 (0,38-2,5)	0,97
nein	10 (52,63 %)	176 (52,23 %)		
2DS3				
ja	4 (21,05 %)	92 (27,30 %)	0,71 (0,2-2,02)	0,55
nein	15 (78,95 %)	245 (72,70 %)		
2DS4				
ja	18 (94,74 %)	316 (93,77 %)	1,2 (0,23-22,03)	0,86
nein	1 (5,26 %)	21 (6,23 %)		
2DS5				
ja	9 (47,37 %)	103 (30,56 %)	2,04 (0,79-5,22)	0,13
nein	10 (52,63 %)	234 (69,44 %)		
3DS1				
ja	10 (52,63 %)	125 (37,09 %)	1,88 (0,74-4,86)	0,18
nein	9 (47,37 %)	212 (62,91 %)		
2DP1				
ja	19 (100 %)	336 (99,70 %)	-	-
nein	0 (0 %)	1 (0,30 %)		
3DP1f1				
ja	6 (31,58 %)	114 (33,83 %)	0,9 (0,31-2,35)	0,84
nein	13 (68,42 %)	223 (66,17 %)		
3DP1f2				
ja	19 (100 %)	324 (96,14 %)	-	-
nein	0 (0 %)	13 (3,86 %)		
KIR-Haplotyp				
A	4 (21,05 %)	94 (27,89 %)	1,45 (0,51-5,19)	0,52
B	15 (78,95 %)	243 (72,11 %)		

B-Content-Score				
0	4 (21,05 %)	94 (27,89 %)		0,78
1	10 (52,63 %)	139 (41,25 %)		
2	5 (26,32)	80 (23,74 %)		
3	0 (0 %)	20 (5,93 %)		
4	0 (0 %)	4 (1,19 %)		

Die *KIR*-Gene *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* und *KIR3DS1* zeigen tendenziell eine häufigere Genfrequenz ($OR > 1$) gegenüber der KG, die Gene *KIR2DL2*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, und *KIR3DP1f1* zeigen tendenziell eine seltenere Genfrequenz ($OR < 1$) gegenüber der KG, jedoch mit keiner statistischen Signifikanz (die p-Werte sind größer 5 %).

Bei den *KIR*-Genen *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1* und *KIR3DP1f2* können keine Odds-Ratios berechnet werden, da diese Gene wieder in einer oder in den beiden zu vergleichenden Gruppen zu 100 % auftreten.

Die *KIR*-Haplotypen des MC im Kolon verglichen mit der KG sind mit 21,05 % versus 27,89 % bei Haplotyp A und 78,95 % gegenüber 72,11 % bei Haplotyp B ebenfalls ähnlich.

Die Analyse der *KIR*-Haplotypen ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen MC des Kolons und KG ($p=0,52$), mit einer geringen Tendenz in Richtung Haplotyp B bei MC ($OR=1,45$).

Im Vergleich der *B-Content-Scores* der beiden Gruppen ergibt sich auch hier kein signifikanter Trend ($p=0,78$).

3.6.3 Vergleich der *KIR*-Gene bei Morbus Crohn des Dünndarms (Ileum und Ileokolon) versus Kontrollgruppe

Der Vergleich der *KIR*-Gene von Patienten mit MC mit Befall des Dünndarms (Ileum und Ileokolon: L1 und L3) ergibt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (die p-Werte sind größer 5 %). Die Ergebnisse der Analyse zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit der Lokalisation L1+L3 (Ileum- und Ileokolonbefall) versus Kontrollgruppe (KG), OR=Odds-Ratio, KI=Konfidenzintervall

<i>KIR</i> -Gen	MC L1+L3	KG	OR (95 %-KI)	p-Wert
2DL1				
Ja	77 (100 %)	333 (98,81 %)	-	-
Nein	0 (0 %)	4 (1,19 %)		
2DL2				
Ja	42 (54,55 %)	188 (55,79 %)	0,95 (0,58 - 1,57)	0,84
Nein	35 (45,45 %)	149 (44,21 %)		
2DL3				
Ja	72 (93,51 %)	301 (89,32 %)	1,72 (0,71 - 5,15)	0,27
Nein	5 (6,49 %)	36 (10,68 %)		
2DL4				
Ja	77 (100 %)	335 (99,41 %)	-	-
nein	0 (0 %)	2 (0,59 %)		
2DL5				
ja	44 (57,14 %)	175 (51,93 %)	1,23 (0,75 - 2,04)	0,41
nein	33 (42,86 %)	162 (48,07 %)		
3DL1				
ja	71 (92,21 %)	321 (95,25 %)	0,59 (0,23 - 1,69)	0,29
nein	6 (7,79 %)	16 (4,75 %)		
3DL2				
ja	77 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		

3DL3				
ja	77 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
2DS1				
ja	31 (40,26 %)	127 (37,69 %)	1,11 (0,67 - 1,84)	0,67
nein	46 (59,74 %)	210 (62,31 %)		
2DS2				
ja	43 (55,84 %)	161 (47,77 %)	1,38 (0,84 - 2,29)	0,20
nein	34 (44,16 %)	176 (52,23 %)		
2DS3				
ja	27 (35,06 %)	92 (27,30 %)	1,44 (0,84 - 2,42)	0,18
nein	50 (64,94 %)	245 (72,70 %)		
2DS4				
ja	68 (88,31 %)	316 (93,77 %)	0,5 (0,23 - 1,2)	0,10
nein	9 (11,69 %)	21 (6,23 %)		
2DS5				
ja	23 (29,87 %)	103 (30,56 %)	0,97 (0,56 - 1,64)	0,90
nein	54 (70,13 %)	234 (69,44 %)		
3DS1				
ja	32 (41,56 %)	125 (37,09 %)	1,21 (0,72 - 1,99)	0,47
nein	45 (58,44 %)	212 (62,91 %)		
2DP1				
ja	77 (100 %)	336 (99,70 %)	-	-
nein	0 (0 %)	1 (0,30 %)		
3DP1f1				
ja	23 (29,87 %)	114 (33,83 %)	0,83 (0,48 - 1,41)	0,51
nein	54 (70,13 %)	223 (66,17 %)		
3DP1f2				
ja	75 (97,4 %)	324 (96,14 %)	1,5 (0,4 - 9,75)	0,60
nein	2 (2,6 %)	13 (3,86 %)		

KIR-Haplotyp				
A	18 (23,38 %)	94 (27,89 %)	1,27 (0,72 - 2,31)	0,42
B	59 (76,62 %)	243 (72,11 %)		
B-Content-Score				
0	18 (23,38 %)	94 (27,89 %)		0,88
1	36 (46,75 %)	139 (41,25 %)		
2	18 (23,38 %)	80 (23,74 %)		
3	5 (6,49 %)	20 (5,93 %)		
4	0 (0 %)	4 (1,19 %)		

Die *KIR*-Gene *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR3DS1* und *KIR3DP1f2* zeigen mit Odds-Ratio-Werten größer eins bei den MC-Fällen höhere Genfrequenzen verglichen mit der KG ($OR > 1$) und die Gene *KIR2DL2*, *KIR3DL1*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, und *KIR3DP1f1* hingegen niedrigere Genfrequenzen verglichen mit den Kontrollen ($OR < 1$). In beiden Fällen liegen die p-Werte über dem Signifikanzniveau, so dass die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied gibt, nicht abgelehnt werden kann. Für die *KIR*-Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR2DP1* können wegen 100%iger Genfrequenz bei den MC-Patienten die Odds-Ratios nicht berechnet werden.

Die *KIR*-Haplotypen der MC-Patienten mit Dünndarmbefall unterschieden sich gegenüber denen der KG mit 23,38 % versus 27,89 % für Haplotyp A und 76,62 % gegenüber 72,11 % für Haplotyp B kaum.

Der Vergleich der *KIR*-Haplotypen dieser beiden Gruppen ergibt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,45$) mit einer geringen Tendenz in Richtung Haplotyp B bei den MC-Patienten mit Dünndarmbefall im Vergleich zur KG ($OR=1,27$).

Bezüglich der *B-Content-Scores* kann kein Trend zwischen MC des Dünndarms und KG gezeigt werden ($p=0,88$).

3.6.4 Vergleich der *KIR*-Gene bei Morbus Crohn ohne Komplikationen versus Kontrollgruppe

Neben dem Vergleich des *KIR*-Profils der MC-Patienten nach ihren Lokalisationen mit Gesunden wurden die *KIR*-Gene auch entsprechend dem Befallsmuster der Erkrankung mit denen von Gesunden verglichen.

Die Analyse der *KIR*-Gene von MC ohne Komplikationen (B1) versus KG ergibt keinen signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit Befallsmuster B1 (keine Komplikationen) versus Kontrollgruppe (KG), OR=Odds-Ratio, KI=Konfidenzintervall

<i>KIR</i> -Gen	MC B1	KG	OR (95 %-KI)	p-Wert
2DL1				
ja	38 (100 %)	333 (98,81 %)	-	-
nein	0 (0 %)	4 (1,19 %)		
2DL2				
ja	20 (52,63 %)	188 (55,79 %)	0,88 (0,45 - 1,74)	0,71
nein	18 (47,37 %)	149 (44,21 %)		
2DL3				
ja	36 (94,74 %)	301 (89,32 %)	2,15 (0,62 - 13,59)	0,31
nein	2 (5,26 %)	36 (10,68 %)		
2DL4				
ja	38 (100 %)	335 (99,41 %)	-	-
nein	0 (0 %)	2 (0,59 %)		
2DL5				
ja	21 (55,26 %)	175 (51,93 %)	1,14 (0,58 - 2,27)	0,70
nein	17 (44,74 %)	162 (48,07 %)		
3DL1				
ja	37 (97,37 %)	321 (95,25 %)	1,84 (0,36 - 33,76)	0,56
nein	1 (2,63 %)	16 (4,75 %)		
3DL2				
ja	38 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		

3DL3				
ja	38 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
2DS1				
ja	16 (42,11 %)	127 (37,69 %)	1,2 (0,6 - 2,36)	0,60
nein	22 (57,89 %)	210 (62,31 %)		
2DS2				
ja	20 (52,63 %)	161 (47,77 %)	1,21 (0,62 - 2,4)	0,57
nein	18 (47,37 %)	176 (52,23 %)		
2DS3				
ja	11 (28,95 %)	92 (27,30 %)	1,08 (0,5 - 2,22)	0,83
nein	27 (71,05 %)	245 (72,70 %)		
2DS4				
ja	35 (92,11 %)	316 (93,77 %)	0,78 (0,25 - 3,4)	0,69
nein	3 (7,89 %)	21 (6,23 %)		
2DS5				
ja	14 (36,84 %)	103 (30,56 %)	1,33 (0,64 - 2,63)	0,43
nein	24 (63,16 %)	234 (69,44 %)		
3DS1				
ja	17 (44,74 %)	125 (37,09 %)	1,37 (0,69 - 2,7)	0,36
nein	21 (55,26 %)	212 (62,91 %)		
2DP1				
ja	38 (100 %)	336 (99,70 %)	-	-
nein	0 (0 %)	1 (0,30 %)		
3DP1f1				
ja	13 (34,21 %)	114 (33,83 %)	1,02 (0,49 - 2,03)	0,96
nein	25 (65,79 %)	223 (66,17 %)		
3DP1f2				
ja	37 (97,37 %)	324 (96,14 %)	1,48 (0,28 - 27,35)	0,71
nein	1 (2,63 %)	13 (3,86 %)		

KIR-Haplotyp				
A	8 (21,05 %)	94 (27,89 %)	1,45 (0,67 - 3,5)	0,37
B	30 (78,95 %)	243 (72,11 %)		
B-Content-Score				
0	8 (21,05 %)	94 (27,89 %)		0,7
1	21 (55,26 %)	139 (41,25 %)		
2	8 (21,05 %)	80 (23,74 %)		
3	1 (2,63 %)	20 (5,93 %)		
4	0 (0 %)	4 (1,19 %)		

In den *KIR*-Genen *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR3DP1f1* und *KIR3DP1f2* ist durch Odds-Ratio-Werte größer eins eine Tendenz zum häufigeren Auftreten dieser Gene bei den Patienten versus KG sichtbar. Dagegen zeigen die Gene *KIR2DL2* und *KIR2DS4* bei den Patienten ein tendenziell geringeres Auftreten im Vergleich zur KG ($OR < 1$). Diese Ergebnisse sind nicht statistisch signifikant ($p > 5\%$), so dass die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied gibt, nicht abgelehnt werden kann. Da die *KIR*-Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR2DP1* in einer oder in beiden Gruppen zu 100 % auftreten, können für diese Gene keine Odds-Ratios berechnet werden.

In den *KIR*-Haplotypen tritt der Haplotyp A zu 21,05 % bei MC mit Befallsmuster B1 versus 27,89 % bei der KG und Haplotyp B zu 78,95 % bei den Patienten versus 72,11 % bei der KG auf.

Die Analysen der *KIR*-Haplotypen dieser beiden Gruppen ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,37$) mit einem tendenziell häufigeren Auftreten des *KIR*-Haplotyps B bei den Patienten verglichen mit der KG.

Im Vergleich des *B-Content-Scores* im *Cochran-Armitage-Trend-Test* ist kein Trend zwischen MC ohne Komplikationen und Gesunden sichtbar ($p = 0,7$).

3.6.5 Vergleich der *KIR*-Gene bei Morbus Crohn mit Strikturen versus Kontrollgruppe

In der Analyse der *KIR*-Gen-Verteilung von MC-Patienten mit Strikturen im Darmlumen (B2) verglichen mit Gesunden treten die *KIR*-Gene *KIR3DL1* (OR=0,25, 95 %-KI-Intervall (0,07-0,95), p=0,04) und *KIR2DS4* (OR=0,23, 95 %-KI-Intervall (0,07-0,77), p=0,02) bei der KG signifikant häufiger auf im Vergleich zu den Patienten. Für diese beiden Gene wurde zusätzlich der Exakte Test nach Fisher mit folgenden Ergebnissen durchgeführt: *KIR3DL1*: OR=0,25, 95 %-KI (0,07-1,11), p=0,06 und *2DS4*: OR=0,23, 95 %-KI-Intervall (0,0678-0,8352), p=0,03. In den restlichen 15 *KIR*-Genen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen MC-Patienten mit Strikturen und Gesunden (p>5 %). Diese Ergebnisse sind in der Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit Befallsmuster B2 (Strikturen) versus Kontrollgruppe (KG), OR=Odds-Ratio, KI=Konfidenzintervall

<i>KIR</i> -Gen	MC B2	KG	OR (95 %-KI)	p-Wert
2DL1				
ja	18 (100 %)	333 (98,81 %)	-	-
nein	0 (0 %)	4 (1,19 %)		
2DL2				
ja	12 (66,67 %)	188 (55,79 %)	1,59 (0,6 - 4,64)	0,37
nein	6 (33,33 %)	149 (44,21 %)		
2DL3				
ja	17 (94,44 %)	301 (89,32 %)	2,03 (0,4 - 37,17)	0,50
nein	1 (5,56 %)	36 (10,68 %)		
2DL4				
ja	18 (100 %)	335 (99,41 %)	-	-
nein	0 (0 %)	2 (0,59 %)		
2DL5				
ja	12 (66,67 %)	175 (51,93 %)	1,85 (0,7 - 5,42)	0,23
nein	6 (33,33 %)	162 (48,07 %)		

3DL1				
ja	15 (83,33 %)	321 (95,25 %)	0,25 (0,07 - 0,95)	0,04
nein	3 (16,67 %)	16 (4,75 %)		
3DL2				
ja	18 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
3DL3				
ja	18 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
2DS1				
ja	10 (55,56 %)	127 (37,69 %)	2,07 (0,79 - 5,54)	0,14
nein	8 (44,44 %)	210 (62,31 %)		
2DS2				
ja	12 (66,67 %)	161 (47,77 %)	2,19 (0,83 - 6,4)	0,13
nein	6 (33,33 %)	176 (52,23 %)		
2DS3				
ja	8 (44,44 %)	92 (27,30 %)	2,13 (0,79 - 5,57)	0,12
nein	10 (55,56 %)	245 (72,70 %)		
2DS4				
ja	14 (77,78 %)	316 (93,77 %)	0,23 (0,07 - 0,77)	0,02
nein	4 (22,22 %)	21 (6,23 %)		
2DS5				
ja	6 (33,33 %)	103 (30,56 %)	1,14 (0,39 - 3,01)	0,80
nein	12 (66,67 %)	234 (69,44 %)		
3DS1				
ja	9 (50 %)	125 (37,09 %)	1,7 (0,65 - 4,45)	0,28
nein	9 (50 %)	212 (62,91 %)		
2DP1				
ja	18 (100 %)	336 (99,70 %)	-	-
nein	0 (0 %)	1 (0,30 %)		

3DP1f1				
ja	5 (27,78 %)	114 (33,83 %)	0,75 (0,24 - 2,05)	0,60
nein	13 (72,22 %)	223 (66,17 %)		
3DP1f2				
ja	0 (0 %)	324 (96,14 %)	-	-
nein	18 (100 %)	13 (3,86 %)		
KIR-Haplotyp				
A	3 (16,67 %)	94 (27,89 %)	1,93 (0,62 - 8,49)	0,31
B	15 (83,33 %)	243 (72,11 %)		
B-Content-Score				
0	3 (16,67 %)	94 (27,89 %)		0,14
1	6 (33,33 %)	139 (41,25 %)		
2	7 (38,89 %)	80 (23,74 %)		
3	2 (11,11 %)	20 (5,93 %)		
4	0 (0 %)	4 (1,19 %)		

Die *KIR*-Gene *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIRDL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* und *KIR3DS1* treten bei den Patienten tendenziell häufiger ($OR > 1$) und das *KIR*-Gen *KIR3DP1f1* tendenziell seltener im Vergleich zur KG auf, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p > 5\%$). Für die Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DP1* und *KIR3DP1f2* können keine Odds-Ratios berechnet werden, da diese Gene bei den Fällen und/oder der KG zu 100 % auftreten.

Die *KIR*-Haplotypen bei MC mit Stenosierung im Gegensatz zur KG ergibt 16,67 % versus 27,89 % für Haplotyp A und 83,33 % versus 72,11 % für Haplotyp B.

In den vergleichenden Analysen der *KIR*-Haplotypen zwischen beiden Gruppen kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,31$), mit einer geringen Tendenz in Richtung *KIR*-Haplotyp B bei den Patienten verglichen mit der KG ($OR = 1,93$).

Die *B-Content-Scores* der beiden Gruppen im Vergleich ergibt auch hier keinen Trend ($p = 0,14$).

3.6.6 Vergleich der *KIR*-Gene bei Morbus Crohn mit Penetrationen versus Kontrollgruppe

In der Analyse der *KIR*-Gene von Patienten mit penetrierendem MC (B3) kann im Vergleich zur KG kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der *KIR*-Gene beider Gruppen festgestellt werden ($p > 5\%$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit dem Befallsmuster B3 (Penetrationen) versus Kontrollgruppe (KG), OR=Odds-Ratio, KI=Konfidenzintervall

<i>KIR</i> -Gen	MC B3	KG	OR (95 %-KI)	p-Wert
2DL1				
ja	38 (100 %)	333 (98,81 %)	-	-
nein	0 (0 %)	4 (1,19 %)		
2DL2				
ja	17 (44,74 %)	188 (55,79 %)	0,64 (0,33 - 1,26)	0,20
nein	21 (55,26 %)	149 (44,21 %)		
2DL3				
ja	35 (92,11 %)	301 (89,32 %)	1,4 (0,41 - 4,77)	0,60
nein	3 (7,89 %)	36 (10,68 %)		
2DL4				
ja	38 (100 %)	335 (99,41 %)	-	-
nein	0 (0 %)	2 (0,59 %)		
2DL5				
ja	20 (52,63 %)	175 (51,93 %)	1,03 (0,53 - 2,01)	0,93
nein	18 (47,37 %)	162 (48,07 %)		
3DL1				
ja	36 (94,74 %)	321 (95,25 %)	0,9 (0,2 - 4,06)	0,89
nein	2 (5,26 %)	16 (4,75 %)		
3DL2				
ja	38 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		

3DL3				
ja	38 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
2DS1				
ja	15 (39,47 %)	127 (37,69 %)	1,08 (0,54 - 2,14)	0,83
nein	23 (60,53 %)	210 (62,31 %)		
2DS2				
ja	18 (47,37 %)	161 (47,77 %)	0,98 (0,5 - 1,93)	0,96
nein	20 (52,63 %)	176 (52,23 %)		
2DS3				
ja	11 (28,95 %)	92 (27,30 %)	1,08 (0,52 - 2,28)	0,83
nein	27 (71,05 %)	245 (72,70 %)		
2DS4				
ja	35 (92,11 %)	316 (93,77 %)	0,78 (0,22 - 2,73)	0,69
nein	3 (7,89 %)	21 (6,23 %)		
2DS5				
ja	12 (31,58 %)	103 (30,56 %)	1,05 (0,51 - 2,16)	0,90
nein	26 (68,42 %)	234 (69,44 %)		
3DS1				
ja	16 (42,11 %)	125 (37,09 %)	1,23 (0,62 - 2,44)	0,55
nein	22 (57,89 %)	212 (62,91 %)		
2DP1				
ja	38 (100 %)	336 (99,70 %)	-	-
nein	0 (0 %)	1 (0,30 %)		
3DP1f1				
ja	10 (26,32 %)	114 (33,83 %)	0,7 (0,33 - 1,49)	0,35
nein	28 (73,68 %)	223 (66,17 %)		
3DP1f2				
ja	37 (97,37 %)	324 (96,14 %)	1,48 (0,19 - 11,67)	0,71
nein	1 (2,63 %)	13 (3,86 %)		

KIR-Haplotyp				
A	11 (28,95 %)	94 (27,89 %)	0,95 (0,45 - 1,99)	0,89
B	27 (71,05 %)	243 (72,11 %)		
B-Content-Score				
0	11 (28,95 %)	94 (27,89 %)		0,58
1	17 (44,74 %)	139 (41,25 %)		
2	8 (21,05 %)	80 (23,74 %)		
3	2 (5,26 %)	20 (5,93 %)		
4	0 (0 %)	4 (1,19 %)		

Mit Odds-Ratios größer eins zeigen die *KIR*-Gene *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1* und *KIR3DP1f2* eine tendenziell höhere Frequenz bei den Patienten und mit Odds-Ratios kleiner eins zeigen die Gene *KIR2DL2*, *KIR3DL1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS4* und *KIR3DP1f1* tendenziell seltener Frequenzen bei den Patienten verglichen mit Gesunden. In beiden Fällen sind die Ergebnisse nicht signifikant ($p > 5\%$). Bei den Genen *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR2DP1* können keine Odds-Ratios bestimmt werden, da diese in einer oder in beiden Gruppen zu 100 % auftreten. Bezüglich der *KIR*-Haplotypen ist Haplotyp A zu 28,95 % bei den Patienten mit Befallsmuster 3 und zu 27,89 % bei der KG und Haplotyp B zu 71,05 % bei den Patienten versus 72,11 % bei der KG vertreten.

Die vergleichende Analyse der *KIR*-Haplotypen beider Gruppen ergibt keinen statistischen Unterschied ($p=0,89$), mit einem tendenziell höheren Auftreten von Haplotyp A bei den MC-Patienten mit Penetrationen im Gegensatz zur KG (OR=0,95).

Im Vergleich der *B-Content-Scores* der Gruppen MC mit Befallsmuster B2 und Gesunden im *Cochran-Armitage-Trend-Test* ist kein Trend ersichtlich ($p=0,58$).

3.6.7 Vergleich der *KIR*-Gene bei Colitis ulcerosa versus Kontrollgruppe

Neben der Analyse der *KIR*-Gene von MC versus KG wurde die Analyse der *KIR*-Gene bei CU gegenüber der KG durchgeführt. Auch hier ergibt die logistische Regression keinen signifikanten Unterschied im *KIR*-Profil zwischen Kranken und Gesunden ($p > 5\%$). In Tabelle 22 sind die Ergebnisse des Vergleichs der *KIR*-Gene von CU versus KG zusammengefasst.

Tabelle 22: Univariate Analyse Colitis ulcerosa (CU) versus Kontrollgruppe (KG), OR=Odds-Ratio, KI=Konfidenzintervall

<i>KIR</i> -Gen	CU	KG	OR (95 %-KI)	p-Wert
2DL1				
ja	92 (100 %)	333 (98,81 %)	-	-
nein	0 (0 %)	4 (1,19 %)		
2DL2				
ja	49 (53,26 %)	188 (55,79 %)	0,9 (0,57 - 1,44)	0,67
nein	43 (46,74 %)	149 (44,21 %)		
2DL3				
ja	83 (90,22 %)	301 (89,32 %)	1,1 (0,53 - 2,52)	0,80
nein	9 (9,78 %)	36 (10,68 %)		
2DL4				
ja	92 (100 %)	335 (99,41 %)	-	-
nein	0 (0 %)	2 (0,59 %)		
2DL5				
ja	45 (48,91 %)	175 (51,93 %)	0,89 (0,56 - 1,41)	0,61
nein	47 (51,09 %)	162 (48,07 %)		
3DL1				
ja	89 (96,74 %)	321 (95,25 %)	1,48 (0,48 - 6,46)	0,54
nein	3 (3,26 %)	16 (4,75 %)		
3DL2				
ja	92 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		

3DL3				
ja	92 (100 %)	337 (100 %)	-	-
nein	0 (0 %)	0 (0 %)		
2DS1				
ja	33 (35,87 %)	127 (37,69 %)	0,92 (0,57 - 1,49)	0,75
nein	59 (64,13 %)	210 (62,31 %)		
2DS2				
ja	48 (52,17 %)	161 (47,77 %)	1,19 (0,75 - 1,9)	0,45
nein	44 (47,83 %)	176 (52,23 %)		
2DS3				
ja	27 (29,35 %)	92 (27,30 %)	1,11 (0,66 - 1,82)	0,70
nein	65 (70,65 %)	245 (72,70 %)		
2DS4				
ja	84 (91,3 %)	316 (93,77 %)	0,7 (0,31 - 1,73)	0,41
nein	8 (8,7 %)	21 (6,23 %)		
2DS5				
ja	24 (26,09 %)	103 (30,56 %)	0,8 (0,47 - 1,33)	0,41
nein	68 (73,91 %)	234 (69,44 %)		
3DS1				
ja	34 (36,96 %)	125 (37,09 %)	0,99 (0,61 - 1,6)	0,98
nein	58 (63,04 %)	212 (62,91 %)		
2DP1				
ja	92 (100 %)	336 (99,70 %)	-	-
nein	0 (0 %)	1 (0,30 %)		
3DP1f1				
ja	29 (31,52 %)	114 (33,83 %)	0,9 (0,54 - 1,47)	0,68
nein	63 (68,48 %)	223 (66,17 %)		
3DP1f2				
ja	88 (95,65 %)	324 (96,14 %)	0,88 (0,3 - 3,19)	0,83
nein	4 (4,35 %)	13 (3,86 %)		

KIR-Haplotyp				
A	29 (31,52 %)	94 (27,89 %)	0,84 (0,51 - 1,4)	0,50
B	63 (68,48 %)	243 (72,11 %)		
B-Content-Score				
0	29 (31,52 %)	94 (27,89 %)		0,66
1	36 (39,13 %)	139 (41,25 %)		
2	19 (20,65 %)	80 (23,74 %)		
3	8 (8,70 %)	20 (5,93 %)		
4	0 (0 %)	4 (1,19 %)		

Da die Odds-Ratios der *KIR*-Gene *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR2DS2* und *KIR2DS3* über eins liegen, sind tendenziell mehr Gene bei den CU-Patienten vorhanden als bei der KG. Die Gene *KIR2DL2*, *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR3DP1f1* und *KIR3DP1f2* zeigen mit Odds-Ratios unter eins eine tendenziell geringere Genhäufigkeit bei den CU-Patienten als bei der KG. Wegen entsprechender p-Werte über dem Signifikanzniveau kann die Hypothese, dass es keinen Unterschied in den Gruppen bezüglich der *KIR*-Gene gibt, nicht widerlegt werden. Für die *KIR*-Gene *KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* und *KIR2DP1* können keine Odds-Ratios berechnet werden, da diese Gene bei CU zu 100 % auftreten.

Ein Vergleich der Verteilung der *KIR*-Haplotypen CU mit der KG ergibt 31,52 % versus 27,89 % bei Haplotyp A und 68,48 % versus 72,11 % bei Haplotyp B.

Auch die Analyse der *KIR*-Haplotypen von CU und KG im Vergleich bringt mit einem p-Wert von 0,50 keinen signifikanten Unterschied. Das Odds-Ratio (0,83) ergibt eine geringe Tendenz in Richtung Haplotyp A bei den Fällen, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,50$).

Die Auswertung des *B-Content-Scores* mit Hilfe des *Cochran-Armitage-Trend-Tests* zeigt keinen Trend zwischen CU und KG ($p=0,66$).

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die 17 *KIR*-Gene von Patienten mit CED mit dem *KIR*-Profil einer gesunden KG verglichen, um mögliche Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden hinsichtlich der *KIR*-Verteilung zu finden.

Der Vergleich der *KIR*-Gene zwischen CED-Patienten und KG wurde mit Hilfe einer logistischen Regression der mittels Real-Time PCR *KIR*-genotypisierten Proben durchgeführt.

Es wurden die Geschlechterverteilung zwischen Patienten und KG, die *KIR*-Gene von MC-Patienten, von MC-Patienten der verschiedenen Lokalisationen, von MC-Patienten der verschiedenen Befallsmuster und schließlich die *KIR*-Gene von CU-Patienten mit den *KIR*-Genen der KG verglichen.

Außerdem wurden die *KIR*-Haplotypen A und B sowie die *BC*-Scores der einzelnen Gruppen mit denen der KG verglichen.

Die statistische Auswertung ergab weder für die Gruppe der MC-Patienten, noch für die CU-Patienten einen signifikanten Unterschied in den *KIR*-Profilen zur KG.

In der Auswertung einer Subgruppe der MC-Patienten wurde für zwei *KIR*-Gene ein signifikanter Unterschied festgestellt: Bei der univariaten Analyse des *KIR*-Profils von MC-Patienten mit Strikturen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen waren die *KIR*-Gene *KIR3DL1* (OR=0,25, 95 %-KI-Intervall (0,07-0,95), p=0,04) und *KIR2DS4* (OR=0,23, 95 %-KI-Intervall (0,07-0,77), p=0,02) in der KG signifikant höher als bei den Patienten.

4 Diskussion

Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten zur Pathogenese der CED ist die tatsächliche Ursache bis heute ungeklärt geblieben.

Die Typisierung der *KIR*-Gene von Patienten mit verschiedenen Krankheiten konnte bereits weitere Hinweise in deren Krankheitsentstehung geben.

Da sowohl in vielen autoimmunologischen, chronisch entzündlichen als auch malignen Erkrankungen Assoziationen mit *KIR*-Genen gefunden wurden, sollten nun auch eventuelle Zusammenhänge von *KIR* und CED getestet werden.

Für diese Untersuchung wurden DNA-Proben von Patienten mit CED vom IKP Stuttgart zur Verfügung gestellt und mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein der 17 *KIR*-Gene typisiert. Ein Vergleich mit dem *KIR*-Profil einer KG auf Unterschiede zu den CED-Proben sollte klären, ob es mögliche Zusammenhänge zwischen dem individuellen *KIR*-Profil und dem Auftreten von MC und CU gibt.

4.1 Kritische Beurteilung des angewandten Studiendesigns

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine genetische Fall-Kontroll-Assoziationsstudie. Die Aussagekraft von Assoziationsstudien kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden und so zu mangelnder Reproduzierbarkeit und widersprüchlichen Ergebnissen führen. Um diese Störfaktoren möglichst gering zu halten, sollten einige Grundregeln für die Festlegung des Studiendesigns beachtet werden.

Die Studienpopulationen sollten in den ethnischen, sozialen und geografischen Schichten zusammenpassen, um Verfälschungen der Assoziationen aufgrund von genetischen Unterschieden in den untersuchten Populationen zu vermeiden. Ansonsten könnten genetische Unterschiede vorgetäuscht werden, welche eigentlich nicht für die Erkrankung verantwortlich sind, sondern auf der unterschiedlichen Ethnizität beruhen.

Die KG sollte neben diesen Übereinstimmungen auch im Alter und Geschlecht der Individuen an die Fallgruppe angepasst werden.

Um eine adäquate Aussagekraft zu erreichen, sollte eine ausreichend große Fall- und Kontrollzahl gewählt werden.

Es hat sich gezeigt, dass sich erst bei Fallzahlen von 1000 bis 10.000 Individuen, besonders bei der Bildung von Subgruppen, schlagkräftige Ergebnisse erzielen lassen. Zudem sollte für beide Kohorten dieselbe Genotypisierungs- und statistische Methode angewandt werden, um mögliche Unterschiede aufgrund von Methodendifferenzen zu vermeiden^{183, 184}.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Kohorten mit weitgehend alters- und geschlechtsangepassten Personen kaukasischer Abstammung miteinander verglichen. Beide Kohorten wurden im selben Labor mittels identischer Real-Time PCR und einheitlicher statistischer Analysemethoden ausgewertet.

Zur Verbesserung des Studiendesigns hätten diese noch mehr aufeinander abgestimmt werden können. Eine größere Studienpopulation, vor allem bei der Bildung von Subgruppen, sowie eine präzisere Abstimmung von Alter und geografischer Herkunft der beiden Kohorten hätten die Aussagekraft der Studie verbessern können. Zudem hätte die zeitnahe Durchführung der Versuche nach der Probenentnahme den Ausschluss von Proben durch mangelnde DNA-Qualität verhindern können. Auch die *KIR*-Genotypisierung aller Proben durch dieselbe Person hätten eventuell zu mehr Homogenität in den PCR-Auswertungen beitragen können.

4.2 *KIR*-Genotypisierung mittels Real-Time PCR

Die Expression der *KIR*-Gene wurde in der vorliegenden Studie mittels Real-Time PCR mit den Primern nach Alves *et al.* und Vilches *et al.* bestimmt^{180, 181}. Zur Detektion der PCR-Produkte wurde der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen I verwendet.

Die erste Methode zur Typisierung der *KIR*-Gene, die PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP), wurde 1997 von Uhrberg *et al.* entworfen¹⁴².

Seitdem wurde diese Methode entsprechend neuer Erkenntnisse zu den *KIR*-Genen erweitert und daraus weitere Methoden entwickelt, welche die SSP oder die verwandten sequenzspezifischen Oligonukleotide (SSO) verwenden^{181, 185,}

¹⁸⁶.

Als weitere Techniken existieren beispielsweise die Multiplex-PCR neben einigen anderen PCR-Methoden, die Massenspektrometrie und viele mehr^{186, 187}.

Wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit und eindeutigen Interpretation ist die PCR-SSP die am häufigsten angewandte Methode und bisher der Goldstandard^{188, 189}. Nachteil dieser Methode ist die nach der PCR-Amplifikation nötige anschließende Auftrennung der Produkte auf einem Agarosegel, welche sehr zeitaufwendig ist und das giftige Ethidiumbromid enthält¹⁸⁰.

Alves *et al.* entwickelten 2009 auf der Basis der Primersequenzen der PCR-SSP von Vilches *et al.* die Real-Time PCR zum *KIR*-Genotyping. Diese ermöglicht es, in einer einfachen und schnellen Technik aus einer geringen DNA-Menge die 17 *KIR*-Gene zu detektieren. Diese Methode bietet den Vorteil, in größeren Studien mit einer nachgewiesenen hohen Sensitivität und Spezifität, alle *KIR*-Gene aus einer großen Zahl an Proben zu bestimmen¹⁸⁰. Bisherige vergleichende Studien^{188, 190} zwischen Real-Time PCR und konventionellen PCR-Methoden (SSP; SSO) waren zu 100 % konkordant.

Ein Nachteil der Real-Time PCR mittels SybrGreen I ist, dass durch dessen unspezifische Bindung auch Primer-Dimere und Artefakte zu einem Fluoreszenzanstieg führen können. Zur Differenzierung zwischen Artefakt und Zielsegment dient die Schmelzpunktanalyse, welche zu unterschiedlichen Schmelzpunkten bei verschiedenen Produkten führt^{191, 192}.

In der vorliegenden Studie entstanden trotz der Anwendung der Schmelzpunktanalyse sowie einer Positiv- und Negativkontrolle bei den *KIR*-Genen *KIR2DS1* und *KIR2DL2* zum Teil nicht immer eindeutig interpretierbare Schmelzkurven. Hier fand sich trotz negativem Gen ein geringer Peak am entsprechenden Schmelzpunkt.

Eine mögliche Erklärung könnte eine Verunreinigung dieser Primer sein. Zur Validierung der dadurch nicht ganz sicher festgestellten Ergebnisse konnte die Verwendung neuer Primer bzw. die Auftrennung der entsprechenden PCR-Produkte auf einem Agarosegel die Richtigkeit der Interpretation bestätigen.

Für genauere Analysen stehen heute bereits Methoden zur Bestimmung der Genkopienzahl zur Verfügung, welche unter den Genträgern eine feinere Abstufung erlaubt¹⁹³.

4.3 Vergleich der *KIR*-Gen-Häufigkeiten mit der „Allele Frequency Net-Database“

Zur Überprüfung der ermittelten *KIR*-Gen-Häufigkeiten wurden diese mit den in der „Allele-Frequency Net-Database“ veröffentlichten Häufigkeiten verglichen¹⁹⁴.

Die Häufigkeiten der KG sind denen aus der Datenbank sehr ähnlich. In der Tabelle 23 sind die Verteilungen der *KIR*-Gene in der kaukasischen Bevölkerung Westeuropas (Datenbank 1) und diejenigen *KIR*-Gene, die aus deutschen Studien zur Verfügung standen (Datenbank 2), den Häufigkeiten der eigenen Studie gegenübergestellt.

Wie erwartet, sind die Rahmengene *KIR3DL2* und *KIR3DL3* zu 100 % vorhanden. Auffällig aber ist, dass das Rahmengen *KIR2DL4* nur zu 99,41 % vorhanden ist. Das heißt, bei zwei der 337 Personen konnte es nicht nachgewiesen werden. Dies ist ein Phänomen, welches möglich ist, aber bisher nur sehr selten berichtet wurde. Die Literatur berichtet von 10 *KIR2DL4*-negativen Individuen unter 11.732 Individuen in 105 Bevölkerungsgruppen¹⁹⁵.

Ein Fehlen dieser Gene bei zwei Personen unter 337 ausgewerteten Personen wäre daher sehr unwahrscheinlich.

Um Fehler bei der Durchführung der PCR auszuschließen und eine tatsächliche Deletion zu bestätigen, müssten hierfür weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Interessant wäre dies für weitere Studien.

Die untersuchten CED-Proben waren den veröffentlichten Häufigkeiten sehr ähnlich. Es konnte an dieser Stelle kein Hinweis auf einen Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden.

Tabelle 23: Gegenüberstellung der *KIR*-Gen-Häufigkeiten aus der vorliegenden Studie (Kontrollgruppe (KG), Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU)) und der „Allele-Frequency Net-Database“ (Datenbank 1=kaukasische Bevölkerung Westeuropas, Datenbank 2=Daten aus Deutschland)¹⁹⁴

KIR-Gen	MC	CU	KG	Datenbank 1	Datenbank 2
2DL1	100,00 %	100,00 %	98,81 %	87,8-100 %	90,9-91 %
2DL2	53,13 %	53,26 %	55,79 %	39,4-63,2 %	50,5-51 %
2DL3	93,75 %	90,22 %	89,32 %	80,3-97 %	90,9-91 %
2DL4	100,00 %	100,00 %	99,41 %	100 %	100 %
2DL5	56,25 %	48,91 %	51,93 %	40-67 %	
3DL1	93,75 %	96,74 %	95,25 %	89-98,5 %	90,9-96 %
3DL2	100,00 %	100,00 %	100,00 %	95,7-100 %	100 %
3DL3	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100 %	
2DS1	42,71 %	35,87 %	37,69 %	27-54,5 %	35-39,4 %
2DS2	54,17 %	52,17 %	47,77 %	39,4-63 %	49,5-53 %
2DS3	32,29 %	29,35 %	27,30 %	22,2-42 %	22,2-23 %
2DS4	89,58 %	91,30 %	93,77 %	85-98,5 %	94-95,9 %
2DS5	33,33 %	26,09 %	30,56 %	24-45,5 %	27,20 %
3DS1	43,75 %	36,96 %	37,09 %	29-63 %	99-100 %
2DP1	100,00 %	100,00 %	99,70 %	93,1-100 %	
3DP1f1	30,21 %	31,52 %	33,83 %		
3DP1f2	97,92 %	95,65 %	96,14 %		

4.4 Abgleich der demografischen Patientendaten mit Daten aus der Literatur

Zu den beiden Patientengruppen wurde bei der Datenerhebung das Alter, Geschlecht und bei den MC-Patienten die Krankheitslokalisation und das Befallsmuster erfasst und wie folgt mit den demografischen Daten aus der Literatur abgeglichen.

In der vorliegenden Arbeit betrug das Durchschnittsalter bei CU 29,85 Jahre und bei MC 26,59 Jahre. Dies entspricht der Angabe von 20-30 Jahren für den Altersgipfel der CED in der Literatur¹⁹.

Bei der Geschlechterverteilung waren bei den CU-Patienten mehr Frauen (CU: Frauen: 55 %, Männer: 43 %), bei den MC-Patienten mehr Männer vertreten (MC: Männer: 51 %, Frauen: 49 %).

In der Literatur wird überwiegend ein häufigeres Auftreten von CU bei Männern und MC bei Frauen beschrieben¹⁹. Dies ist genau widersprüchlich zu den selbst erhobenen epidemiologischen Daten, wobei zu berücksichtigen ist, dass diese aus einer sehr kleinen Kohorte stammen. Nach einem aktuellen *Review* wird jedoch auch durch die sehr starke Variation der Angaben bezüglich des Geschlechts eher von einem ausgeglichenen Geschlechterverhältnis ausgegangen²⁰. Da die Zahlen der Geschlechter in der vorliegenden Arbeit fast ausgeglichen sind, passen diese zur Aussage dieses *Reviews*.

Nach der Einteilung der MC-Patienten entsprechend der abgewandelten Montreal-Klassifikation war die größte Altersgruppe der MC-Patienten mit 85 Personen über 17 Jahre alt. Dies entspricht einer Studie, welche eine große Patientengruppe von 1015 MC-Patienten entsprechend der Montreal-Klassifikation untersucht hat¹⁹⁶.

Die meisten MC-Patienten hatten das Ileokolon (L3: 62,5 %) befallen und hatten bereits einen komplexen Krankheitsverlauf im Sinne von Strikturen oder Penetrationen (B2: 18,76 %, B3: 39,58 %), was ebenfalls das Ergebnis von Freeman *et al.* spiegelt¹⁹⁶.

4.5 Ergebnisse der univariaten Analysen der *KIR*-Profile zwischen CED-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Die statistische Auswertung der mittels Real-Time PCR typisierten DNA-Proben ergab weder für die Gruppe der MC-Patienten, noch für die CU-Patienten einen signifikanten Unterschied in den *KIR*-Profilen zur KG.

In der Auswertung einer Subgruppe der MC-Patienten wurde für zwei *KIR*-Gene ein signifikanter Unterschied festgestellt: Bei der univariaten Analyse des *KIR*-Profils von MC-Patienten mit Strikturen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen waren die *KIR*-Gene *KIR3DL1* (OR=0,25, 95 %-KI-Intervall (0,07-0,95), p=0,04) und *KIR2DS4* (OR=0,23, 95 %-KI-Intervall (0,07-0,77), p=0,02) in der KG signifikant höher als bei den Patienten.

Da diese Subgruppe nur eine sehr geringe Fallzahl aufweist, wird hier eher von einem Artefakt ausgegangen als von einem tatsächlichen protektiven Effekt gegenüber der Erkrankung. Um dies eindeutig abzuklären, müsste eine große Stichprobe gewählt werden.

Bei der univariaten Analyse der *KIR*-Profile hinsichtlich des Geschlechts konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In der Altersverteilung unterschieden sich die CED und KG signifikant. Wie schon in 4.1 beurteilt, hätten die beiden Gruppen in der Altersstreuung besser aufeinander abgestimmt werden können.

Bei der Gegenüberstellung der Tendenzen der einzelnen Rezeptoren fiel auf, dass das *KIR*-Gen *KIR2DL3* in allen vergleichenden Analysen bei den Patientengruppen tendenziell häufiger vorhanden war als bei den Kontrollen.

Hinsichtlich der übrigen *KIR*-Gene konnte keine einheitliche Tendenz beobachtet werden. Da es sich hierbei nur um Tendenzen handelt, kann dadurch keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Die MC-Patienten zeigten den Trend zu einem stärkeren Überwiegen des Haplotyps B im Gegensatz zu den Kontrollen. Lediglich bei MC-Patienten mit Penetration trat der Haplotyp A tendenziell häufiger auf im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den CU-Patienten hingegen wurde der Haplotyp A im Vergleich zu den Kontrollen tendenziell häufiger beobachtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte in der vorliegenden Studie kein kausaler Zusammenhang zwischen dem *KIR*-Profil und der Entstehung von CED hergestellt werden.

In der Literatur wurden zu den Zusammenhängen von *KIR* und CED in anderen Ländern mit Individuen anderer Herkunft bereits Studien veröffentlicht, welche sich mit diesen Ergebnissen vergleichen lassen.

Jones *et al.* untersuchten 2006 196 CU- und 216 Kontrollproben, unter anderem hinsichtlich 14 *KIR*-Genen, und den HLA-Cw-Liganden der *KIR2D*-Rezeptoren mit Hilfe der PCR-SSP. In einer ersten Analyse durch den Exakte Fisher-Test stellten sie einen signifikanten Anstieg von *KIR2DL2* und *KIR2DS2* bei den CU-Patienten fest. In einer anschließend durchgeführten logistischen Regression zeigten sie einen protektiven Effekt des *KIR2DL3*-Gens in Anwesenheit seines Liganden HLA-Cw Gruppe 1. Die logistische Regression zu den Genen *KIR2DL2* und *KIR2DS2* in Kombination ihrer Liganden konnte hier allerdings keine signifikanten Ergebnisse mehr liefern¹⁷².

Die selbst gewonnenen Ergebnisse hingegen ergaben für kein *KIR*-Gen der CU-Patienten in der logistischen Regression einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. *KIR2DS2* (OR: 1,19, KI: 0,75-1,9) war bei den CU-Patienten ebenfalls tendenziell häufiger vertreten als bei den Kontrollen, allerdings lagen die Tendenzen von *KIR2DL2* (OR: 0,9, KI: 0,57-1,44) und *KIR2DL3* (OR: 1,1, KI: 0,53-2,52) genau entgegengesetzt zu den Ergebnissen von Jones *et al.* Da in der eigenen Studie nur eine Typisierung nach dem *KIR*-Profil vorgenommen wurde, jedoch keine Untersuchung zu den *HLA*-Genen gemacht wurde, können daher zu deren Kombinationen keine Vergleiche mit den hier angeführten Ergebnissen gezogen werden.

Aufgrund der kleinen Untersuchungsgruppen, einer anderen Typisierungsmethode und der unterschiedlichen statistischen Auswertungsmethoden widerlegen die eigenen Messergebnisse nicht, dass *KIR2DL2*, *KIR2DS2* und *KIR2DL3* eine Veränderung bei CU-Patienten aufzeigen könnten.

Zudem kann beim Vergleich der Häufigkeiten dieser drei *KIR*-Gene der eigenen CU-Gruppe mit der von Jones *et al.*¹⁷² festgestellt werden, dass sich diese kaum unterscheiden (*KIR2DL2*: 0,533 versus 0,538, *KIR2DS2*: 0,522 versus 0,544 und *KIR2DL3*: 0,902 versus 0,877).

Bei den Häufigkeiten der KG weichen die Häufigkeiten dieser Gene mehr voneinander ab (*KIR2DL2*: 0,558 versus 0,431, *KIR2DS2*: 0,478 versus 0,440, *KIR2DL3*: 0,893 versus 0,935), wobei beide Kontrollgruppenhäufigkeiten im Bereich der Häufigkeiten der „Allele-Frequency Net-Database“¹⁹⁴ liegen und die englische mit der deutschen Kohorte an sich gut vergleichbar ist. In der Studie von Jones *et al.*¹⁷² ergeben zwei unterschiedliche statistische Auswertungen verschiedene Ergebnisse, für deren bessere Aussagekraft weitere Studien nötig wären.

2008 zeigten Zhang, Li, Liu, dass *KIR2DL1* und *KIR2DL2* bei CU und MC signifikant niedriger sind als in der KG. Auch die *KIR2DL1* HLA-C2 Kombination wurde bei CU und MC signifikant niedriger als bei den Kontrollen beobachtet.

Sie untersuchten hierzu über die PCR-SSP 100 Patienten mit CU, 73 Patienten mit MC und 106 randomisiert ethnisch abgestimmte Kontrollpersonen zur Analyse der inhibierenden *KIR*-Gene und HLA-Liganden¹⁷⁴.

In den eigenen Ergebnissen trat *KIR2DL2* ebenfalls tendenziell seltener auf, *KIR2DL1* jedoch tendenziell häufiger. Keiner der beiden unterschied sich signifikant von der KG.

Mögliche Ursachen für diese Abweichungen könnten die unterschiedlichen Genotypisierungsmethoden und die Erhebung der Daten in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen sein. Sowohl in der Studie von Zhang, Li, Liu¹⁷⁴ als auch in der vorliegenden Untersuchung sind die Kohorten sehr klein gewählt, was ebenfalls die Aussagekraft abschwächt.

2009 veröffentlichten Hollenbach *et al.* ihre Ergebnisse zu einem festgestellten Zusammenhang zwischen *KIR2DL2/KIR2DL3* und deren HLA-C Liganden und MC. Sie typisierten DNA-Proben von 1306 erwachsenen kaukasischen MC-Patienten im Vergleich zu 299 kaukasischen Kontrollpersonen bezüglich 16 *KIR*-Gen-Loci und ihrer HLA-Liganden mit Hilfe eines MALDI-TOF Massenspektrometers.

In der Verteilung der einzelnen *KIR*-Gen- und *HLA*-Gen-Häufigkeiten konnten Hollenbach *et al.* keinen signifikanten Unterschied feststellen. Auch der Vergleich der Haplotypen A und B zwischen MC und Kontrollen zeigte keinen signifikanten Unterschied¹⁷¹. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit den in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnissen.

Bei der Analyse der *KIR-HLA*-Kombinationen im Vergleich MC zu Kontrollen zeigten sie einen protektiven Effekt von *KIR2DL2* bei gleichzeitiger Abwesenheit seines *C1*-Liganden. Auch der heterozygote *KIR2DL2*, *KIR2DL3*-Genotyp bei homozygotem *HLA-C2*-Liganden ergab einen protektiven Effekt bei MC.

Bei der Anwesenheit des Liganden *C1* hingegen beobachteten sie einen prädisponierenden Effekt für den *KIR2DL2*, *KIR2DL3*-Genotyp bei MC¹⁷¹.

Die aktuellste Studie zu *KIR* und dem Zusammenhang mit CED wurde 2010 von Wilson *et al.* veröffentlicht. Sie typisierten 15 *KIR*-Gene und *HLA-I*-Liganden 248 brasilianischer Personen kaukasischer Abstammung, von denen 111 an CU und 137 an MC erkrankten und 250 Kontrollpersonen. Sie verwendeten die PCR-SSP. Sie wiesen einen signifikanten Anstieg von *KIR2DL2* bei den Kontrollen im Vergleich zu den CU-Patienten nach. Außerdem beobachteten sie ein vermehrtes Vorkommen der Genotypen *2DL2+/HLA-C lys(80)+* und *2DL1+/HLA-C Asn(80)+* bei den Kontrollen verglichen mit den CU-Patienten¹⁷³.

In den eigenen Ergebnissen waren, wie bereits oben beschrieben, keine signifikanten Unterschiede in den *KIR*-Genen zwischen Kontrollen und CED-Patienten feststellbar. Das *KIR*-Gen *KIR2DL2* zeigte aber ebenfalls eine Tendenz in Richtung Überwiegen bei den Kontrollen im Vergleich zu den CU-Patienten.

Insgesamt betrachtet führt der Vergleich der verschiedenen Studien zu keiner einheitlichen Aussage bezüglich des Zusammenhangs zwischen *KIR*-Profil und CED. Die Ergebnisse zu den einzelnen *KIR*- und *HLA*-Genen sind entweder nicht signifikant oder widersprechen sich in den verschiedenen Studien (*KIR2DL2*-Verminderung bei CU bei Zhang, Li, Liu¹⁷⁴, Wilson *et al.*¹⁷³ und *KIR2DL2*-Überwiegen bei CU bei Jones *et al.*¹⁷²).

Ein Überwiegen einer der beiden Haplotypen A oder B konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Ein protektiver Effekt von *KIR2DL2* bei CU wurde in drei Studien gezeigt^{171, 173, 174}, allerdings mit unterschiedlichen *HLA*-Liganden^{171, 173, 174}.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Analyse der *KIR*- oder *HLA*-Genotypen alleine bisher keine eindeutigen Aussagen zum Zusammenhang mit MC ermöglichten, jedoch deren Kombinationen einen Zusammenhang mit den Erkrankungen vermuten lassen.

4.6 Die Rolle und mögliche Relevanz von natürlichen Killerzellen und KIR in der Pathogenese von CED

Einige Genassoziationen mit CED haben bereits zur Entdeckung unterschiedlicher Störungen in den verschiedenen Abwehrmechanismen des intestinalen Immunsystems geführt. Beginnend von Defekten in der äußersten Schutzschicht durch das mazinbedeckte Epithel, welches zusammen mit antimikrobiellen Peptiden vor eindringenden Mikroorganismen schützt, über Defekte bei der Erkennung von Fremdmolekülen über NOD und TLR bis zu Störungen bei der gezielten Abwehr durch T- und B-Zellen des adaptiven Immunsystems. Dadurch konnten zwar schon zahlreiche einzelne Pathomechanismen aufgedeckt werden, es bleibt jedoch weiterhin immer noch deren Gesamtzusammenspiel mit dem entscheidenden Auslösemechanismus unklar. Geht man beispielsweise als Ursache von einem Barrieredefekt aus, welcher alle weiteren Immunprozesse triggert, bleibt die Erklärung für die verschiedenen extraintestinalen Manifestationen offen. Daher wird stetig nach weiteren beteiligten Faktoren geforscht, welche zu einem besseren Verständnis des Gesamtkrankheitsbildes und deren effektiven Therapie beitragen können. Dass das angeborene Immunsystem und die Regulation der Th1/Th2-Balance für die Pathophysiologie der CED wichtig sind, haben bereits auch Genassoziationen gezeigt¹⁷¹.

So könnten die NK-Zellen mit ihren wichtigsten regulierenden Rezeptoren, den KIR, als „Brückenglied“ zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem einen weiteren bisher noch wenig erforschten Part in der Pathogenese der CED einnehmen.

Da die allgemeine NK-Zellfunktion in der Einleitung beschrieben wurde, soll nun auf deren Funktion im Darm und bei CED näher eingegangen werden.

NK-Zellen befinden sich neben weiteren ihnen sehr ähnlichen Zellen im darmassoziierten lymphatischen Gewebe. Gemeinsam mit diesen Zellen, den *lineage marker-negative* (LIN⁻)-Zellen und *lymphoid tissue-inducer* (LTi)-Zellen, werden sie als *innate lymphoid cells* (ILCs) bezeichnet. Sie werden anhand ihrer Zytokinproduktion in drei Gruppen eingeteilt. Die NK-Zellen werden der Gruppe 1 zugeordnet, da sie Zytokine vom Typ 1 (insbesondere IFN γ und TNF) sezernieren. Die beiden anderen Zellgruppen sezernieren andere Zytokine und besitzen nicht wie die NK-Zellen KIR-Rezeptoren¹⁰⁷. Die verschiedenen Untergruppen dieser Zellpopulation konnten in einigen Untersuchungen in pathologischen Prozessen von CED beobachtet werden, von denen hier ein paar Beispiele genannt werden:

Die Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-22 und IFN γ haben eine bedeutende Rolle innerhalb der Immunprozesse im Darm bei Patienten mit CED. Ihre Sekretion wird zwar zum Großteil den T_H-Zellen zugeschrieben, aber ein geringer Teil wird auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen, natürlichen Killer T-Zellen und NK-Zellen sezerniert¹⁹⁷. Über sie werden beispielsweise Signalwege aktiviert, welche zur Freisetzung antimikrobieller Substanzen führen¹⁹⁸.

Eine funktionelle Rolle der ILCs bei CED konnte beispielsweise in Mausmodellen gezeigt werden. Eine Kolitis, bei der vermehrt ILCs nachgewiesen wurden, welche neben weiteren Zellen Thy1 exprimieren, nahm bei deren Entfernung durch einen spezifischen Antikörper gegen Thy1 ab. Gleichzeitig war eine verminderte Konzentration an IFN γ , IL-22 und TNF nachweisbar¹⁹⁹.

So konnte gezeigt werden, dass ILCs durch die Sekretion von IFN γ und IL-17A als Antwort auf IL-23 zur Entwicklung einer intestinalen Entzündung beitragen¹⁰⁸.

Eine Rolle von ILCs bei CU wurde in einem weiteren Mausmodell nachgewiesen. Die Mäuse bildeten während den Entzündungsprozessen im Darm vermehrt IL-17A sezernierende ILCs der Gruppe 3. Die Behandlung mit Thy1 spezifischen Antikörpern verbesserte die Erkrankung²⁰⁰.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte ILCs über die Expression des Transkriptionsfaktors *retinoic acid receptor-related orphan receptor* (ROR γ t) die intestinale Homöostase während der Kolonisation intestinaler Mikrobiota erhalten. Beim Fehlen dieses Faktors (durch das Fehlen von z. B. der LTI-Zellen) kommt es u. a. zur gestörten Lymphfollikelbildung²⁰¹. Bei MC wurden während den entzündlichen Prozessen im Darm vermehrt verschiedene zytokinproduzierende ILCs nachgewiesen²⁰². Verschiedene schon länger zurückliegende Studien wiesen eine verminderte NK-Zell-Zytotoxizität bei Patienten mit CU nach^{203, 204}.

Anhand dieser genannten Einflüsse der ILCs wird deutlich, dass NK-Zellen eine Rolle in der intestinalen Entzündung einnehmen, neben ihnen jedoch auch die beiden anderen Gruppen der ILCs vermehrt in den Entzündungsreaktionen beteiligt sind.

Eine mögliche Erklärung für die Entstehung von CED durch veränderte NK-Zell-Funktionen ist auch ihre Regulation über KIR. Ein denkbares Modell wären die unterschiedlichen Affinitäten von aktivierenden und hemmenden Genen zu ihren HLA-Liganden.

Abhängig vom Genotyp und dem Vorkommen oder Fehlen entsprechender HLA-Liganden käme es zu individuell unterschiedlichen Zellantworten mit ausgeprägter Aktivierung, einem Gleichgewicht der NK-Zell-Reaktion, einer ausgeprägten Hemmung oder eine Mischung aus aktivierenden und hemmenden Reaktionen.

Dieses Modell diene bereits in einigen Studien für die Erklärung protektiver oder prädisponierender Effekte im Zusammenhang von KIR und Krankheit¹⁷³.

Andersherum wäre eine Veränderung der KIR-Expression durch die Einflüsse der chronischen Entzündung ebenso denkbar.

Während bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen vorwiegend aktivierende KIR als prädisponierender Faktor nachgewiesen wurden, lässt sich diese Hypothese, dass aktivierende KIR bei CED fördernden Einfluss besitzen und hemmende KIR schützend wirken, zum aktuellen Zeitpunkt nicht bestätigen¹⁷¹⁻¹⁷⁴.

4.7 Schlussfolgerungen

Bis heute konnten zahlreiche Suszeptibilitätsgene zur Bedeutung der verschiedenen Pathomechanismen im angeborenen und erworbenen Immunsystem bei CED beitragen.

Zahlreiche Hinweise auf Einflüsse der *KIR*-Gene in Bezug auf entzündliche Erkrankungen haben zu der Hypothese geführt, dass es einen möglichen Zusammenhang zwischen dem *KIR*-Profil und CED geben könnte.

Bisherige Studien sowie die Ergebnisse dieser Arbeit konnten noch keinen einheitlichen Nachweis für den Einfluss der *KIR*-Gene bei den CED erbringen.

Die Absicht, weitere Aufschlüsse in der Pathogenese der bisher immer noch ungeklärten Ursache der CED zu finden, konnte dadurch noch nicht erfüllt werden.

4.8 Konsequenzen, Ausblicke und Ansätze für mögliche weiterführende Experimente und Studien

Gewisse Tendenzen in den statistischen Analysen dieser Arbeit sowie die Ergebnisse aus den Studien von Jones *et al.*, Zhang *et al.*, Hollenbach *et al.* und Wilson *et al.*¹⁷¹⁻¹⁷⁴ könnten auf einen Zusammenhang zwischen *KIR* und CED hinweisen. Vermisst wird aber noch eine einheitliche Richtung, welche *KIR/HLA*-Kombinationen bei den CED eine Rolle spielen.

Mögliche Ursachen liegen vermutlich in unterschiedlichen Vorgehensweisen, wie verschiedenen Genotypisierungs- und statistischen Auswertmethoden sowie der Verwendung von zu geringen Fallzahlen, fehlender Testung des Hardy-Weinberg-Equilibriums oder nur wenig abgestimmten KG. Zudem wird die statistische Aussagekraft bezüglich der *KIR* durch die stochastische Ausbildung ihrer Rezeptoren erschwert¹⁵¹.

Interessant für zukünftige Studien in dieser Thematik wären große Untersuchungen mit Fallzahlen von 1000 Individuen und mehr, bei welchen nicht nur das Augenmerk auf die einzelnen *KIR*-Gen- und *HLA*-Gen-Verteilungen gelegt wird, sondern all ihre möglichen Interaktionen miterfasst werden. Um die Ergebnisse einer Studie mit weiteren Studien vergleichen zu können, müssten diese in einer einheitlichen Form durchgeführt werden.

Gleichzeitig ist die Regulation der NK-Zellen über KIR noch nicht vollständig aufgeklärt. Die aktivierenden und hemmenden Funktionen sowie vor allem die Liganden für aktivierende KIR sind noch lückenhaft¹⁵¹.

Zur besseren Einschätzbarkeit der Rolle der NK-Zellen bei den CED, könnten weitere Studien zu NK-Zellen und ihren eng verwandten Zellen in ihren unterschiedlichen Lokalisationen und ihrem Zytokinmilieu nützlich sein.

Es existieren zwar bisher einige Marker und Gene, welche NK-Zell spezifisch sind, aber diese überlappen häufig mit denen von T-Zellen und natürlichen Killer-T-Zellen, was die Untersuchung mit Knockout-Mäusen und gezielter Depletion schwierig macht²⁰⁵.

Bereits heute kann das Wissen über die NK-Zell-Funktion zur Therapie, vor allem von Tumoren und Leukämien, eingesetzt werden¹¹⁹.

Eine der bedeutsamsten Rollen spielt der *KIR*-Haplotyp bei der Auswahl eines geeigneten Spenders für die Stammzelltransplantation bei der adulten AML. Bei den *KIR* B Haplotypen wurden weniger Rezidive und ein verbessertes krankheitsfreies Überleben als beim Haplotyp A beobachtet¹⁴⁸. Speziell für das *KIR*-Gen *KIR3DS1* wurden weniger Graft-versus-Host-Erkrankungen beobachtet als bei *KIR3DS1*-negativen Patienten²⁰⁶. Auch der aktivierende *KIR2DS1*-Rezeptor scheint eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von NK-Zell-Alloreaktivität einzunehmen²⁰⁷. Durch diese Erkenntnisse können gezielt die Spender mit geeignetem *KIR*-Typ ausgewählt werden.

Sollte es weiterhin gelingen, die Funktion der NK-Zellen und deren Regulation über KIR-Rezeptoren noch detaillierter aufzudecken, wäre ein Beitrag für spezifischere Therapieansätze auch bei Erkrankungen wie dem MC und der CU denkbar.

5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), mit deren Hauptvertreter Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), haben eine multifaktorielle Pathogenese. In der Literatur wird von einem Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, unterschiedlichen Dysregulationen im Immunsystem sowie dem Einfluss von verschiedenen Umweltfaktoren ausgegangen. Trotz zahlreicher Forschungsergebnisse in diesen Bereichen ist die tatsächliche Ursache bis heute noch ungeklärt.

Durch den Nachweis von 163 Suszeptibilitätsgenen konnten verschiedene Pathomechanismen, sowohl im angeborenen als auch im erworbenen intestinalen Immunsystem, aufgedeckt werden. Als „Brückenglied“ zwischen diesen beiden Abwehrmechanismen erfüllen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bedeutende Rollen in der Spontanabwehr entarteter und virusinfizierter Zellen. Deren Funktion wird unter anderem über die Interaktion von aktivierenden und hemmenden *killer cell immunoglobulin-like-receptors* (KIR) mit ihren *human leukocyte-antigen* (HLA)-Liganden gesteuert. Die Typisierung des *KIR*-Profils von *Patienten* verschiedener Erkrankungen konnte bereits weitere Aufschlüsse in deren Krankheitsentstehung geben. Verschiedenste Hinweise, wie beispielsweise Ähnlichkeiten der CED mit Erkrankungen mit bekanntem Zusammenhang zu *KIR* oder Voruntersuchungen in anderen Bevölkerungsgruppen, deuten auf mögliche Zusammenhänge zwischen den *KIR*-Genen und CED hin.

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der *KIR*-Gene in der Entstehung von CED geklärt werden.

Hierzu wurden DNA-Proben von 188 kaukasischen Patienten mit CED (davon 96 von MC-Patienten und 92 von CU-Patienten) auf das Vorhandensein von 17 *KIR*-Genen mittels Real-Time PCR getestet.

Der Vergleich der typisierten CED-Proben mit dem *KIR*-Profil 337 darmgesunder kaukasischer Personen sollte Aufschlüsse darüber geben, ob es eine Abweichung im *KIR*-Profil von Patienten mit CED im Vergleich zu Gesunden gibt.

Die statistische Auswertung der 17 *KIR*-Gene von Patienten gegenüber Kontrollen wurde mit Hilfe einer logistischen Regression durchgeführt.

Es konnte weder für die MC-Gruppe noch für die CU-Gruppe ein signifikanter Unterschied in den *KIR*-Profilen zwischen Kranken und Gesunden festgestellt werden. Auch der Vergleich der ermittelten *KIR*-Haplotypen zwischen Fällen und Kontrollen ergab keinen Unterschied. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem individuellen *KIR*-Profil und der Entstehung von CED hergestellt werden.

Vorausgegangene Studien in anderen Ländern zu dieser oder ähnlichen Fragestellungen konnten zwar Zusammenhänge zwischen *KIR*-*HLA* und CED herstellen, doch weichen deren Ergebnisse bisher stark voneinander ab.

Weitere Untersuchungen, bei denen auf größere Fallzahlen Wert gelegt wird, werden daher nötig sein, um eine allgemein gültige Aussage für die *KIR*-Rezeptoren und ihrer Bedeutung für CED treffen zu können. Darüber hinaus könnten weiterführende Forschungen zur Funktion der NK-Zellen und ihrer Regulation über das *KIR*-*HLA*-System bei der Interpretation der Studien zu *KIR* weiterhelfen.

Dies könnte neben der weiteren Aufdeckung der Ursachen der CED eventuell sogar zur Entwicklung spezifischerer Therapieformen für die Patienten mit CED beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham C and Cho JH (2009) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*; 361(21): 2066-2078.
2. Baumgart DC (2009) The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*; 106(8): 123-133.
3. Herold G and Mitarbeiter (2012) *Innere Medizin*, Dr. med. Gerd Herold: Köln, pp 469-476.
4. Baumgart DC and Sandborn WJ (2012) Crohn's disease. *Lancet*; 380(9853): 1590-1605.
5. Renz-Polster H, Krautzig S and Braun J (2008) *Basislehrbuch Innere Medizin*, Urban und Fischer: München, pp 626-636.
6. Endoskopischer Befund des Praxiszentrums Freiburg Gemeinschaftspraxis für Leber-, Magen-, Darm- und Stoffwechselkrankheiten Prof. Dr. med. Martin Rössle, Dr. med. Michael Huber, Dr. med. Volker Siegerstetter: Terminales Ileum (Dünndarm) bei Morbus Crohn. Schwellung der Schleimhaut und charakteristisches Pflastersteinrelief. www.praxiszentrum-freiburg.de. 2012. (Zugriff: 29.09.2013)
7. Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Hauser W, Herrlinger K, Hohne W, Koletzko S, Kriegelstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF and Zeitz M (2008) S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn". *Z Gastroenterol*; 46(9): 1094-1146.
8. Canavan C, Abrams KR and Mayberry J (2006) Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*; 23(8): 1097-1104.
9. Latella G and Papi C (2012) Crucial steps in the natural history of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*; 18(29): 3790-3799.
10. Goldstein N and Dulai M (2006) Contemporary morphologic definition of backwash ileitis in ulcerative colitis and features that distinguish it from Crohn disease. *Am J Clin Pathol*; 126(3): 365-376.

11. Endoskopiebilder der Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Ulm: Colitis ulcerosa mit diffuser Schleimhautblutung und landkartenartigen Erosionen. <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/kliniken/innere-medizin/klinik-fuer-innere-medizin-i/home/klinische-schwerpunkte/ambulanzen/chronisch-entzuendliche-darmerkrankungen/endo/endobilder.html> 11.04.2013. (Zugriff: 28.08.2013)
12. Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, Bokemeyer B, Fichtner-Feigl S, Hagel S, Herrlinger KR, Jantschek G, Kroesen A, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Reinshagen M, Rogler G, Schleiermacher D, Schmidt C, Schreiber S, Schulze H, Stange E, Zeitz M, Hoffmann JC and Stallmach A (2011) Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011. *Z Gastroenterol*; 49(9): 1276-1341.
13. Eaden JA, Abrams KR and Mayberry JF (2001) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*; 48(4): 526-535.
14. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V, Prinz Vavricka BM, Zeitz J, Rogler G and Schoepfer AM (2011) Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol*; 106(1): 110-119.
15. Rothfuss KS, Stange EF and Herrlinger KR (2006) Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*; 12(30): 4819-4831.
16. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ and Sutherland LR (2000) A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*; 6(1): 8-15.
17. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S and Colombel JF (2006) The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*; 55(6): 749-753.
18. 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, Pena AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S and Warren BF (2005) 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*; 19 Suppl A: 5-36.

19. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P and Cortot A (2011) Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*; 140(6): 1785-1794.
20. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW and Kaplan GG (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*; 142(1): 46-54 e42; quiz e30.
21. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC and Sandborn WJ (2012) Ulcerative colitis. *Lancet*; 380(9853): 1606-1619.
22. Ott C, Obermeier F, Thielers S, Kemptner D, Bauer A, Scholmerich J, Rogler G and Timmer A (2008) The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 20(9): 917-923.
23. Timmer A and Goebell H (1999) Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995-a prospective study in an urban population in Germany. *Z Gastroenterol*; 37(11): 1079-1084.
24. Declercq C, Gower-Rousseau C, Vernier-Massouille G, Salleron J, Baldé M, Poirier G, Lerebours E, Dupas JL, Merle V, Marti R, Duhamel A, Cortot A, Salomez JL and Colombel JF (2010) Mapping of inflammatory bowel disease in northern France: spatial variations and relation to affluence. *Inflamm Bowel Dis*; 16(5): 807-812.
25. Abakar-Mahamat A, Filippi J, Pradier C, Dozol A and Hébuterne X (2007) Incidence of inflammatory bowel disease in Corsica from 2002 to 2003. *Gastroenterol Clin Biol*; 31(12): 1098-1103.
26. Loftus EV, Jr. (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*; 126(6): 1504-1517.
27. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, Mantzaris G, Reinisch W, Colombel JF, Vermeire S, Travis S, Lindsay JO and van Assche G (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*; 6(10): 965-990.
28. Van Assche G, Dignass A, Panes J, Beaugerie L, Karagiannis J, Allez M, Ochsenkühn T, Orchard T, Rogler G, Louis E, Kupcinskas L, Mantzaris G, Travis S and Stange E (2010) The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*; 4(1): 7-27.

29. Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*; 347(6): 417-429.
30. Stange EF (2013) Inflammatory bowel disease - the past 50 years. *Z Gastroenterol*; 51(4): 371-377.
31. Torres MI and Rios A (2008) Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol*; 14(13): 1972-1980.
32. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M and Kontula K (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*; 12(23): 3668-3672.
33. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI and Binder V (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*; 324(2): 84-88.
34. Probert CS, Jayanthi V, Hughes AO, Thompson JR, Wicks AC and Mayberry JF (1993) Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut*; 34(11): 1547-1551.
35. Nunes T, Fiorino G, Danese S and Sans M (2011) Familial aggregation in inflammatory bowel disease: is it genes or environment? *World J Gastroenterol*; 17(22): 2715-2722.
36. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF and Rotter JI (1989) Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*; 96(4): 1016-1020.
37. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR and Rotter JI (1993) Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut*; 34(4): 517-524.
38. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A and Schreiber S (2008) Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis*; 14(7): 968-976.

39. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagace C, Scott R, Amininejad L, Bumpstead S, Baidoo L, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Colombel JF, Denson LA, De Vos M, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Fehrmann RS, Floyd JA, Florin T, Franchimont D, Franke L, Georges M, Glas J, Glazer NL, Guthery SL, Haritunians T, Hayward NK, Hugot JP, Jobin G, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, McGovern DP, Milla M, Montgomery GW, Morley KI, Mowat C, Ng A, Newman W, Ophoff RA, Papi L, Palmieri O, Peyrin-Biroulet L, Panes J, Phillips A, Prescott NJ, Proctor DD, Roberts R, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Schumm P, Seibold F, Sharma Y, Simms LA, Seielstad M, Steinhart AH, Targan SR, van den Berg LH, Vatn M, Verspaget H, Walters T, Wijmenga C, Wilson DC, Westra HJ, Xavier RJ, Zhao ZZ, Ponsioen CY, Andersen V, Torkvist L, Gazouli M, Anagnou NP, Karlsen TH, Kupcinskis L, Sventoraityte J, Mansfield JC, Kugathasan S, Silverberg MS, Halfvarson J, Rotter JI, Mathew CG, Griffiths AM, Gearry R, Ahmad T, Brant SR, Chamaillard M, Satsangi J, Cho JH, Schreiber S, Daly MJ, Barrett JC, Parkes M, Annesse V, Hakonarson H, Radford-Smith G, Duerr RH, Vermeire S, Weersma RK and Rioux JD (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*, 43(3): 246-252.
40. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, van Gossom A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panes J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhart AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annesse V, Hakonarson H, Daly MJ and Parkes M (2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*, 42(12): 1118-1125.

41. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar JP, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Buning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, De Jong D, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Gearry R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsen TH, Kupcinskas L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JI, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, De Vos M, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H, Silverberg MS, Annese V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC and Cho JH (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*; 491(7422): 119-124.
42. 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 and Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; 411(6837): 599-603.
43. 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 and Cho JH (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*; 411(6837): 603-606.
44. Brand S (2013) Moving the genetics of inflammatory bowel diseases from bench to bedside: first steps towards personalised medicine. *Gut*.
45. Kellermayer R (2012) Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol*; 26(12): 909-915.
46. Desai HG and Gupte PA (2005) Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation? *Indian J Gastroenterol*; 24(1): 23-24.
47. Hou JK, El-Serag H and Thirumurthi S (2009) Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *Am J Gastroenterol*; 104(8): 2100-2109.

48. Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, Gao ZX, Guo ZR and Wang Z (2005) Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis*; 6(4): 175-181.
49. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M and Blanchard JF (2006) A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*; 101(5): 993-1002.
50. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET and Coggon D (1994) Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet*; 343(8900): 766-767.
51. López-Serrano P, Perez-Calle JL, Perez-Fernandez MT, Fernandez-Font JM, Boixeda de Miguel D and Fernandez-Rodriguez CM (2010) Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol*; 45(12): 1464-1471.
52. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, Cattan S, Gendre JP and Cosnes J (2001) Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*; 96(7): 2113-2116.
53. Calkins BM (1989) A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*; 34(12): 1841-1854.
54. Seksik P, Nion-Larmurier I, Sokol H, Beaugerie L and Cosnes J (2009) Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*; 15(5): 734-741.
55. Tuvlin JA, Raza SS, Bracamonte S, Julian C, Hanauer SB, Nicolae DL, King AC and Cho JH (2007) Smoking and inflammatory bowel disease: trends in familial and sporadic cohorts. *Inflamm Bowel Dis*; 13(5): 573-579.
56. García Rodríguez LA, Ruigomez A and Panes J (2006) Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 130(6): 1588-1594.
57. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA and Riddle MS (2008) Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 135(3): 781-786.
58. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L and Colombel JF (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*; 127(2): 412-421.

59. Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P and Vermeire S (2011) Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*; 60(5): 631-637.
60. Nuding S, Zabel LT, Enders C, Porter E, Fellermann K, Wehkamp J, Mueller HA and Stange EF (2009) Antibacterial activity of human defensins on anaerobic intestinal bacterial species: a major role of HBD-3. *Microbes Infect*; 11(3): 384-393.
61. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP and O'Toole PW (2011) Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108 Suppl 1: 4586-4591.
62. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI and Knight R (2009) Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*; 326(5960): 1694-1697.
63. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, Henrissat B, Knight R and Gordon JI (2011) Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*; 332(6032): 970-974.
64. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N and Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104(34): 13780-13785.
65. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E and Hammer RE (1994) The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*; 180(6): 2359-2364.
66. Thompson GR and Trexler PC (1971) Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut*; 12(3): 230-235.
67. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, Zhu W, Sartor RB, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR and Li E (2011) Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*; 17(1): 179-184.

68. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M and Lochs H (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 122(1): 44-54.
69. Van Klinken BJ, van der Wal JW, Einerhand AW, Buller HA and Dekker J (1999) Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut*; 44(3): 387-393.
70. Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, Gambiez L, Geboes K, Ectors N, Delescaut MP, Degand P, Aubert JP, Colombel JF and Porchet N (1999) Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*; 5(1): 24-32.
71. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W and Schulzke JD (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*; 129(2): 550-564.
72. Turner JR (2006) Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*; 169(6): 1901-1909.
73. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M and Schulzke JD (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*; 56(1): 61-72.
74. Jäger S, Stange EF and Wehkamp J (2013) Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. *Langenbecks Arch Surg*; 398(1): 1-12.
75. Koslowski MJ, Teltschik Z, Beisner J, Schaeffeler E, Wang G, Kübler I, Gersemann M, Cooney R, Jewell D, Reinisch W, Vermeire S, Rutgeerts P, Schwab M, Stange EF and Wehkamp J (2012) Association of a functional variant in the Wnt co-receptor LRP6 with early onset ileal Crohn's disease. *PLoS Genet*; 8(2): e1002523.
76. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Jr., Fellermann K, Ganz T, Stange EF and Bevins CL (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102(50): 18129-18134.

77. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM and Stange EF (2003) Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*; 9(4): 215-223.
78. Baumgart DC, Metzke D, Guckelberger O, Pascher A, Grotzinger C, Przesdzing I, Dorffel Y, Schmitz J and Thomas S (2011) Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*; 166(1): 46-54.
79. Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B and Dignass AU (2005) Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut*; 54(2): 228-236.
80. Baumgart DC, Thomas S, Przesdzing I, Metzke D, Bielecki C, Lehmann SM, Lehnardt S, Dorffel Y, Sturm A, Scheffold A, Schmitz J and Radbruch A (2009) Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*; 157(3): 423-436.
81. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA and Stagg AJ (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*; 129(1): 50-65.
82. Shen X, Shi R, Zhang H, Li K, Zhao Y and Zhang R (2010) The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Digestion*; 81(2): 69-77.
83. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, Ferguson DJ, Campbell BJ, Jewell D and Simmons A (2010) NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*; 16(1): 90-97.
84. Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG and Ma X (2009) A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol*; 10(5): 471-479.
85. 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 and Playford RJ (2005) Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*; 365(9473): 1794-1796.
86. Levine B, Mizushima N and Virgin HW (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*; 469(7330): 323-335.

87. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, Magalhaes JG, Yuan L, Soares F, Chea E, Le Bourhis L, Boneca IG, Allaoui A, Jones NL, Nunez G, Girardin SE and Philpott DJ (2010) Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*; 11(1): 55-62.
88. Izcue A, Coombes JL and Powrie F (2006) Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev*; 212: 256-271.
89. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T and Watanabe M (2004) CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol*; 173(5): 3119-3130.
90. Mosmann TR and Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*; 7: 145-173.
91. Rothoefl T, Gonschorek A, Bartz H, Anhenh O and Schauer U (2003) Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells. *Immunology*; 110(4): 430-439.
92. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T and Fujiyama Y (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*; 52(1): 65-70.
93. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K and Hibi T (2008) IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*; 57(12): 1682-1689.
94. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P and Strober W (2004) Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*; 113(10): 1490-1497.
95. Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J and Schulzke JD (2008) Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol*; 1 Suppl 1: S58-61.

96. Olson TS, Bamias G, Naganuma M, Rivera-Nieves J, Burcin TL, Ross W, Morris MA, Pizarro TT, Ernst PB, Cominelli F and Ley K (2004) Expanded B cell population blocks regulatory T cells and exacerbates ileitis in a murine model of Crohn disease. *J Clin Invest*; 114(3): 389-398.
97. Vélazquez P, Wei B and Braun J (2005) Surveillance B lymphocytes and mucosal immunoregulation. *Springer Semin Immunopathol*; 26(4): 453-462.
98. Kuna AT (2013) Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochem Med (Zagreb)*; 23(1): 28-42.
99. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M and Hershberg RM (2004) Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest*; 113(9): 1296-1306.
100. Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, McEvoy LM, Butcher EC, Kassam N, Mackay CR, Newman W and Ringler DJ (1997) Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*; 151(1): 97-110.
101. Hatoum OA, Heidemann J and Binion DG (2006) The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*; 1072: 78-97.
102. Matsuda R, Koide T, Tokoro C, Yamamoto T, Godai T, Morohashi T, Fujita Y, Takahashi D, Kawana I, Suzuki S and Umemura S (2009) Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naive ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflamm Bowel Dis*; 15(3): 328-334.
103. Mora JR and von Andrian UH (2006) T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol*; 27(5): 235-243.
104. Lee SH, Miyagi T and Biron CA (2007) Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol*; 28(6): 252-259.
105. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K and Yagita H (2002) New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*; 2(11): 850-861.
106. Sun JC, Beilke JN and Lanier LL (2010) Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunol Rev*; 236: 83-94.

107. Spits H, Artis D, Colonna M, Dieffenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F and Vivier E (2013) Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*; 13(2): 145-149.
108. Walker JA, Barlow JL and McKenzie AN (2013) Innate lymphoid cells-how did we miss them? *Nat Rev Immunol*; 13(2): 75-87.
109. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood*; 112(3): 461-469.
110. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM and Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*; 331(6013): 44-49.
111. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M and Caligiuri MA (2003) CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*; 101(8): 3052-3057.
112. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaeheri BA, Ghayur T, Carson WE and Caligiuri MA (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*; 97(10): 3146-3151.
113. Freud AG and Caligiuri MA (2006) Human natural killer cell development. *Immunol Rev*; 214: 56-72.
114. Krzewski K and Coligan JE (2012) Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol*; 3: 335.
115. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C and Moretta L (2011) Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108(2): 728-732.
116. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG and Bryceson YT (2010) Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*; 115(11): 2167-2176.
117. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW and Schmidt RE (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*; 31(10): 3121-3127.

118. Korbel DS, Norman PJ, Newman KC, Horowitz A, Gendzekhadze K, Parham P and Riley EM (2009) Killer Ig-like receptor (KIR) genotype predicts the capacity of human KIR-positive CD56dim NK cells to respond to pathogen-associated signals. *J Immunol*; 182(10): 6426-6434.
119. Colonna M (2009) Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity*; 31(1): 15-23.
120. Bryceson YT and Long EO (2008) Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol*; 20(3): 344-352.
121. Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*; 23: 225-274.
122. McQueen KL and Parham P (2002) Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol*; 14(5): 615-621.
123. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R and Moretta L (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*; 19: 197-223.
124. Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*; 9(5): 495-502.
125. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL and Parham P (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*; 7(6): 739-751.
126. Biron CA (2001) Interferons alpha and beta as immune regulators-a new look. *Immunity*; 14(6): 661-664.
127. Ljunggren HG and Kärre K (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*; 11(7): 237-244.
128. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH and Yokoyama WM (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*; 436(7051): 709-713.
129. Yokoyama WM and Kim S (2006) How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity*; 24(3): 249-257.
130. Rajalingam R (2012) Overview of the killer cell immunoglobulin-like receptor system. *Methods Mol Biol*; 882: 391-414.

131. Lanier LL (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*; 16: 359-393.
132. Long EO, Barber DF, Burshtyn DN, Faure M, Peterson M, Rajagopalan S, Renard V, Sandusky M, Stebbins CC, Wagtmann N and Watzl C (2001) Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev*; 181: 223-233.
133. Vilches C and Parham P (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*; 20: 217-251.
134. Trowsdale J (2001) Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity*; 15(3): 363-374.
135. Marsh SG, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC and Wain H (2003) Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Tissue Antigens*; 62(1): 79-86.
136. Lanier LL (2009) DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev*; 227(1): 150-160.
137. Robinson J, Waller MJ, Stoehr P and Marsh SG (2005) IPD-the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res*; 33(Database issue): D523-526.
138. Klein J and Sato A (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*; 343(10): 702-709.
139. Klein J and Sato A (2000) The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med*; 343(11): 782-786.
140. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Muller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM and Trowsdale J (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*; 75(4): 291-455.
141. Parham P (2005) MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*; 5(3): 201-214.
142. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL and Parham P (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*; 7(6): 753-763.

143. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S and Trowsdale J (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(9): 4778-4783.
144. Martin AM, Kulski JK, Gaudieri S, Witt CS, Freitas EM, Trowsdale J and Christiansen FT (2004) Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene*; 335: 121-131.
145. Middleton D, Meenagh A and Gourraud PA (2007) KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics*; 59(2): 145-158.
146. Pyo CW, Guethlein LA, Vu Q, Wang R, Abi-Rached L, Norman PJ, Marsh SG, Miller JS, Parham P and Geraghty DE (2010) Different patterns of evolution in the centromeric and telomeric regions of group A and B haplotypes of the human killer cell Ig-like receptor locus. *PLoS One*; 5(12): e15115.
147. Uhrberg M, Parham P and Wernet P (2002) Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the Caucasoid population: KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes. *Immunogenetics*; 54(4): 221-229.
148. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, Marsh SG, Geraghty D, Spellman S, Haagenson MD, Ladner M, Trachtenberg E, Parham P and Miller JS (2010) Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*; 116(14): 2411-2419.
149. Yawata M, Yawata N, Abi-Rached L and Parham P (2002) Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit Rev Immunol*; 22(5-6): 463-482.
150. Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, Hammond JA, Moesta AK, Sharma D, Graef T, McQueen KL, Guethlein LA, Carrington CV, Chandanayingyong D, Chang YH, Crespi C, Saruhan-Direskeneli G, Hameed K, Kamkamidze G, Koram KA, Layrisse Z, Matamoros N, Mila J, Park MH, Pitchappan RM, Ramdath DD, Shiau MY, Stephens HA, Struik S, Tyan D, Verity DH, Vaughan RW, Davis RW, Fraser PA, Riley EM, Ronaghi M and Parham P (2009) Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. *Genome Res*; 19(5): 757-769.
151. Khakoo SI and Carrington M (2006) KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol Rev*; 214: 186-201.

152. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL and Carrington M (2004) HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*; 305(5685): 872-874.
153. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Morgan L, Tower C, Regan L, Moore GE, Carrington M and Moffett A (2010) Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest*; 120(11): 4102-4110.
154. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy K M, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J and Moffett A (2004) Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med*; 200(8): 957-965.
155. Moffett-King A (2002) Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*; 2(9): 656-663.
156. Holm SJ, Sakuraba K, Mallbris L, Wolk K, Stahle M and Sanchez FO (2005) Distinct HLA-C/KIR genotype profile associates with guttate psoriasis. *J Invest Dermatol*; 125(4): 721-730.
157. Luszczyk W, Manczak M, Cislo M, Nockowski P, Wisniewski A, Jasek M and Kusnierczyk P (2004) Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol*; 65(7): 758-766.
158. Momot T, Koch S, Hunzelmann N, Krieg T, Ulbricht K, Schmidt RE and Witte T (2004) Association of killer cell immunoglobulin-like receptors with scleroderma. *Arthritis Rheum*; 50(5): 1561-1565.
159. Yen JH, Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM and Goronzy JJ (2001) Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*; 193(10): 1159-1167.
160. Van der Slik AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO and Giphart MJ (2003) KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes*; 52(10): 2639-2642.
161. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ and Carrington M (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*; 31(4): 429-434.

162. Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, Herrero R, Rodriguez AC, Kurman R, Mortel R, Schwartz P, Glass A and Hildesheim A (2005) Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*; 201(7): 1069-1075.
163. Gao X, Jiao Y, Wang L, Liu X, Sun W, Cui B, Chen Z and Zhao Y (2010) Inhibitory KIR and specific HLA-C gene combinations confer susceptibility to or protection against chronic hepatitis B. *Clin Immunol*; 137(1): 139-146.
164. Lu Z, Zhang B, Chen S, Gai Z, Feng Z, Liu X, Liu Y, Wen X, Li L, Jiao Y, Ma C, Shao S, Cui X, Chen G, Li J and Zhao Y (2008) Association of KIR genotypes and haplotypes with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *Cell Mol Immunol*; 5(6): 457-463.
165. Cook M, Briggs D, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, Fegan C, Darbyshire P, Lawson S, Boxall E and Moss P (2006) Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood*; 107(3): 1230-1232.
166. Butsch Kovacic M, Martin M, Gao X, Fuksenko T, Chen CJ, Cheng YJ, Chen JY, Apple R, Hildesheim A and Carrington M (2005) Variation of the killer cell immunoglobulin-like receptors and HLA-C genes in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14(11 Pt 1): 2673-2677.
167. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Martinez-Borra J, Perez R, Rodriguez M, Fdez-Morera JL, Fuentes D, Rodriguez-Rodero S, Gonzalez S and Lopez-Larrea C (2005) Protective effect of the HLA-Bw4I80 epitope and the killer cell immunoglobulin-like receptor 3DS1 gene against the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*; 192(1): 162-165.
168. Zhang Y, Wang B, Ye S, Liu S, Liu M, Shen C, Teng Y and Qi J (2010) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia: possible association with susceptibility to the disease. *Leuk Res*; 34(1): 55-58.
169. Buchel OC, Bosch FJ, Janse van Rensburg J, Bezuidenhout E, de Vries CS, van Zyl JH, Middlecote BD, de KGH and Fevery J (2012) Primary sclerosing cholangitis, Crohn's disease and HLA-B27 in black South African women. *Acta Gastroenterol Belg*; 75(4): 454-457.

170. 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 and Siminovitch KA (2000) Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet*; 66(6): 1863-1870.
171. Hollenbach JA, Ladner MB, Saeteurn K, Taylor KD, Mei L, Haritunians T, McGovern DP, Erlich HA, Rotter JI and Trachtenberg EA (2009) Susceptibility to Crohn's disease is mediated by KIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand. *Immunogenetics*; 61(10): 663-671.
172. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JR, Jewell DP, Trowsdale J and Young NT (2006) Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in ulcerative colitis susceptibility. *Genes Immun*; 7(7): 576-582.
173. Wilson TJ, Jobim M, Jobim LF, Portela P, Salim PH, Rosito MA, Damin DC, Flores C, Peres A, Machado MB, Chies JA, Schwartzmann G and Roesler R (2010) Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol*; 71(3): 293-297.
174. Zhang HX, Li JC and Liu ZJ (2008) Relationship between expression of inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor HLA-Cw ligand and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*; 88(44): 3108-3111.
175. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, Marsh SG, Guethlein LA, Parham P, Miller JS and Weisdorf DJ (2009) Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*; 113(3): 726-732.
176. Pfeiffer MM, Feuchtinger T, Teltschik HM, Schumm M, Müller I, Handgretinger R and Lang P (2010) Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children. *Haematologica*; 95(8): 1381-1388.
177. Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*; 155: 335-350.
178. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; 230(4732): 1350-1354.

179. Fraga D, Meulia T and Fenster S (2008) Real-Time PCR. In: *Techniques CPEL* (ed). John Wiley and Sons, Inc., pp 10.13.11-10.13.14.
180. Alves LG, Rajalingam R and Canavez F (2009) A novel real-time PCR method for KIR genotyping. *Tissue Antigens*; 73(2): 188-191.
181. Vilches C, Castano J, Gómez-Lozano N and Estefania E (2007) Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments. *Tissue Antigens*; 70(5): 415-422.
182. Wirtschaftsuniversität Wien. www.r-project.org. (Zugriff: 25.03.2013)
183. Cardon LR and Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*; 2(2): 91-99.
184. Colhoun HM, McKeigue PM and Davey Smith G (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*; 361(9360): 865-872.
185. Gomez-Lozano N and Vilches C (2002) Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update. *Tissue Antigens*; 59(3): 184-193.
186. Sun JY, Gaidulis L, Miller MM, Goto RM, Rodriguez R, Forman SJ and Senitzer D (2004) Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens*; 64(4): 462-468.
187. Houtchens KA, Nichols RJ, Ladner MB, Boal HE, Sollars C, Geraghty DE, Davis LM, Parham P and Trachtenberg EA (2007) High-throughput killer cell immunoglobulin-like receptor genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry with discovery of novel alleles. *Immunogenetics*; 59(7): 525-537.
188. Koehler RN, Walsh AM, Moqueet N, Currier JR, Eller MA, Eller LA, Wabwire-Mangen F, Michael NL, Robb ML, McCutchan FE and Kijak GH (2009) High-throughput genotyping of KIR2DL2/L3, KIR3DL1/S1, and their HLA class I ligands using real-time PCR. *Tissue Antigens*; 74(1): 73-80.
189. Rajalingam R and Ashouri E (2013) Gene-specific PCR typing of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Methods Mol Biol*; 1034: 239-255.
190. Hong HA, Loubser AS, de Assis Rosa D, Naranbhai V, Carr W, Paximadis M, Lewis DA, Tiemessen CT and Gray CM (2011) Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping and HLA killer-cell immunoglobulin-like receptor-ligand identification by real-time polymerase chain reaction. *Tissue Antigens*; 78(3): 185-194.

191. Ririe KM, Rasmussen RP and Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*; 245(2): 154-160.
192. Vandesompele J, De Paepe A and Speleman F (2002) Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem*; 303(1): 95-98.
193. Vendelbosch S, de Boer M, Gouw RA, Ho CK, Geissler J, Swelsen WT, Moorhouse MJ, Lardy NM, Roos D, van den Berg TK and Kuijpers TW (2013) Extensive variation in gene copy number at the killer immunoglobulin-like receptor locus in humans. *PLoS One*; 8(6): e67619.
194. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D and Jones AR (2011) Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res*; 39(Database issue): D913-919. (Zugriff: 18.08.2013)
195. Nowak I, Majorczyk E, Ploski R, Senitzer D, Sun JY and Kusnierczyk P (2011) Lack of KIR2DL4 gene in a fertile Caucasian woman. *Tissue Antigens*; 78(2): 115-119.
196. Freeman HJ (2007) Application of the Montreal classification for Crohn's disease to a single clinician database of 1015 patients. *Can J Gastroenterol*; 21(6): 363-366.
197. Maloy KJ and Powrie F (2011) Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*; 474(7351): 298-306.
198. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M and Fouser LA (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*; 203(10): 2271-2279.
199. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov, II, Littman DR, Maloy KJ and Powrie F (2010) Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*; 464(7293): 1371-1375.
200. Powell N, Walker AW, Stolarczyk E, Canavan JB, Gokmen MR, Marks E, Jackson I, Hashim A, Curtis MA, Jenner RG, Howard JK, Parkhill J, MacDonald TT and Lord GM (2012) The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells. *Immunity*; 37(4): 674-684.
201. Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, Bruhns P, Si-Tahar M, Sawa S and Eberl G (2011) Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgamma t and LTi cells. *J Exp Med*; 208(1): 125-134.

-
202. Geremia A, Arancibia-Carcamo CV, Fleming MP, Rust N, Singh B, Mortensen NJ, Travis SP and Powrie F (2011) IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med*; 208(6): 1127-1133.
203. Giacomelli R, Passacantando A, Frieri G, Parzanese I, D'Alo S, Vernia P, Pimpo MT, Petrucci C, Caprilli R, Cifone MG and Tonietti G (1999) Circulating soluble factor-inhibiting natural killer (NK) activity of fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from inflammatory bowel disease (IBD) patients. *Clin Exp Immunol*; 115(1): 72-77.
204. Manzano L, Alvarez-Mon M, Abreu L, Antonio Vargas J, de la Morena E, Corugedo F and Durantez A (1992) Functional impairment of natural killer cells in active ulcerative colitis: reversion of the defective natural killer activity by interleukin 2. *Gut*; 33(2): 246-251.
205. Johansson S, Berg L, Hall H and Hoglund P (2005) NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol*; 26(11): 613-618.
206. Venstrom JM, Gooley TA, Spellman S, Pring J, Malkki M, Dupont B, Petersdorf E and Hsu KC (2010) Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*; 115(15): 3162-3165.
207. Sivori S, Carlomagno S, Falco M, Romeo E, Moretta L and Moretta A (2011) Natural killer cells expressing the KIR2DS1-activating receptor efficiently kill T-cell blasts and dendritic cells: implications in haploidentical HSCT. *Blood*; 117(16): 4284-4292.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die verschiedenen anatomischen Lokalisationen bei Morbus Crohn (Mund bis Anus) aus ⁴	6
Abbildung 2: Endoskopisches Bild des terminalen Ileums bei Morbus Crohn mit Schwellung der Schleimhaut und charakteristischem Pflastersteinrelief aus ⁶	7
Abbildung 3: Endoskopisches Bild der Colitis ulcerosa mit oberflächlichen Erosionen und Schleimhautblutungen aus ¹¹	8
Abbildung 4: Extraintestinale Manifestationen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und assoziierte Autoimmunerkrankungen (blau) aus ⁴	10
Abbildung 5: Epidemiologie von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn aus ¹⁹	13
Abbildung 6: Proteinstruktur der verschiedenen KIR-Rezeptoren aus der „ <i>IPD-KIR Database</i> “ ¹³⁷	24
Abbildung 7: Aktivierende (<i>activating</i>) und hemmende (<i>inhibitory</i>) KIR-Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen mit ihren passenden HLA-Liganden aus ¹³⁰	25
Abbildung 8: Zentromere und telomere Genmotive verschiedener <i>KIR</i> -Haplotypen aus ¹³⁰	27
Abbildung 9: PCR-Schmelzkurven der Probe P1146 zu allen 17 <i>KIR</i> -Genen ..	42
Abbildung 10: PCR-Schmelzkurven der Probe P0529 zu allen 17 <i>KIR</i> -Genen	43
Abbildung 11: Gelelektrophorese der Probe P1146 zu allen 17 <i>KIR</i> -Genen	44
Abbildung 12: Gelelektrophorese der Probe P0529 zu allen 17 <i>KIR</i> -Genen	44
Abbildung 13: Altersverteilungen von Colitis ulcerosa (CU), Kontrollgruppe (KG) und Morbus Crohn (MC).....	48
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Krankheitslokalisationen (L1=Ileumbefall, L2=Kolonbefall, L3=Ileokolonbefall) bei Morbus Crohn.....	51
Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung des Befallsmusters (B1=keine Komplikation, B2=Strikturen, B3=Penetrationen) bei Morbus Crohn.....	52
Abbildung 16: Häufigkeiten der <i>B-Content-Score</i> -Stufen 0-4 bei Colitis ulcerosa, Kontrollgruppe und Morbus Crohn	54
Abbildung 17: Häufigkeitsverteilung der <i>KIR</i> -Gene bei Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Kontrollgruppe	55

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation des Morbus Crohn nach Wien und Montreal im Vergleich aus ¹⁶⁻¹⁸	11
Tabelle 2: Klassifikation der Colitis ulcerosa (CU) nach Montreal aus ^{17, 18}	12
Tabelle 3: Die weltweit höchsten Inzidenzen und Prävalenzen von Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) nach ²⁰	13
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits für die Real-Time PCR	32
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Kits für die Gelelektrophorese	33
Tabelle 6: Auflistung der Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Real-Time PCR.....	33
Tabelle 7: Auflistung der Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Gelelektrophorese	34
Tabelle 8: Protokoll zur Real-Time PCR.....	35
Tabelle 9: Zusammensetzung des <i>KIR</i> -Primer-Mastermixes für eine Gesamtmenge von 1000 µl	36
Tabelle 10: Primer für <i>KIR</i> -Genotyping aus ¹⁸⁰ und Primer 2DS3 aus ¹⁸¹	37
Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der <i>KIR</i> -Gene bei Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollgruppe (KG)	45
Tabelle 12: Demografische Daten von Colitis ulcerosa (CU), Morbus Crohn (MC) und Kontrollgruppe (KG).....	47
Tabelle 13: Univariate Analyse Geschlecht: Morbus Crohn (MC) versus Kontrollgruppe (KG) für die Lokalisationen L1-L3=alle Lokalisationen, L1+L3=Ileum- und Ileokolonbefall, L2=Kolonbefall.....	50
Tabelle 14: Univariate Analyse Geschlecht: Colitis ulcerosa (CU) versus Kontrollgruppe (KG)	51
Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung (N=Anzahl) der <i>KIR</i> -Haplotypen bei der Kontrollgruppe (KG), Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) und Unterteilung des <i>KIR</i> -Haplotyps B mit Hilfe des <i>B-Content-Scores</i>	53
Tabelle 16: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC, L1-L3=alle Lokalisationen) versus Kontrollgruppe (KG)	56

Tabelle 17: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit der Lokalisation L2 (Kolonbefall) versus Kontrollgruppe (KG)	59
Tabelle 18: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit der Lokalisation L1+L3 (Ileum- und Ileokolonbefall) versus Kontrollgruppe (KG)	62
Tabelle 19: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit Befallsmuster B1 (keine Komplikationen) versus Kontrollgruppe (KG)	65
Tabelle 20: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit Befallsmuster B2 (Strikturen) versus Kontrollgruppe (KG)	68
Tabelle 21: Univariate Analyse Morbus Crohn (MC) mit dem Befallsmuster B3 (Penetrationen) versus Kontrollgruppe (KG)	71
Tabelle 22: Univariate Analyse Colitis ulcerosa (CU) versus Kontrollgruppe (KG)	74
Tabelle 23: Gegenüberstellung der <i>KIR</i> -Gen-Häufigkeiten aus der vorliegenden Studie (Kontrollgruppe (KG), Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU)) und der „Allele-Frequency Net-Database“ ¹⁹⁴	82

Danksagung

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger, danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Untersuchungen in der Kinderklinik Tübingen durchzuführen.

Herzlichen Dank an Frau Dr. Lena Oevermann für die Betreuung während meiner Arbeit in der Kinderklinik.

Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab danke ich für die Überlassung der DNA-Proben für meine Untersuchungen und die Unterstützung bei den Auswertungen meiner Ergebnisse.

Herrn Dr. Simon Müller danke ich für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Herzlich danken möchte ich Daniela Köndgen, welche mich in die Methoden im Labor einarbeitete und mir bei meiner Arbeit zur Seite stand.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Markus Mezger und Herrn Sebastian Michaelis, welche die Methode für die Untersuchungen im Labor etablierten und mich zu jeder Zeit bei Fragen und Problemen unterstützten und weiterhalfen.

Für die weitere Unterstützung im Labor und die angenehme Arbeitsatmosphäre danke ich allen Labormitarbeitern der Kinderklinik Tübingen, mit denen ich mir die Arbeitsräume teilen durfte.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben und mich immer wieder für meine Arbeit motiviert haben.