

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifizierung prädikativer Parameter für ein
Therapieansprechen auf anti-TNF α -Antikörper bei Patient*innen
mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bosse Ragnar Jessen

aus Kiel

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden am 06.04.2020 in folgender Zeitschrift und mit folgendem Titel veröffentlicht:

Clinical Gastroenterology and Hepatology – “Level of Tumor Necrosis Factor Production by Stimulated Blood Mononuclear Cells Can be Used to Predict Response of Patients With Inflammatory Bowel Diseases to Infliximab“

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Vorwort.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abstrakt.....	8
Abstract.....	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Epidemiologie & Klinik.....	12
1.2 Ätiologie.....	12
1.3 Therapie.....	15
Allgemeine Maßnahmen und Chirurgie.....	15
Medikamente & Wirkmechanismen.....	17
Infliximab, ein Tumornekrosefaktor- α -Antikörper.....	20
1.4 Prädiktoren.....	21
Untersuchte Prädiktoren.....	21
Tumornekrosefaktor- α als Prädiktor.....	22
1.5 Hypothese der Arbeit.....	22
2 Methodik und Materialien.....	24
2.1 Aufbau der klinischen Studie.....	24
2.2 Isolation peripherer, mononukleärer Zellen aus dem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	28
2.3 Tumornekrosefaktor- α <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	30
2.4 Zytokine im <i>cytometric bead array</i>	32
2.5 Durchflusszytometrie.....	33
2.6 Immunhistochemie.....	37
2.7 Statistik.....	38
3 Ergebnisse.....	40
3.1 Unterschiede zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten.....	40
3.2 Ansprechen auf die Therapie.....	42
3.3 Prädiktoren aus Anamnese, Körperlicher Untersuchung & Laborwerten.....	45
3.4 Experimentelle Prädiktoren.....	47
Tumornekrosefaktor- α -Expression in der Lamina propria als Prädiktor.....	47
Tumornekrosefaktor- α -Expression im Blut als Prädiktor für Therapieansprechen..	48

Weitere inflammatorische Zytokine im Blut als Prädiktoren.....	51
Identifikation der Tumornekrosefaktor- α produzierenden Zellen im Blut	52
Identifikation des stärksten Prädiktors.....	52
Hohe Tumornekrosefaktor- α -Produktion als starker Prädiktor für MC-Patienten....	52
4 Diskussion	54
Literaturverzeichnis	61
Eidesstattliche Versicherung	75
Anteilsklärung an erfolgten Publikationen	76
Curriculum vitae – Bosse Ragnar Jessen.....	77
Publikationsliste.....	79
Danksagung	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP/PO	Alkalische Phosphatase/Peroxidase
APC	Allophycocyanin
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve, bestimmtes Integral)
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
CBA	<i>cytometric bead array</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudien
FSC	forward scatter
Hb	Hämoglobin
HBI	Harvey-Bradshaw-Index
HDL	High-Density Lipoprotein
HPF	high power fields
IA	Interquartilsabstand
IFX	Infliximab

IL	Interleukin
inkl.	inklusive
KI	Konfidenzintervall
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LDL	Low-Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MC	Morbus Crohn
NFκB	nukleärer Faktor κB
min	Minuten
OR	<i>Odds-Ratio</i> (Chancenverhältnis)
OSM	Oncostatin M
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
Pe-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	<i>peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
pMS	partieller Mayo Score
PS	Penicillin-Streptomycin
ROC	<i>receiver operating characteristic</i> (Grenzwertoptimierungskurve)
SD	Standardabweichung
SES-CD	<i>simple endoscopic score for Crohn's disease</i>
SNP	single nucleotide polymorphisms
sog.	sogenannte
SSC	<i>side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween</i>

TDM	<i>therapeutic drug monitoring</i> (therapeutische Medikamentespiegel-Überwachung)
Th1	T-Helfer-Zellen Typ 1
Th2	T-Helfer-Zellen Typ 2
Th17	T-Helfer-Zellen Typ 17
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor- α
TREM1	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
u.a.	unter anderem
UCEIS	<i>ulcerative colitis endoscopic index of severity</i>
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Abstrakt

Hintergrund

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) werden unter anderem mit dem Tumornekrosefaktor- α (TNF)-Antikörper Infliximab therapiert. Obwohl Infliximab die Therapie beider Erkrankungen revolutioniert hat, steht man vor dem Problem, dass 30-40% der Patient*innen nicht ansprechen (primäres Therapieversagen). Um einen hohen Leidensdruck, der mit einer nicht funktionierenden Therapie einhergeht, sowie hohe Kosten zu vermeiden, müssten Nicht-Ansprecher*innen vor Therapiebeginn identifiziert werden. Das Ziel dieser Arbeit war, Prädiktoren zu identifizieren, die ein Ansprechen auf eine Infliximab-Therapie vorhersagen können.

Methodik

MC- und CU-Erkrankte, bei denen die Indikation zur Infliximab-Therapie gestellt wurde, wurden eingeladen an dieser Beobachtungsstudie teilzunehmen. Studienzentren waren die Ambulanz und Station der Gastroenterologie Charité Campus Benjamin Franklin Berlin und die Praxis Gastroenterologie am Bayerischen Platz Berlin. Vor der ersten und nach der dritten Infliximab-Gabe wurde die Krankheitsaktivität mittels gängiger Scores (Harvey-Bradshaw-Index (HBI) und partial Mayo Score (pMS)), sonographisch (Limberg Score) und laborchemisch (Blutbild, C-reaktives Protein, Calprotectin) bestimmt. Primärer Endpunkt war das klinische Ansprechen mit einer definierten Score Abnahme, ≥ 3 (pMS) bzw. ≥ 2 (HBI). Mögliche Prädiktoren wurden anamnestisch und klinisch erhoben. Für die experimentell untersuchte Prädiktoren wurde Blut gewonnen und bei vorherig stattgefundener Endoskopie die Biopsien aus der Pathologie angefordert. Im Blut wurden verschiedene Zytokine nach vierstündiger Lipopolysaccharid-Stimulation mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* und *cytometric bead array* quantifiziert. Die Biopsien wurden immunhistochemisch für TNF gefärbt und im Anschluss automatisiert mit einem programmierten Algorithmus ausgewertet. Die Ergebnisse wurden statistisch mittels Mann-Whitney-U, Chi-Quadrat-Test, *receiver operating characteristic* (ROC) und logarithmischer Regression ausgewertet.

Ergebnisse

Es konnten 41 Patient*innen eingeschlossen werden, von denen 73% auf eine Infliximab-Therapie ansprachen. Ansprecher und Nicht-Ansprecher unterschieden sich signifikant in Krankheitsdauer ($p=0,018$), Limberg Score ($p=0,021$), IL-6- ($p=0,028$) und TNF-Produktion ($p=0,049$). Die Durchflusszytometrie identifizierte den höchsten Anteil der

TNF⁺ Zellpopulationen innerhalb der CD14⁺ Monozyten. Immunhistochemisch war eine unterschiedlich starke TNF-Färbung erkennbar, die aufgrund niedriger Fallzahlen nicht in Zusammenhang mit Ansprechen gebracht werden konnte. Eine Einteilung für TNF-Produktion im Blut anhand eines durch ROC ermittelten Grenzwertes von 500 pg/ml in *low-* und *high-TNF-producer* ergab eine Sensitivität für Therapieansprechen von 82% (Spezifität 78%). Eine logistische Regression identifizierte TNF *low/high* als stärksten unabhängigen Prädiktor (Odds-Ratio 16,2, Konfidenzintervall 1,8-148,7). Für MC Patient*innen war die Prädiktion mittels TNF *low/high* zu ~100% sensitiv und 82% spezifisch.

Schlussfolgerung

Die TNF-Produktion von peripheren Blutzellen stellt einen unabhängigen, starken Prädiktor für das Ansprechen einer Infliximab-Therapie bei MC Patient*innen dar. Die Ergebnisse sollten in größeren, prospektiven Studien bestätigt und in Zusammenhang mit anderen Prädiktoren überprüft werden.

Abstract

Background

Inflammatory bowel disease (IBD) comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) that can be treated with the tumor necrosis factor- α (TNF)-antibody Infliximab. Although Infliximab has revolutionized IBD therapy, 30-40% of IBD patients show a primary non-response. The aim of this study was to identify predictors for response to Infliximab treatment to personalize treatment strategies and thus decrease the number of nonresponding patients as well as costs of medication.

Methods

CD and UC patients with an indication for Infliximab treatment were invited to participate in this observational study. The Department of Gastroenterology Charité Campus Benjamin Franklin Berlin and the Gastroenterologie am Bayerischen Platz Berlin served as study centers. Disease activity was measured before the first and after the third Infliximab dose through clinical scoring (Harvey-Bradshaw-Index (HBI) and partial Mayo Score (pMS)), ultrasound (Limberg Score) and laboratory values (blood count, C-reactive protein, calprotectin). Primary endpoint was a clinical response defined as a decline of ≥ 3 (pMS) or ≥ 2 (HBI). Possible predictors were evaluated by medical history and clinical examination. For experimental predictors blood samples were taken and – if available – biopsies from prior endoscopies were ordered from the pathology department. Cytokines were measured in the blood after a 4 h lipopolysaccharide stimulation period through *enzyme-linked immunosorbent assay* and *cytometric bead array*. Biopsies were stained for TNF and analyzed with an automated algorithm. Results were statistically analyzed by Mann-Whitney-U, Chi-Squared-Test, Receiver Operating Characteristic and logarithmic regression.

Results

Of 41 included patients 73% responded to Infliximab treatment. Responders and Non-responders differed significantly in disease duration ($p=0,018$), Limberg Score ($p=0,021$), IL-6 ($p=0,028$) and TNF production ($p=0,049$). Flow cytometry identified the highest percentage of TNF⁺ cells within the CD14⁺ monocytes. TNF staining differed within the biopsies, but an analysis of association with response could not be performed due to small sample numbers. *Receiver operating characteristic* established a cut-off of 500 pg/ml for TNF production in the blood that divided patients into *low*- and *high*-TNF-producers, respectively. This allowed prediction with a sensitivity of 82% and specificity

of 78%. A logistic regression identified TNF *low/high* as the strongest, independent predictor (odds ratio 16.2, confidence interval 1.8-148.7). For CD patients, the predictor TNF *low/high* had a sensitivity of ~100% sensitivity and specificity of 82%.

Conclusion

TNF production in the blood is an independent, strong predictor for response to Infliximab treatment for CD patients. Results of this study and possible correlation to other predictors should be confirmed in larger, prospective trials.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie & Klinik

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Beide Erkrankungen zeigen eine weltweit steigende Inzidenz und Prävalenz (1). Die Symptomatik der Erkrankungen ist sehr individuell. Häufig sind chronische Diarrhöen, teilweise mit Blutbeimengungen, und abdomineller Bauchschmerz. Die Symptome sind aber nicht spezifisch und können sich je nach Lokalisation und Schwere der Entzündung unterschiedlich ausprägen, was die Differentialdiagnostik erschwert (2, 3). MC kennzeichnet sich durch einen potentiellen Befall des gesamten Gastrointestinaltraktes. Hierbei kann es im Unterschied zur CU zu sogenannten (sog.) *skip lesions* kommen. Dies sind Segmente, die im Gegensatz zur Umgebung nicht entzündet sind. Ein weiterer charakteristischer Unterschied ist die transmurale Entzündung, die alle Wandschichten befallen kann und somit z.B. Fisteln verursacht. Die CU zeigt hauptsächlich oberflächliche und kontinuierliche Entzündung entlang des Colons. Die Pathogenese ist bei beiden Erkrankungen nicht vollständig geklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Ätiologie aus, die zu einer Barrierestörung im Gastrointestinaltrakt und zu einer überschießenden Immunantwort führt (4-6). Zusätzlich können extraintestinale Manifestationen auftreten, die teilweise mit der Krankheitsaktivität zusammenhängen, aber auch unabhängig davon vorkommen (7). Zu den extraintestinalen Manifestationen zählen zum Beispiel (z.B.) das Erythema nodosum oder die Uveitis (8). In einer schweizer Kohorte traten extraintestinale Manifestationen in bis zu 43% der MC- und 31% der CU-Patient*innen¹ auf (9).

1.2 Ätiologie

Die überschießende Immunantwort ist komplex und besteht aus einem Zusammenspiel zwischen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems in der Lamina propria des Darms. Außerdem werden über verschiedene Zytokine und Chemokine weitere Immunzellen in die Mukosa rekrutiert, die über spezifische Integrine in die Mukosa einwandern (10, 11). Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören z.B. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Die Hauptvertreter des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Zellen, welche jeweils in weitere

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im folgenden Text nur das generische Maskulinum (d.h. beispielsweise "Patient" statt "Patientin") verwendet. Die Formulierungen beziehen sich jedoch auf alle Geschlechtsidentitäten.

Subkategorien eingeteilt werden können (12). Zur Subklassifikation nutzt man diverse zelluläre Marker. Ein Großteil sind Oberflächenproteine die als *cluster of differentiation* (CD)-Marker definiert und nummeriert werden (13). Von besonderem Interesse bei der Pathogenese von CED sind beim adaptiven Immunsystem die CD4⁺ T-Zellen, sog. T-Helfer-Zellen (14). Die Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems interagieren untereinander und mit anderen Zellen über Zytokine, die bei der überschießenden Immunantwort bei CED eine wichtige Rolle spielen. Nachfolgend sollen einige Beispiele genannt werden, die einen Teil der unkontrollierten Immunantwort darstellen.

Beim angeborenen Immunsystem sind es unter anderem Makrophagen die Tumornekrosefaktor- α (TNF), Interleukin (IL)-12 und IL-23 produzieren. TNF konnte immunhistochemisch bei beiden Erkrankungen vermehrt dargestellt werden, wobei nur beim MC eine submukosale Expression zu beobachten war (15). Auf die Funktion und medikamentöse Blockade von TNF wird in einem späteren Kapitel noch gesondert eingegangen. IL-12 aktiviert vor allem die T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1) (16). In Biopsien von entzündeten Arealen von MC-Patienten konnte vermehrt eine Th1 typische Interferon- γ Produktion gemessen werden, während bei CU-Patienten eher eine IL-5 Produktion charakteristisch war, die den T-Helfer-Zellen Typ 2 (Th2) zuzuordnen ist (17). Die Erkrankungen scheinen sich also in ihrer T-Helfer-Zell-Antwort zu unterscheiden, was das unterschiedliche Ansprechen auf bestimmte Medikamente erklären könnte. Jedoch muss man auch festhalten, dass sowohl IL-23 als auch TNF bei beiden Erkrankungen vermehrt exprimiert wird (18). Das Zytokin IL-23, das wie TNF und IL-12 nach Kontakt mit Pathogenen von Makrophagen gebildet wird, ist wiederum essentiell für die T-Helfer-Zellen Typ 17 (Th17) (19). Das von Th17-Zellen produzierte IL-17 konnte vermehrt in Biopsien von entzündeter Darmschleimhaut bei MC-Patienten beobachtet werden, wodurch auch Th17-Zellen in den Fokus der Erforschung der Pathophysiologie rückten (20). Es scheint zudem ein Übergang von regulatorischen T-Zellen zu Th17-Zellen bei CED-Patienten möglich zu sein (21). Ein weiteres wichtiges Zytokin ist das IL-13, das bei CU-Patienten von Th2-Zellen gebildet wird und ein Haupteffektor-Zytokin darstellt, da es die Apoptose und Barriere von Epithelzellen beeinflusst (22). Diese Beispiele stellen die Komplexität der Entzündungskaskade bei beiden Erkrankungen dar. Die verschiedenen Zytokine bieten Zielstrukturen für die Entwicklung von Medikamenten.

Neben der überschießenden Immunantwort ist die Barrierestörung kennzeichnend für beide Erkrankungen. Bereits 1987 konnte für pädiatrische MC-Patienten nachgewiesen werden, dass ihre intestinale Barriere durchlässiger ist als die gesunder Kontrollen (23). Auch für die CU konnte eine undichte Barriere des Darmepithels elektrophysiologisch dargestellt werden (24). Die Barriere bildet sich aus verschiedenen Bestandteilen. So ist z.B. die Architektur der Proteine, die die Zellzwischenräume abdichten, sog. *tight junction*-Proteine, gestört (25). Es konnte gezeigt werden, dass TNF Einfluss auf die Struktur und Funktion von *tight junction*-Proteinen nimmt (26). Für CU-Patienten wurde außerdem dargestellt, dass der Mucus, der auf dem Epithel des Colons die äußerste Schutzschicht bildet, leichter durch Bakterien penetriert werden kann (27). Apoptose von Zellen in der Zellkultur, spontan oder ausgelöst durch TNF, machte in einer Arbeit von Gitter *et al.* die Hälfte der Barrierschädigung neben der Destruktion von *tight junction*-Proteinen aus (28).

Wie bereits erwähnt ist die Ätiologie, die zur Barrierestörung und überschießender Immunantwort führt, ungeklärt, wobei man von einem Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und Genetik ausgeht. Die in den letzten zwei Jahrzehnten durchgeführten Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten über 260 *single nucleotide polymorphisms* (SNP) identifizieren (29). Trotz dieser ständig zunehmenden Zahl an SNP können jedoch nur etwa 25% der Erkrankungen durch den genetischen Hintergrund erklärt werden (30). Das prominenteste Beispiel sind SNP im *NOD2*-Gen, die initial von drei Arbeitsgruppen parallel beschrieben wurde (31-33). Bei Vorliegen einer homozygoten Mutation war es mit einem 38-fachen relativen Risiko für MC assoziiert (31). In einer späteren Arbeit wurde eine Mutation im *NOD2*-Gen mit fistulierendem und stenosierendem Verlauf in Zusammenhang gebracht (34). Die kontinuierlich zunehmende Inzidenz (35) deutet in Übereinstimmung mit den gerade diskutierten Daten daraufhin, dass Umweltfaktoren einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese der CED spielen. Ein Beispiel für einen Umweltfaktor, der das Risiko für MC erhöht, ist Rauchen (36). Bei der CU sind jedoch ehemalige Raucher häufiger von einem schwereren Verlauf betroffen (37).

1.3 Therapie

Allgemeine Maßnahmen und Chirurgie

Hauptsächlich kommen bei CU- und MC-Patienten anti-inflammatorische Therapien zum Einsatz (5, 38). Daneben gibt es aber einzelne Allgemeinmaßnahmen, die den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen können sowie chirurgische Interventionsmöglichkeiten, die hauptsächlich benötigt werden, wenn konservative Therapien nicht ausreichen.

Anknüpfend an die oben genannte Ätiologie stellt die strikte Nikotinkarenz eine wichtige allgemeine Maßnahme für MC-Patienten dar, um das Risiko für schwerere Krankheitsverläufe zu verringern (39). Außerdem ist darauf zu achten, dass es nicht zu einer Unterversorgung von Nährstoffen insbesondere Vitaminen und Spurenelementen kommt. In einer schweizer Kohorte hatten z.B. 17,8% der 914 MC-Patienten einen Vitamin B12-Mangel, welcher mit einem erhöhten Risiko für Stenosen und chirurgischen Maßnahmen assoziiert war (40). Neben der krankheitsbedingten Malabsorption können Patienten zudem ein Vermeidungsverhalten entwickeln. Eine spanische prospektive Multicenterstudie konnte zeigen, dass 86% der Studienpatienten bestimmte Nahrungsmittel während eines Schubes aus Angst die Symptomatik verstärken zu können mieden. Dieses Vermeidungsverhalten konnte mit Malnutrition assoziiert werden (41). Bei starker, langanhaltender Symptomatik oder schwieriger Krankheitsbewältigung kann außerdem eine ganzheitliche psychosoziale Betreuung für die Patienten von großer Bedeutung sein. Ein systematischer Review von 2016 zeigte, dass Depression mit einer Prävalenz von 15% bei CED-Patienten vorkommen kann (42).

Insgesamt konnte in einer dänischen Langzeitstudie bei den chirurgischen Maßnahmen ein Rückgang der Zahlen beobachtet werden (43). Sie sind aber immer noch notwendig, wenn konservative Therapien nicht ausreichend sind. Bei der CU ist die Entzündung des Kolons medikamentös nicht immer ausreichend zu kontrollieren, in diesen Situationen kann eine Kolektomie notwendig werden. Hierbei versucht man langfristig die Kontinuität des Verdauungstraktes zu erhalten. Nachdem vorläufig oft ein protektives Ileostoma angelegt wird, kann im weiteren Verlauf eine sog. *Pouch* als Rektumersatz operiert werden. Als Komplikation kann es im Verlauf zur Entzündung des Pouchs (Pouchitis) kommen, weswegen CU-Patienten nach einer Kolektomie nicht immer beschwerdefrei sind (44). Insgesamt gehen die Zahl der Kolektomien zurück (45). Beim MC müssen teilweise Stenosen chirurgisch versorgt werden. Gerade wenn eine Stenose nicht durch

eine aktive Entzündung entsteht, sondern bereits fibrotisch geworden ist, helfen anti-inflammatorische Medikamente oft nicht weiter. Teilweise kann endoskopisch mittels Ballondilatation versucht werden eine Stenose aufzuweiten (46). Chirurgisch kommt die Striktorplastik zum Einsatz, bei welcher längs geschnitten wird, um anschließend quer zu vernähen (47). Hierbei sollte immer so darmsparend wie möglich operiert werden, um einem Kurzdarmsyndrom vorzubeugen. Auch Stenosen unklarer Genese des Kolons sollten operiert werden, da bei beiden Erkrankungen das Risiko für Dysplasien erhöht ist (48). Eine weitere Komplikation des MC sind Fisteln. MC stellt in Europa eine der häufigsten Ursachen für anale Fisteln dar (49). Symptomatische Fisteln können mittels einer Seton-Drainage behandelt oder chirurgisch entfernt werden, wobei auf die Beteiligung des Kontinenzapparates zu achten ist (50). Die Seton-Drainage ist ein Faden, welcher in die Fistel gelegt wird. Er soll der Abszessbildung vorbeugen, durch die Verbesserung des Abflusses die Entzündung unterdrücken und das umliegende Gewebe zur Fibrosierung anregen (51). Teilweise wird bei Patienten mit Fistelbefall ein Stoma angelegt, um die Symptomatik zu lindern und den Bereich aboral des Stomas zu beruhigen. Bei diesem Vorgehen konnte kein Nachteil in der Lebensqualität gezeigt werden (52). Daneben können Fisteln auch medikamentös mit TNF-Blockade behandelt werden (53). Eine randomisiert-kontrollierte Studie von 2020 musste abgebrochen werden, da die alleinige Seton-Therapie deutlich mehr Re-Interventionen im Vergleich zur anti-TNF-Therapie oder chirurgischer Verschließung aufzeigte (54).

Sowohl für die CU als auch für die Crohn-Kolitis besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Die aktuellen Leitlinien teilen die Patienten in verschiedene Risikogruppen ein, anhand derer die Intervalle für die Überwachungskoloskopien festgelegt werden (55).

Neben diesen chirurgisch/endoskopisch versorgten Komplikationen kann in Ausnahmefällen, wie z.B. dem isolierten Ileozökalbefall beim MC, auch primär operiert werden. In solchen Fällen kann sich eine frühe Operation positiv auf den weiteren Krankheitsverlauf auswirken (56).

Insgesamt erfordert die Behandlung von CED-Patienten einen interdisziplinären Ansatz. Neben Gastroenterologen werden Chirurgen für die Behandlung der oben genannten Beispiele, Dermatologen für die Konsultation bei extraintestinalen Manifestationen wie z.B. dem Erythema nodosum, Augenärzte für die Therapie der Uveitis,

Psychosomatiker/Psychiater bei psychischer Komorbidität und Diätassistenten bei z.B. Kachexie herangezogen.

Medikamente & Wirkmechanismen

In der medikamentösen Therapie unterscheidet man zwischen der Remissionsinduktion und der Remissionserhaltung. Kommt es zu einem akuten Schub, sollte eine medikamentöse Therapie je nach Schwere ausgewählt werden. Weiterhin sind Glucocorticoide fester Bestandteil im Repertoire der verfügbaren Medikamente. Während teilweise topische Glucocorticoide ausreichen können, müssen bei schwereren Verläufen diese systemisch verabreicht werden. Ein Beispiel für ein topisches Glucocorticoid wäre Budesonid, welches bei einem distalen Befall als Rektalschaum verordnet werden kann (57). Der Vorteil von Budesonid ist die geringe systemische Verfügbarkeit, da es größtenteils in der Leber metabolisiert wird (58). Glucocorticoide wirken über Bindung an den Glucocorticoidrezeptor, welcher als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl an Genen in ihrer Expression beeinflusst (59). Ein hoher Anteil der Patienten reagiert (im Verlauf) nicht ausreichend auf Steroide bzw. kann diese nicht reduzieren, ohne dass Symptome wiederkehren (60). Zusätzlich ist es vor allem in der Remissionserhaltung wichtig eine langfristige Glucocorticoidtherapie aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen zu vermeiden (61). Für die Remissionserhaltung und als Alternativen in der Remissionsinduktion stehen heute primär Biologika und *small molecules*, bei leichter Erkrankung, auch Mesalazin zur Verfügung.

Mesalazin oder auch 5-Aminosalicylsäure ist ein effektives Therapeutikum in der leichten bis moderaten CU (62). Es vermindert die Transkriptionsaktivität des nukleären Faktors κB (NF κB) und somit die Expression vieler inflammatorischer Zytokine (63). Trotz weniger starker Evidenz wird es auch häufig in der Behandlung des MC verwendet (64). Azathioprin/6-Mercaptopurin wird als Purinanalogon anstelle der körpereigenen Nukleotiden in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) eingebaut und verhindert dadurch die Zellproliferation von u.a. B- und T-Lymphozyten (65-67). Aufgrund des erhöhten Lymphomrisikos wird Azathioprin langfristig vor allem bei älteren Patienten vermieden (68). Methotrexat ist wie Azathioprin ein Antimetabolit und hemmt als Folsäure-Antagonist die Dihydrofolat-Reduktase (69). Es wird in der Behandlung des MC eingesetzt und kann teilweise eine anti-TNF-Therapie (wie auch Azathioprin) ergänzen (70, 71). Tacrolimus und Ciclosporin zeigten gute Wirksamkeit bei schwerer, akuter CU, welche nicht mehr ausreichend auf Glucocorticoide ansprachen (72, 73). Beide

Medikamente sind sog. Calcineurin-Inhibitoren. Tacrolimus (auch FK506) und Ciclosporin binden an Rezeptoren, sog. Immunophiline innerhalb der T-Zellen. Dieser Komplex aus Tacrolimus/Ciclosporin und Immunophilin verhindert, dass das Enzym Calcineurin die Expression inflammatorischer Zytokine begünstigt, welche weitere T-Zellen aktivieren würde. Ciclosporin hemmt indirekt Calcineurin (74). Von Nachteil ist die geringe therapeutische Breite der Calcineurin-Inhibitoren, weswegen regelmäßig Medikamentenspiegel bestimmt werden müssen.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Medikamenten habe Biologika, da sie monoklonale Antikörper sind, ein definiertes therapeutisches Ziel. Sie können je nach therapeutischem Ziel in drei Übergruppen eingeteilt werden:

1. Antikörper mit TNF als Zielstruktur (die erste Generation Biologika)
2. Antikörper zur Verhinderung von Zell-Adhäsion/Einwanderung
3. Antikörper mit anderen Zytokinen als Zielstruktur

TNF-Antikörper sind die am längsten verfügbaren Biologika und werden gesondert im nächsten Abschnitt behandelt, da sie die Therapie der Erkrankungen revolutionierten und außerdem besonders relevant für die Fragestellung dieser Arbeit sind.

Die zweitgenannte Gruppe sind Antikörper, welche die Zelleinwanderung verhindern, indem sie Integrine blockieren. Integrine sind Rezeptoren auf Zelloberflächen, die an andere Proteine, an Zelloberflächen oder extrazellulärer Matrix binden (75). Sie konnten als therapeutisches Ziel identifiziert werden, da sie dazu beitragen, dass Lymphozyten spezifisch in ein bestimmtes Gewebe einwandern (*homing*) (76). Der Antikörper Vedolizumab kann als darmspezifischer Antikörper betrachtet werden. Er antagonisiert das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, welches auf Lymphozyten exprimiert wird, die in die Darmmukosa einwandern. Vedolizumab tut dies sehr spezifisch, wahrscheinlich ohne andere Integrine zu antagonisieren (77). Natalizumab, ein weiterer Integrin-Antagonist, hemmt nur die $\alpha 4$ -Untereinheit (78). Dadurch hemmt es neben dem darmspezifischen $\alpha 4\beta 7$ auch die hirnspezifischen $\alpha 4\beta 1$ Integrine (79). So konnte ein Auftreten von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie durch John Cunningham-Viren bei Natalizumab-Therapie beobachtet werden (80). Natalizumab ist in Deutschland nicht zur Behandlung des MC oder der CU zugelassen. Das Integrin $\alpha 4\beta 7$ interagiert mit dem Rezeptor MAdCAM-1 auf den Endothelzellen. Diese Bindung verhindert Vedolizumab und die

Zellen verbleiben im Blut. In den Phase III Zulassungstudien waren die Ergebnisse für CU-Patienten besser als für MC-Patienten, während bei beiden Diagnosen geringe Infektionsrisiken festgestellt werden konnten, was auf die Darmspezifität des Antikörpers zurückzuführen ist (81, 82).

Zur dritten Gruppe gehört Ustekinumab, welches IL-12- und IL-23 blockiert. Es bindet dabei an die p40-Untereinheit, welche in beiden Zytokinen vorkommt (83). Beide Zytokine gehören zu einer Familie und stellen die pro-inflammatorischen Vertreter dar, die von dendritischen Zellen, Makrophagen und im Fall von IL-12 auch B-Zellen bei Kontakt mit Pathogenen exprimiert werden (84). Eine Arbeit zeigte, dass IL-12 vermehrt von mononukleären Zellen in der Lamina propria bei MC-Patienten exprimiert wird (85). Es scheint, dass IL-12 die Th1-Zellantwort in MC verstärkt und somit ein therapeutisches Ziel ausmacht (16). Bezüglich IL-23 konnte u.a. ein Mausmodell zeigen, dass der IL-23-Rezeptor auf T-Zellen für eine intestinale Entzündung notwendig war (19). Zusätzlich war das IL-23-Rezeptor-Gen in GWAS stark assoziiert mit CED (86).

Eine neue Gruppe der medikamentösen Therapie stellen die *small molecules* dar, zu denen Tofacitinib zählt. Im Vergleich zu den Antikörpern ist es ein viel kleineres Molekül (87). Von Vorteil ist außerdem, dass es oral verabreicht werden kann. Während es für CU im Vergleich zu Placebo eine Wirksamkeit zeigte, konnte dies für MC bisher nicht bestätigt werden (88, 89). Ein weiterer Unterschied ist die weniger spezifische Wirkung von Tofacitinib. Es gehört zu den Kinase-Inhibitoren und blockiert die Januskinasen 1-3 mit unterschiedlicher Affinität (90). Januskinasen kommen intrazellulär vor und werden durch Zytokine aktiviert. Es wird also ein Schritt später in der Signalkaskade im Vergleich zu z.B. Ustekinumab eingegriffen. Hierbei unterscheidet sich bei jedem Zytokin welche Januskinasen es aktiviert. Die Januskinasen aktivieren wiederum sogenannte *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Proteine, welche im Zellkern als Transkriptionsfaktoren Gene beeinflussen können, die weitere Zytokine für die T-Zellaktivierung exprimieren würden (91, 92). Insgesamt soll so die T-Zell-Antwort unterdrückt werden. Von Vorteil könnte sein, dass die Pathophysiologie der Erkrankungen sicher nicht auf einem einzigen Zytokin beruht und Januskinase-Inhibitoren mehrere Zytokine gleichzeitig blockieren können. An Nebenwirkungen wurde bisher vor allem ein erhöhtes Risiko für Herpes zoster berichtet (93). Zusätzlich gibt es Hinweise auf ein erhöhtes thromboembolisches Risiko (94). Da Tofacitinib noch relativ neu ist, bleibt abzuwarten, ob weitere Nebenwirkungen auftreten.

Infliximab, ein Tumornekrosefaktor- α -Antikörper

Es wird deutlich, dass mittlerweile eine Vielzahl an Medikamenten existiert. Gerade die Einführung des TNF-Antikörpers Infliximab (IFX) revolutionierte die Behandlung der Erkrankungen und hat über die Jahre trotz zunehmender Anwendung von Biologika zu einer Kostenreduktion geführt (95-97). Mittlerweile existieren drei weitere TNF-Antikörper (Adalimumab, Golimumab, Certolizumab pegol), welche in der Behandlung zum Einsatz kommen. Adalimumab und Golimumab (nur CU) sind im Gegensatz zum chimären IFX humane Antikörper und werden subkutan appliziert (98, 99). Certolizumab pegol (nur MC und nicht in der Europäischen Union zugelassen) ist ein pegyliertes Fab-Fragment eines IgG4-Antikörpers und zeigt somit keine Fc-Fragment vermittelten Wirkungen wie z.B. Apoptoseinduktion (100). Der erste TNF-Antikörper IFX wird gewichtsadaptiert bei Therapiebeginn sowie zwei und sechs Wochen nach Erstgabe intravenös verabreicht. Im Anschluss wird normalerweise ein Wiederholungszyklus von acht Wochen festgelegt (101). Das Zytokin TNF ist die Zielstruktur von IFX und wird als transmembranes Protein exprimiert, kann aber enzymatisch in eine gelöste Form gespalten werden (102). Über zwei verschiedene Rezeptoren kann TNF unterschiedliche Signalkaskaden starten (103, 104). Bei CED ist die Produktion von TNF erhöht und für die Entzündung mitverantwortlich. Hierbei scheint insbesondere das membrangebundene TNF entscheidend zu sein, da die Blockade von gelöstem TNF durch Etanercept bei CED-Patienten zu keiner klinischen Verbesserung geführt hat (105). Es liegen sogar Fallserien vor, die eine Erstmanifestation von CED unter einer Therapie mit Etanercept beschreiben, die teilweise durch den Einsatz monoklonaler TNF-Antikörper gut behandelt werden konnte (106). Etanercept ist im Gegensatz zu IFX kein monoklonaler TNF-Antikörper. Es enthält die Struktur des TNF-Rezeptor-II und des Fc-Fragments von humanem IgG1 und kann so TNF im Blut binden und verhindern, dass dieses an die eigentlichen membrangebundenen Rezeptoren bindet. Es löst aber so keine Apoptose in T-Zellen aus (107-109). Die Apoptose in T-Zellen der Darmmukosa wurde frühzeitig nach Infliximabgabe beobachtet, was den schnellen Effekt von IFX erklären könnte (110). Als zusätzlicher Wirkmechanismus wurde die Induktion von regulatorischen Makrophagen beschrieben (111). Wie bereits erwähnt, ist TNF mitverantwortlich für die Zerstörung der epithelialen Barriere (26, 28). Die Barriestörung konnte durch neutralisierendes IFX *in vitro* wieder verbessert werden. TNF wurde neben IL-10 von proinflammatorischen Makrophagen gebildet, deren vermehrtes Vorkommen charakteristisch für den entzündeten Darm von CU- und MC-Patienten ist (112). In einer früheren Arbeit konnte

bereits gezeigt werden, dass durch die Blockade von TNF der epitheliale Widerstand bei MC-Patienten zunimmt (113).

Allerdings verbleibt eine hohe Rate an Patienten die ein primäres Therapieversagen aufweisen. In der ACCENT I-Studie konnte nur ein primäres Ansprechen von 58% für MC-Patienten und in den ACT-Studien ein primäres Ansprechen von 70% für CU-Patienten gezeigt werden (114, 115). Primäres Nicht-Ansprechen wird unterschiedlich definiert und unterscheidet sich vom sekundären Nicht-Ansprechen vor allem durch den Zeitpunkt. Primäres Ansprechen ist nach dem London Agreement innerhalb von 8-12 Wochen anzunehmen, wobei nur noch wenige Patienten nach der 3. Dosis ein Ansprechen zeigen, wenn sie vorher nicht angesprochen haben (116). Dies bedeutet, dass Patienten teilweise Wochen bis Monate abwarten müssen bis man entscheidet, dass ein primäres Therapieversagen vorliegt. In dieser Zeit befinden sich die Patienten meist im aktiven Schub. Diese Patienten bereits vor der Therapieentscheidung identifizieren zu können, würde die lange Belastung durch aktive Symptomatik minimieren. Hinzu kommen die nicht unerheblichen Risiken einer TNF-Blockade. Aufgrund des erhöhten Infektionsrisikos, insbesondere Tuberkulose, findet standardmäßig vor Therapiebeginn eine umfassende Infektionsdiagnostik statt (117). Gerade in Anbetracht der heute zur Verfügung stehenden Alternativtherapien, die im vorherigen Kapitel erläutert wurden, könnte man Patienten zielgerichteter und individueller behandeln (118). Hierfür wären Prädiktoren notwendig, die einfach im klinischen Alltag zu erheben sind.

1.4 Prädiktoren

Untersuchte Prädiktoren

Es gibt einige Beispiele zu untersuchten Prädiktoren, die einfach in den klinischen Alltag zu integrieren sind. Patienten mit einem normalen Body-Mass-Index (BMI) sprechen z.B. eher auf eine Therapie mit Infliximab an (119). Für MC sind außerdem jüngeres Alter (120, 121), ein inflammatorischer Phänotyp (122) und eine hohes C-reaktives Protein (CRP) (123, 124) zum Therapiestart positive prädiktiver Parameter. Ein hohes Albumin (125), ein hoher Hämoglobinwert zum Therapiestart (126, 127) sowie eine frühe Erkrankungsphase (128) sind dagegen positive Prädiktoren für CU-Patienten. Für andere Prädiktoren gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Eine Untersuchung zeigte z.B. für Rauchen keinen Einfluss auf die Ansprechraten bei MC-Patienten, während andere Studien beobachteten, dass nichtrauchende MC-Patienten länger ansprechen (129,

130). Eine Vielzahl anderer Prädiktoren wurde untersucht, wobei in Übersichtsarbeiten darauf hingewiesen wurde, dass viele Studien retrospektiv sind, eine kleine Anzahl von Patienten untersuchten, unterschiedliche Definitionen zum Ansprechen angewandt und uneinheitliche Ergebnisse erzielt wurden. Außerdem beziehen sich manche Studien auf andere TNF-Antikörper (z.B. Adalimumab) und es ist unklar, ob man diese Ergebnisse auf Infliximab übertragen kann. Es wären größere, prospektive Arbeiten notwendig, um Prädiktoren in den klinischen Alltag zu integrieren (131-134).

Tumornekrosefaktor- α als Prädiktor

Das Anfärben von membrangebundenem TNF bei MC-Patienten während einer Endoskopie konnte bereits als Prädiktor für das Therapieansprechen auf Adalimumab genutzt werden. Patienten mit einer hohen Anzahl an TNF⁺ Zellen sprachen hier eher an (92%) als Patienten mit einer niedrigen Anzahl an TNF⁺ Zellen (15%) (135). Eine Testung in einer Blutprobe wäre aber der invasiven Endoskopie vorzuziehen. Eine 2002 veröffentlichte Studie zeigte, dass hohe TNF-Serumspiegel vor einer IFX-Therapie mit Nicht-Ansprechen bei MC-Patienten korrelieren (136). Im Widerspruch dazu zeigte Amini Kadijani *et al.*, dass ein hoher Anteil TNF⁺ Zellen im Blut ein Ansprechen voraussagt, man aber dazu das membrangebundene und nicht das lösliche TNF betrachten müsse (137).

1.5 Hypothese der Arbeit

Falls bei einem Patienten TNF hauptverantwortlich für die intestinale Entzündung und die damit assoziierte gestörte Barrierefunktion ist, müsste die Blockade von TNF durch Infliximab äußerst effektiv sein. Im Gegensatz dazu wäre eine TNF-unabhängige Entzündungskaskade und Epitheldestruktion eher schlecht durch Infliximab behandelbar. Makrophagen sind zwar eingewanderte Monozyten aus dem Blut, produzieren in der gesunden Mukosa kaum TNF bei Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation trotz dauerhafter Phagozytose, da sie u.a. kein CD14 (LPS-Rezeptor) mehr exprimieren (138). Es konnte aber gezeigt werden, dass bei CED-Patienten Monozyten aus dem Blut einwandern und wesentlich zur lokalen TNF-Population beitragen (139, 140). Deshalb soll in dieser Arbeit überprüft werden, ob bereits die TNF-Expression von Monozyten im Blut ein Therapieansprechen auf Infliximab vorhersagen kann. Dabei soll neben unstimulierter TNF-Expression die durch LPS stimulierte TNF-Produktion gemessen werden. Da es bei einer Barriestörung zum Übertritt von LPS kommen würde, soll es hier stellvertretend als stimulierender, bakterieller Bestandteil verwendet werden. LPS wird durch Toll-like Rezeptor (TLR) 4 erkannt, welcher im Blut vor allem von Monozyten exprimiert wird (141-

143). Zusätzlich soll überprüft werden, ob sich eine hohe TNF-Expression von Monozyten im Blut in einer erhöhten TNF-Expression von Makrophagen in der Lamina propria widerspiegelt. Abschließend wird der Prädiktor „*high TNF*“ zu bereits untersuchten, klinisch anwendbaren Prädiktoren wie Krankheitsdauer, BMI, Alter, Hämoglobin und Albumin in dieser Studienkohorte verglichen.

2 Methodik und Materialien

2.1 Aufbau der klinischen Studie

Die CED-Patienten dieser Beobachtungsstudie wurden stationär und ambulant in der Gastroenterologie am Campus Benjamin Franklin der Charité oder in der Praxis „Gastroenterologie am Bayerischen Platz“ betreut. Volljährige Patienten mit MC oder CU wurden eingeladen an der Studie teilzunehmen, nachdem die Indikation einer IFX-Therapie gestellt wurde. Ausschlusskriterium stellte ein Biologika-Therapie innerhalb der letzten 6 Monate dar. Eine zusätzlich initiierte oder vorherige Therapie mit Steroiden, Mesalazinpräparaten, Azathioprin/ 6-Mercaptopurin oder Methotrexat stellte hingegen kein Ausschlusskriterium dar. Ein gewisser Abstand oder konstante Therapiedauer war nicht notwendig. Vor der ersten und dritten Gabe IFX nach ca. 6 Wochen wurde die Krankheitsaktivität mittels klinischer Scores, Laborwerten und Darmsonographie bestimmt, um das Ansprechen auf die Therapie zu evaluieren. Zusätzlich wurden vor der ersten Gabe anamnestisch, in der körperlichen Untersuchung, im Blut und – falls verfügbar – in Biopsien Prädiktoren erhoben bzw. untersucht (Abbildung (Abb.) 1).

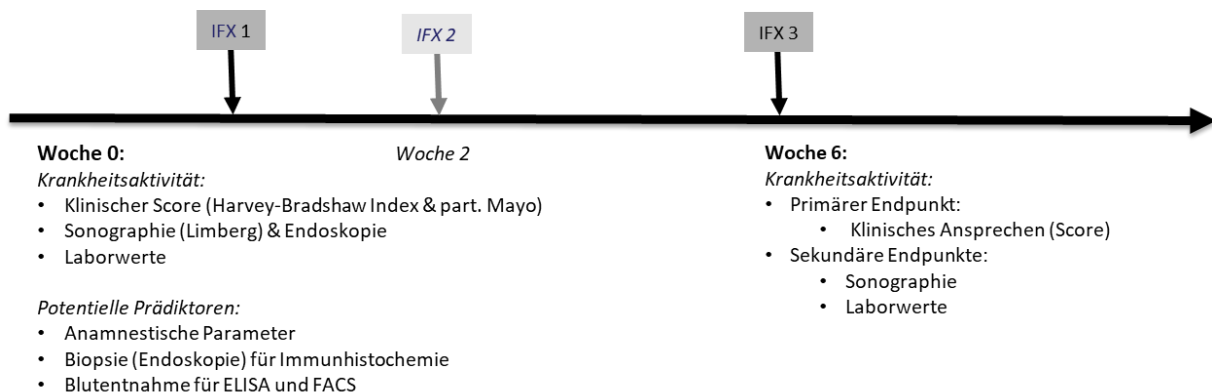


Abbildung 1. Aufbau der klinischen Studie; IFX: Infliximab

Prädiktoren

Anamnestisch wurden weitere MC- oder CU-Erkrankte in der Familie, Packungsjahre (*pack years*) und orale Kontrazeption erfragt. Außerdem wurden Körpergröße, Gewicht, Erstdiagnose, Lokalisation der Erkrankung nach der Montreal-Klassifikation, immunsuppressive Komedikation (Steroide/ Azathioprin/ 6-Mercaptopurin/ Methotrexat) und die letzte Endoskopie inklusive (inkl.) der Scores (*simple endoscopic score for Crohn's disease* (SES-CD) und UCEIS (*ulcerative colitis endoscopic index of severity* (UCEIS))) erfasst (Tabelle 1-3, (144-146)).

Tabelle 1: Montreal Klassifikation (144)

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Alter bei Diagnosestellung	A1 – <17 Jahre A2 – 17-40 Jahre A3 – >40 Jahre	A1 – <17 Jahre A2 – 17-40 Jahre A3 – >40 Jahre
Lokalisation	L1 – terminales Ileum L2 – Colon L3 – Ileum + Colon + L4 Oberer Gastrointestinaltrakt	E1 – Proktitis E2 – Linksseitencolitis E3 – Pancolitis
Verhalten	B1 – nicht strikturierend, nicht penetrierend B2 – strikturierend B3 – penetrierend + p perianaler Befall	---

Tabelle 2: Simple endoscopic score for Crohn's disease (145)

Punkte	0	1	2	3
Größe Ulzeration	Keine	<0,5 cm	0,5 - 2 cm	>2 cm
Ausdehnung Ulzeration	Keine	<10 %	10 - 30 %	>30 %
Ausdehnung Entzündung	Keine	<50 %	50 - 75 %	>75 %
Stenosen	Keine	Einzelne	Mehrere	Nicht passierbar

Für jedes Segment (Ileum, Colon rechts, Colon transversum, Colon links) sind die vier Kategorien zu erheben. Alle Punkte werden addiert.

Tabelle 3: Ulcerative colitis endoscopic index of severity (146)

Punkte	0	1	2	3
Gefäßzeichnung	Normal	Teilweiser Verlust	Keine	--
Blutung	Keine	Mukosal	Luminal mild	Luminal moderat oder schwer
Größte Erosionen oder Ulzera	Keine	Erosionen	Oberflächliche Ulzera	Tiefe Ulzera

Anhand der schwersten Läsion werden die Punkte addiert.

In der körperlichen Untersuchung wurde der Hüften- und Taillenumfang erfasst. Laborchemisch wurde ein Blutbild, das CRP, Albumin, Ferritin, Transferrinsättigung und zur Überprüfung von metabolischen Risikofaktoren Gesamtcholesterin, High-Density Lipoprotein (HDL), Low-Density Lipoprotein (LDL), HbA1c und Triglyceride bestimmt. Das metabolische Risiko wurde wie folgt in Anlehnung an die Kriterien der International Diabetes Federation (IDF 2005)² für das metabolische Syndrom definiert:

- Frauen Taille ≥ 80 cm + 1 mindestens abweichender metabolischer Laborwert (erhöhte Triglyceride, erhöhter HbA1c oder niedriges HDL)
- Männer Taillenumfang ≥ 94 cm + 1 mindestens abweichender metabolischer Laborwert (s.o.)

Bei der Blutentnahme wurden zusätzlich 13-18 ml heparinisieretes Blut für die Isolation der Immunzellen abgenommen (siehe 2.2.). Bei stattgefundenender Endoskopie wurden die Biopsien für die Immunhistochemie (siehe 2.5) angefordert.

Krankheitsaktivität

Für MC-Patienten wurde der Harvey-Bradshaw-Index (HBI), für CU-Patienten der partielle Mayo Score (pMS) angewandt, um die Krankheitsaktivität zu erfassen (Abb. 2). Für beide Erkrankungen wurde sonographisch der Limberg Score eingesetzt. Zusätzlich wurden laborchemisch ein Blutbild, das CRP und Calprotectin im Stuhl angefordert.

Tabelle 4: Limberg Score (147)

Limberg 0	Limberg I	Limberg II	Limberg III	Limberg IV
Keine verdickte Darmwand	Verdickte Darmwand	Verdickte Darmwand mit kurzstreckigen Gefäßen	Verdickte Darmwand mit langstreckigen Gefäßabschnitten	Langstreckige Gefäße bis ins Mesenterium

² <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome>

Therapieansprechen

Das Ansprechen wurde primär klinisch über die Scores definiert. Hierbei zählte ein Rückgang im pMS ≥ 3 und im HBI ≥ 2 als klinisches Ansprechen (134, 148). Für die Studie lag ein Ethikvotum mit der Antragsnummer EA4/125/15 aktualisiert vom 6.3.2017 vor.

HBI – Morbus Crohn		Mayo Score – Colitis Ulcerosa	
Allgemeinbefinden	<input type="radio"/> gut = 0 <input type="radio"/> beeinträchtigt = 1 <input type="radio"/> schlecht = 2 <input type="radio"/> sehr schlecht = 3 <input type="radio"/> unerträglich = 4	Stuhlfrequenz pro Tag	<input type="radio"/> normal: 0 <input type="radio"/> 1-2 Stühle mehr als normal: 1 <input type="radio"/> 3-4 Stühle mehr als normal: 2 <input type="radio"/> > 5 Stühle mehr als normal: 3
Bauchschmerzen	<input type="radio"/> keine = 0 <input type="radio"/> leicht = 1 <input type="radio"/> mittel = 2 <input type="radio"/> stark = 3		
Anzahl ungeformter Stuhlgänge pro Tag		Rektaler Blutabgang	<input type="radio"/> kein Blut: 0 <input type="radio"/> Blutstreifen bei weniger als 50% der Stühle: 1 <input type="radio"/> Deutliche Blutbeimengung meistens: 2 <input type="radio"/> Auch Blut ohne Stuhl: 3
Abdominelle Resistenz	<input type="radio"/> nein = 0 <input type="radio"/> fraglich = 1 <input type="radio"/> sicher = 2 <input type="radio"/> sicher und schmerzhaft = 3		
Komplikationen: <i>Arthralgie, Uveitis, Iritis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, orale Aphthen, Analfissur, neue Fistel, Abszess, axiale Arthritis, periphere Arthritis)</i>	(1 pro Komplikation)	Globale Beurteilung des Arztes	<input type="radio"/> normal: 0 <input type="radio"/> milde Erkrankung: 1 <input type="radio"/> moderate Erkrankung: 2 <input type="radio"/> schwere Erkrankung: 3

Abbildung 2. Auszug aus dem case-report-form zur Erhebung der klinischen Scores. Der Mayo Score entspricht hier dem partiellen Mayo Score ohne endoskopische Befundung. HBI: Harvey-Bradshaw Index (134, 148, 149)

2.2 Isolation peripherer, mononukleärer Zellen aus dem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Tabelle 5: Geräte für die Isolation von mononukleären Zellen aus dem Blut

Gerät	Firma
Pipettierhilfe, Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Primovert Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Neubauer Zählkammer, improved doppelt, ZK06	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Sterilbank Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellschrank, HERA Cell 150	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 6: Materialien für die Isolation von mononukleären Zellen aus dem Blut

Material	Firma
9 ml Heparinröhrchen	BD, Franklin Lakes, USA
50 ml Polypropylene Conical Tube	BD FALCON®, Franklin Lakes, USA
10 ml in 1/10 ml Sterile Serological pipet,	BD FALCON®
25 ml in 1/4 ml spacesaver Sterile Serological pipet	BD FALCON®
Pasteurpipetten, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipette, 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
24 Näpfchen Zellkultur Platte aus Polystyrene mit Deckel, Costar® 3524	Corning GmbH HQ, Wiesbaden
5 ml Polystyrene Round Bottom Tube	BD FALCON®
SafeSeal tube 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG., Nümbrecht
Pipettenspitzen Nano	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien in der Isolation mononukleärer Zellen aus dem Blut

Reagenz	Firma
Biocoll Separating Solution, density 1,077 g/ml	Biochrom GmbH, Berlin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco® Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Trypanblau 1:10 mit PBS, 0,45µm filtered, Trypan blue 0,5% in physiological saline	Biochrom GmbH
RPMI Medium 1640 (1x)	gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc.
Fötale Kälberserum (FBS)	gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin-Streptomycin (PS)	gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc.
Brefeldin A	Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA
Lipopolysaccharides	Sigma-Aldrich®
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich®

Isolation von peripheren, mononukleären Zellen aus dem Blut

Die Isolation erfolgte angelehnt an Brosseron et al. (150). Die Blutentnahme von 13-18 ml Blut erfolgte vor Therapiebeginn und ohne spezielle Voraussetzungen (z.B. nüchtern). Das Blut wurde in Heparinröhrchen aufgenommen, so dass keine Gerinnung stattfinden konnte. Für die Isolation wurde es zuvor bis auf 40 ml mit PBS verdünnt, um dann jeweils 20 ml auf 15 ml Biocoll® zu schichten. Die Proben wurden für 25 Minuten (min) bei 1200xg bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Die Dichte des Biocoll ist größer als die von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber geringer als die von Erythrozyten und Granulozyten. Dadurch durchwandern die Erythrozyten und der größte Teil der Granulozyten das Biocoll® bei der Zentrifugation, während die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) sich in der sog. Interphase über dem Biocoll® abbilden. Über der Interphase befindet sich das Plasma inkl. der Thrombozyten. Die Interphase wurde mithilfe von sterilen Pasteurpipetten in ein neues Gefäß überführt und bis auf 50 ml mit Medium aufgefüllt³. Die Zellsuspension wurde gewaschen (394xg, 7 min, 4°C), mit 30 ml

³ Medium: RPMI 500 ml + FCS 10% (50 ml), PS 1% (5 ml)

aufgefüllt und erneut unter gleichen Bedingungen gewaschen. Die Zellen wurden in 20 ml aufgenommen, gezählt und im Anschluss auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml justiert.

Für den TNF *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurden je 1 ml pro Nüpfchen, für die Durchflusszytometrie jeweils 500 µl Medium pro Polystyrene Röhren pipettiert. Ein Teil wurde mit LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml stimuliert. Dies sollte die Reaktion von den Monozyten, welche später zu Makrophagen in der Lamina propria differenziert wären, auf die dysfunktionale Barriere nachahmen. Die Proben wurden dann alle für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Zu den Polystyren Röhren wurde nach 2 Stunden noch 0,5 µl Brefeldin A (5 mg/ml DMSO) hinzugegeben, um die Sekretion (u.a. von TNF) der Zellen zu inhibieren.

Die Proben für ELISA und *cytometric bead array* (CBA) wurden bei -80°C eingefroren, während die durchflusszytometrischen Proben weiterbearbeitet wurden.

2.3 Tumornekrosefaktor- α *enzyme-linked immunosorbent assay*

Tabelle 8: Verwendete Geräte im ELISA

Gerät	Firma
ELISA Reader Infinite F50 <i>Software Magellan F50 Version 7.0.</i>	Tecan, Männedorf, Schweiz
Multipipette 8x 300	Eppendorf AG
Magnetrührer IKA® RH-KT/C	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen

Tabelle 9: Verwendete Materialien im ELISA

Material	Firma
SafeSeal tube 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG
ELISA 96 Nüpfchen Platten	BRAND GmbH & Co. KG

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien im ELISA

Chemikalie	Firma
Human TNF ELISA Set Cat. No 555212	
- Capture Antibody, Anti-Human TNF monoclonal antibody	
- Detection Antibody, Biotinylated Anti-Human TNF monoclonal antibody	BD Biosciences
- Enzyme Reagent, Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SAv-HRP)	
- Standards, Recombinant human TNF, lyophilized	
TMB Substrate Reagent Set Cat: 555214	BD OptEIA™
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich®
PBS-10x	
- NaCl	- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- KCl (Potassium Chloride)	- Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
- Na ₂ HPO ₄	- Carl Roth GmbH & Co. KG
- KH ₂ PO ₄	- Alfa Aesar, Ward Hill, USA
Tween 20	Roth
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, REF 14190-094	gibco® Thermo Fisher Scientific
Assay diluent aus PBS mit 10% FCS	Siehe 2.2

Durchführung ELISA

Um die Makrophagen abzutöten und intrazelluläres membrangebundenes TNF freizusetzen, wurden die Proben dreimal eingefroren und aufgetaut. Der ELISA wurde nach Protokoll der Firma BD Biosciences durchgeführt und basiert auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISAs (151). Hierbei bindet zunächst der *capture*-Antikörper über Nacht an die Platte. Am darauffolgenden Tag wird die Probe vorverdünnt und anschließend nach Waschen der Platte zum *capture*-Antikörper hinzugegeben. Durch sorgfältiges Waschen werden danach alles bis auf die durch den *capture*-Antikörper gebundenen TNF-Antigene entfernt. Anschließend wird der *detection*-Antikörper eingesetzt, der an ein anderes Epitop von TNF bindet. Dadurch entsteht das sogenannte Sandwich aus *capture*-Antikörper, dem Antigen TNF und dem *detection*-Antikörper. Nach Herauswaschen der nichtgebundenen Antikörper findet nun nach Zugabe der Reagenzien (Streptavidin-Meerrettichperoxidase und TMB Substrat) durch Enzymreaktion eine Farbreaktion statt. Diese wird nach 30 min durch Hinzugabe von Schwefelsäure gestoppt. Parallel zu den Proben wird eine mitgelieferte Standardreihe erstellt, damit eine Standardkurve ermittelt

werden kann. Durch optische Extinktion wird die Konzentration der Proben mit dem ELISA Reader Infinite F50 (Tecan) und der Software Magellan F50 Version 7.0 ermittelt. Die Probenkonzentration kann berechnet werden, solange sie innerhalb der Standardkurve liegt und wird sonst als unterhalb des Minimums bzw. oberhalb des Maximums angegeben.

2.4 Zytokine im *cytometric bead array*

Tabelle 11: Verwendete Geräte im CBA

Gerät	Firma
Heraeus Freso21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortex Genie	Scientific industries, Bohemia, USA
Eppendorf research plus 200 µl	Eppendorf AG
Eppendorf research 1000 µl	Eppendorf AG
Eppendorf research 20 µl	Eppendorf AG
Eppendorf research 10 µl	Eppendorf AG
BD FACSCanto™ II, Software: BD FACSDiva Software Version 6.1.3 Firmware Version 1.47 (BD FacsCanto II)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien im CBA

Chemikalie	Firma
BD Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit	BD Biosciences

Durchführung im CBA

Zum Abschluss der Studie wurde mit den verfügbaren Proben ein CBA der Firma BD mit sechs verschiedenen inflammatorischen Zytokinen bzw. Interleukinen (IL) durchgeführt (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70). Hierbei nutzt man die Prinzipien des ELISAs (siehe 2.3) und der Durchflusszytometrie (siehe 2.5), um parallel verschiedene Zytokine innerhalb derselben Proben messen zu können (152). Entsprechend zum ELISA binden *capture*-Antikörper an ihre Epitope (jeweiligen Zytokine). Die *capture*-Antikörper für ein Zytokin sind mehrfach an sog. *Beads* gekoppelt, welche dadurch spezifisch an mehrere

Epitope binden können. Die *Beads* entsprechen sozusagen der Platte beim ELISA. Im Anschluss binden jeweils *PE-detection*-Antikörper an ihre Epitope, wodurch ein Sandwichkomplex bestehend aus *capture*-Antikörper/ Bead + Zytokine eines Typs + *detection*-Antikörper entsteht. Abschließend wird jede Population sich in ihrer Fluoreszenz-Intensität unterscheiden. So können die einzelnen Populationen (in diesem Fall Zytokine) auseinander gehalten werden. Wie beim ELISA wird außerdem ein Standard hergestellt, um später die Probenkonzentrationen messen zu können. Gemessen werden die Proben aber am Durchflusszytometer und ausgewertet mit BDs FCAP Array Software.

2.5 Durchflusszytometrie

Tabelle 13: Verwendete Geräte in der Durchflusszytometrie

Gerät	Firma
Heraeus Freso21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortex Genie	Scientific industries,Bohemia, USA
Eppendorf research plus 200 µl	Eppendorf AG
Eppendorf research 1000 µl	Eppendorf AG
Eppendorf research 20 µl	Eppendorf AG
Eppendorf research 10 µl	Eppendorf AG
BD FACSCanto™ II, Software: BD FACSDiva Software Version 6.1.3 Firmware Version 1.47 (BD FacsCanto II)	BD Biosciences

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien & Antikörper in der Durchflusszytometrie

Chemikalien & Antikörper	Firma
Zombie Violet™	BioLegend®, San Diego, USA
CD14-APC MoP9)	BD Biosciences
CD16-PeCy7 mouse anti human	BD Biosciences
Anti-human-CD4-Brilliant V510™, Clone RPA-T4	BioLegend®
FITC anti-human CD8	BD Biosciences
TNF α PerCP/Cy 5.5 anti-human	BioLegend®
Puffer (1x PBS, 0,5% BSA) <ul style="list-style-type: none"> Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Albumin Bovine Fraction V, pH 7.0 	<ul style="list-style-type: none"> gibco® Thermo Fisher Scientific SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco® Thermo Fisher Scientific
Fix/Perm Lösung <ul style="list-style-type: none"> Fixation/Permeabilization Diluent Fixation/Permeabilization Concentrate 	eBioscience, Inc., Thermo Fisher Scientific Inc.
Permpuffer, 1:10 <ul style="list-style-type: none"> Permeabilization Buffer 10X Spüllösung Ampuwa® 1000ml Plastipur® 	<ul style="list-style-type: none"> eBioscience, Inc, Thermo Fisher Scientific Fresenius Kabi, Frankreich
Compensation Beads, OneComp eBeads	eBioscience, Inc, Thermo Fisher Scientific Inc.
Beriglobin	CSL Behring GmbH, Marburg

CD= cluster of differentiation; APC= Allophycocyanin; PE-Cy7=Phycoerythrin-Cyanin 7; FITC= Fluoresceinisothiocyanat, TNF=Tumornekrosefaktor- α

Durchführung der Durchflusszytometrie

Nach der vierstündigen Inkubation wurde zweimal mit Zugabe von 2 ml PBS bei 4°C und 394 g für 7 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen für 25 min auf Eis und in Dunkelheit gefärbt. Hierbei wurde zuerst für 10 min mittels Zombie Violet (0,1:100) gefärbt, um tote Zellen zu markieren, indem Zombie Violet durch poröse Zellmembranen durchdringt. Im Anschluss wurden die Oberflächenproteine CD4 (2,5:100), 8 (10:100), 14 (2:100) und 16 (1:100) für 15 min gefärbt, indem Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper an die Zielstrukturen binden. Nach erneuter Zentrifugation mit 2 ml PBS bei 4°C und 394 g

für 7 min wurden die Zellen mit je 500 µl Fixierlösung Kit für 45 min bei 4°C inkubiert. Nach Hinzugabe von 2 ml Permeabilisierungspuffer wurde erneut gewaschen, aber aufgrund der fixierten Zellen nun mit 500 g. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verarbeitung teilweise bei 4°C in 1 ml Permeabilisierungspuffer kurzfristig gelagert. Ein Testversuch zeigte keine relevanten Unterschiede.

Nach erneutem Waschen mit 2 ml Permeabilisierungspuffer bei 500 g, wurden die Zellen mit TNF-Antikörpern (2:100) für 25 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit gefärbt. Es wurde zum Abschluss zweimal mit 2 ml Puffer bei 4°C und 500 g für 7 min gewaschen. Die Proben wurden in 100 µl Puffer analysiert.

Zur Kompensation wurden *compensation beads* verwendet. Auf das Blocken der FC-Rezeptoren wurde verzichtet, da in einem Vorversuch deutlich wurde, dass Beriglobin das Signal von Phycoerythrin (PE)- und Phycoerythrin-Cyanin 7 (PE-Cy7)-CD16-Antikörpern deutlich mindert, da sie kompetitiv am FC-Rezeptor binden.

In der anschließenden Durchflusszytometrie fließen die Zellen einzeln durch eine Messküvette, so dass die Zellen im Anschluss nacheinander einen Laserstrahl passieren. Dabei streut das Lichtsignal, welches von Detektoren empfangen wird. Im *forward scatter* wird die Beugung des Lichts gemessen, welches vom Volumen einer Zelle abhängt. Im *sideward scatter* hingegen wird die Granularität einer Zelle durch das Messen der Lichtbrechung bestimmt. Monozyten sind zum Beispiel größer und granulärer als Lymphozyten. Zusätzlich zu Volumen und Größe können durch die Fluoreszenzen, die an die Antikörper konjugiert sind, durch Einsetzen von verschiedenen Filtern und Lasern, die Zellen weiter charakterisiert und somit sortiert werden (153).

Gating-Strategien

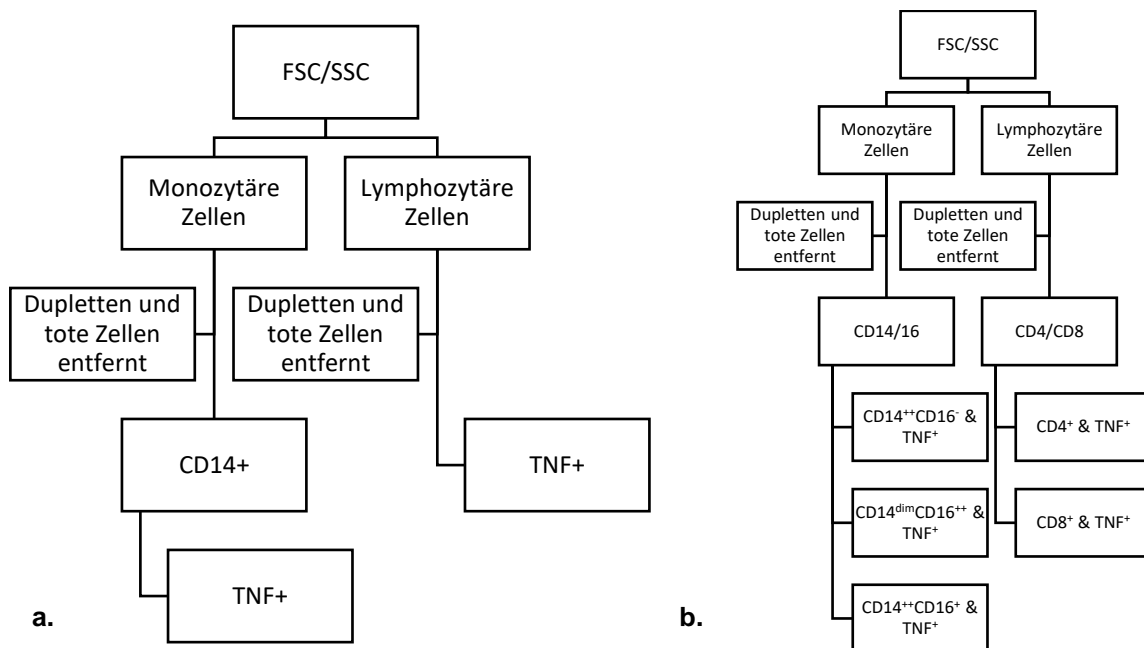


Abbildung 3. Gating-Strategien; **a.** Die Zellen wurden in $CD14^+$ und lymphozytäre Zellen aufgeteilt. Anschließend wurde der Anteil TNF^+ Zellen verglichen. **b.** Die Zellen wurden in Subpopulationen innerhalb der Mono- und Lymphozyten eingeteilt. Anschließend wurde die Tumornekrosefaktor- α -Produktion (TNF) vor und nach Lipopolysaccharid-Stimulation verglichen. FSC: forward scatter, SSC: side scatter

Ziel des ersten *Gatings* war es die TNF produzierenden Zellen zu identifizieren (Abb. 3a). Nach Auswahl der monozytären bzw. lymphozytären Zellen im *forward und sideward scatter* (FSC/SSC) wurden im Anschluss die Dupletten eliminiert. Zusätzlich konnten durch die Zombie Violet-Färbung die toten Zellen exkludiert werden. Danach konnten die jeweiligen Anteile an TNF^+ Zellen für $CD14^+$ und lymphozytäre Zellen verglichen werden.

Es wurde außerdem versucht die Monozyten mittels $CD14$ und $CD16$ in ihre 3 Gruppen zu klassifizieren (154):

- klassische ($CD14^{++}CD16^-$)
- nicht-klassische ($CD14^{dim}CD16^{++}$)
- intermediäre ($CD14^{++}CD16^+$)

Im Anschluss sollten sie hinsichtlich ihrer TNF -Produktion vor und nach LPS-Stimulation verglichen werden. Dieser Vergleich wurde auch zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen durchgeführt (Abb. 3b).

2.6 Immunhistochemie

Tabelle 15: Verwendete Materialien und Geräte in der Immunhistochemie

Gerät	Firma
Kiste zur immunhistochemischen Färbung	Charité Facility Management, Berlin
Pipetten eppendorf Reference	Eppendorf AG
Vortex Mixer	neoLab® 7-2020
Micro Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dampfkochtopf	WMF Group GmbH, Geislingen an der Steige
Objektträger Superfrost Plus & Deckgläser	Langenbrinck GmbH

Tabelle 16: Verwendete Reagenzien in der Immunhistochemie

Reagenz	Firma
Citratpuffer (10,5 g Citronensäure-Monohydrat, 60 ml 2 NaOH, Ad 5 l Aqua dest)	Sigma-Aldrich®, (Aqua dest: Merck KGaA)
ABC Entwickler (AP Substrate Buffer, Levamisole X501, Chromogen Red 1+2+3)	Agilent, Santa Clara, USA
HIGHDEF blue ICH (Substrate Buffer+Chromogen)	Enzo Biochem, New York, USA
Kaisers Glyceringelatine	Merck KGaA
TBS-T Puffer (34,25 g TRIS HCL, 4,5 g TRIS Base, 43,9 g NaCl, Ad 5 l Aqua dest, 5 ml Tween)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Tween: SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol (100%-96%-70%)	Carl Roth GmbH & Co. KG
AP/PO Block, Dual Endogenous Enzyme Block	Agilent
A-B System Link, Biotinylated Secondary Antibodies (A) Streptavidin Alkaline Phosphatase (B)	Agilent
Dako REAL Antibody Diluent	Agilent
Dako Pen	Agilent
TNF mouse anti human clone M1-C4	Sigma-Aldrich®

TBS-T= Tris-buffered saline-Tween; AP=Alkalische Phosphatase; PO=Peroxidase

Durchführung der Immunhistochemie

Die Proben wurden in Form von Paraffinblöcken aus der Pathologie der Charité angefordert und geschnitten. Das Paraffin wurde mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%-96%-70%) und abschließend destilliertem Wasser ausgewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte in Citratpuffer für 2 min im Druckkochtopf gekocht, anschließend gewaschen und in *Tris-buffered saline-Tween* (TBS-T)-Puffer weiterbearbeitet. Nach einer Inkubation für 10 min mit einem Alkalische Phosphatase/Peroxidase (AP/PO) Block wurden die Schnitte mit Hilfe des Dakopens eingekreist, um eine vollständige Benetzung mit dem anschließenden TNF-Antikörper sicherzustellen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit dem TNF-Antikörper in 1:1500 benetzt. Am darauffolgenden Tag wurde für jeweils 30 min mit dem AB System (Biotinylierte Goat anti mouse/rabbit (A), Streptavidin-AP (B)) und 20 min mittels ABC Entwickler (Fast-Red) gefärbt. Die Gegenfärbung wurde mit Hämalaun für 30 s durchgeführt.

Die Auswertung der Proben erfolgte automatisiert mit inForm 2.3 der Firma PerkinElmer. Anhand von fünf Schnitten und einer Negativkontrolle wurde ein Algorithmus trainiert. Zuerst wurde das Gewebe in Epithel, Lamina propria und *Other* eingeteilt. Darauffolgend wurden Nuklei und Zytoplasma segmentiert und das Zytoplasma für TNF⁺ Zellen markiert. Als Threshold wurde 0,37 gewählt. So konnte pro Schnitt die absolute Anzahl TNF⁺ Zellen und der Anteil TNF⁺ Zellen in der Lamina propria ermittelt werden (Abb. 4). Pro Schnitt wurden 10 Felder gescannt (*high power fields*, HPF). Die Färbung und Auswertung an inForm erfolgte verblindet.

2.7 Statistik

Metrische und ordinale Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Bei nominalen Daten kam der Chi-Quadrat-Test zur Anwendung. Zur Bestimmung von Grenzwerten wurde eine *receiver operating characteristic* (ROC) durchgeführt. Um *confounder* bei Prädiktoren auszuschließen, wurde die logistische Regression mit Rückwärtsselektion angewandt. Die Ergebnisse wurden mit SPSS Statistics 25 von IBM, Armonk, USA und Prism Version 5 von Graph Pad Software, Inc., San Diego, USA ausgewertet und dargestellt. Eine Beratung im Institut für Biometrie der Charité wurde durchgeführt.

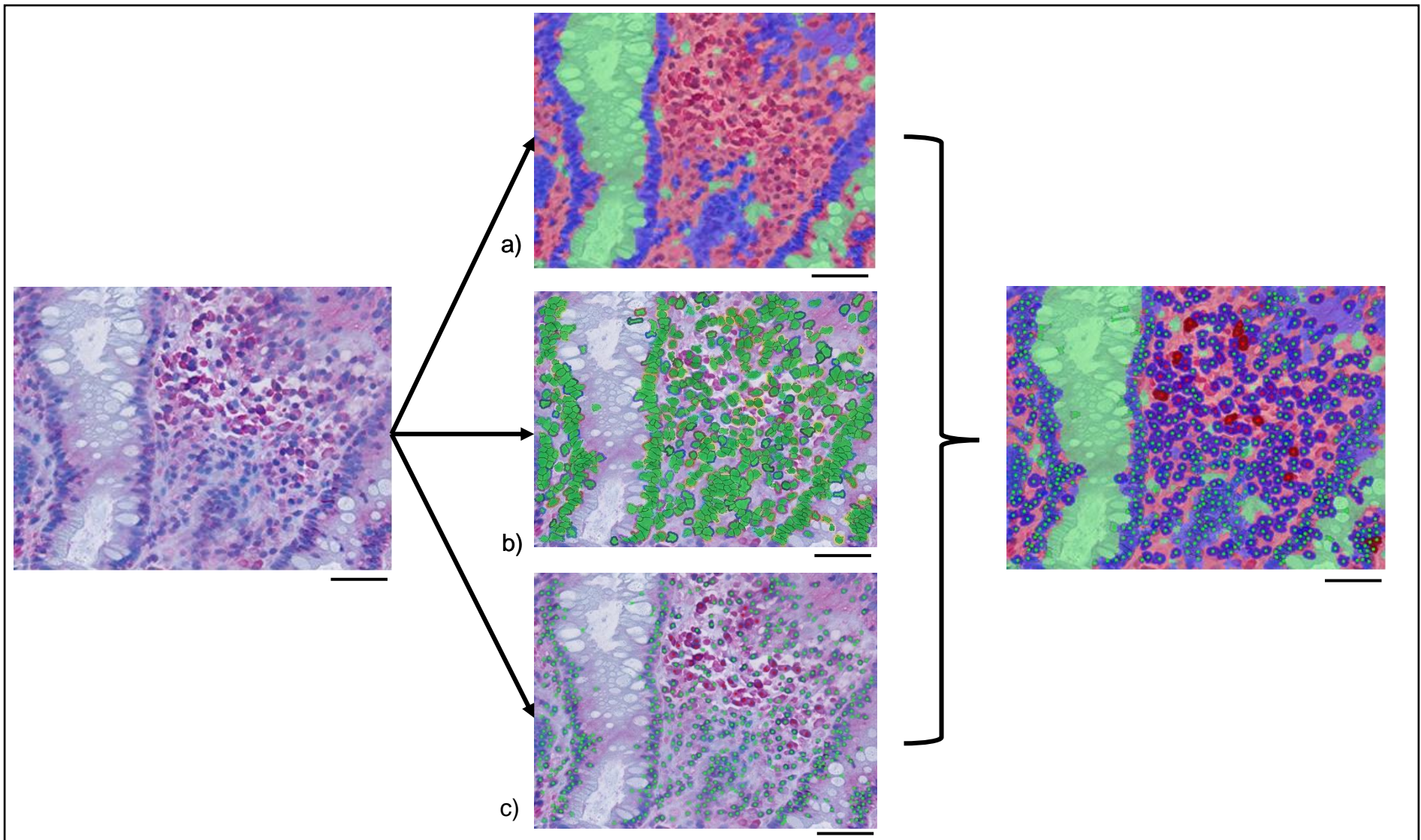


Abbildung 4. inForm Prozess: Die Schnitte wurden automatisiert ausgewertet; a) Aufteilung nach Lamina propria (rot), Epithel (grün) und andere (blau) b) Zellseperation c) TNF positiv (roter Punkt) und negativ (grüner Punkt). Die Lineale unterhalb der Grafiken entsprechen 25 μ m (Vergrößerung 400x)

3 Ergebnisse

Es konnten 41 Patienten (21 männlich, 20 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 38 Jahren (Standardabweichung; SD 12,8) eingeschlossen werden. Zusätzlich wurde von 10 gesunden Kontrollen Blut gewonnen, um die Zytokin-Produktion nach LPS-Stimulation vergleichen zu können. Die Erkrankungsdauer der Patienten seit Erstdiagnose lag im Median bei drei Jahren (Interquartilsabstand (IA): 0,7-9,9). MC-Patienten hatten durchschnittlich zur ersten IFX-Gabe einen HBI von 10,1 (SD 5,8), während CU-Patienten einen pMS von 6,4 (SD 2,0) aufwiesen.

Tabelle 17: Montreal-Klassifikation der eingeschlossenen Patienten

Montreal-Klassifikation	n
Alter	
A1 <17 Jahre	1
A2 17-40 Jahre	33
A3 >40 Jahre	7
Colitis ulcerosa - Ausbreitung	20
E1 Proktitis	0
E2 distale CU	10
E3 extensive CU	10
Morbus Crohn – Ausbreitung & Verhalten	21*
L1 Ileum	6
L2 Kolon	9
L3 Ileum+Colon	6
+ L4 Oberer Gastrointestinaltrakt	5
B1 nicht strikturierend, nicht penetrierend	15
B2 strikturierend	3
B3 penetrierend	2
+ p perianaler Befall	2

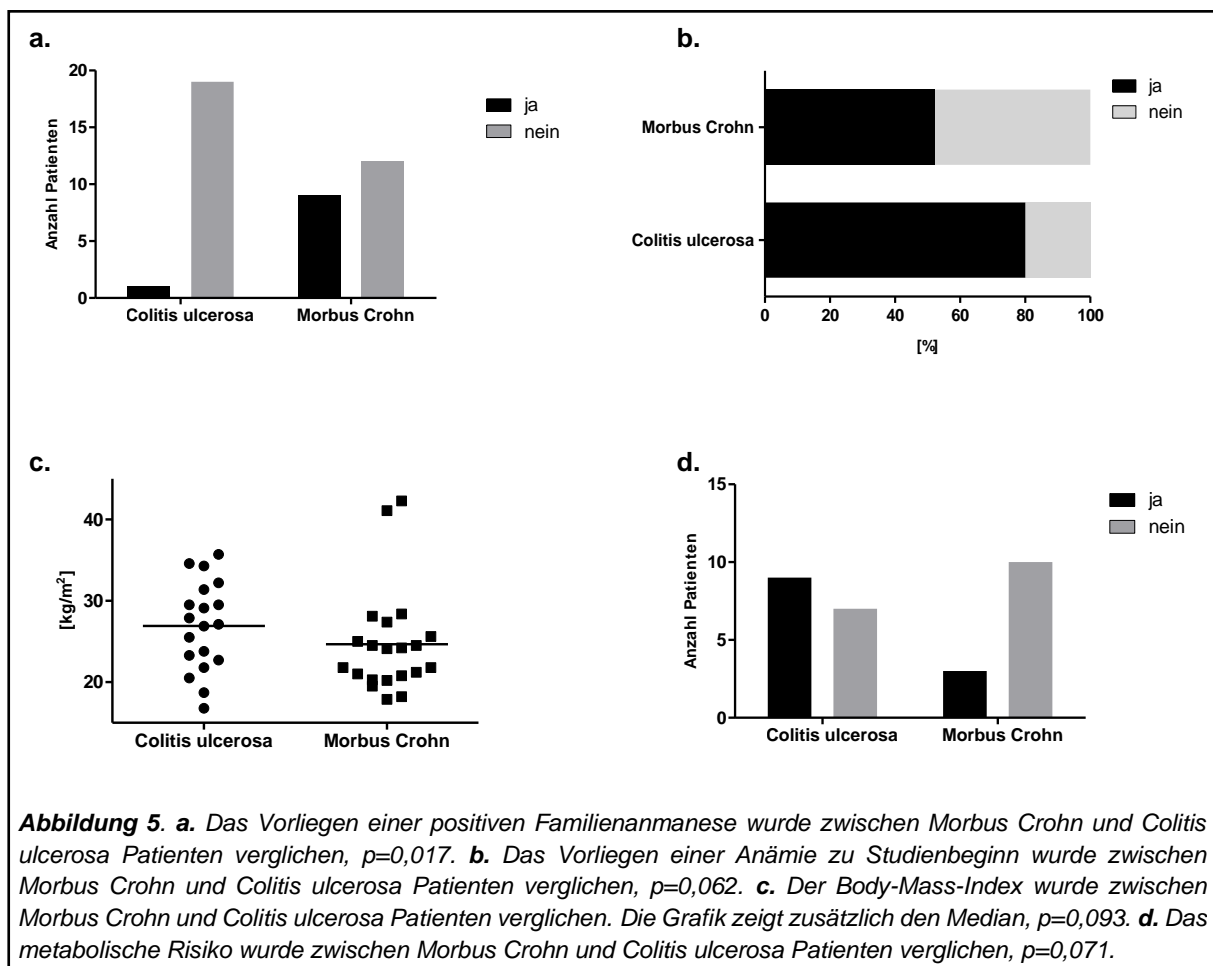
*Verhalten fehlt für einen Patient, CU=Colitis ulcerosa

3.1 Unterschiede zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten

In den erhobenen Charakteristika zu Studienbeginn fanden sich folgende Unterschiede zwischen den MC- und CU-Patienten:

- MC-Patienten haben signifikant häufiger eine positive Familienanamnese (9 von 21 vs. 1 von 20, $p=0,017$)
- Insgesamt zeigte sich eine höhere Tendenz zur Anämie bei CU-Patienten ($p=0,062$). Bei weiblichen Patienten galt ein Hämoglobin (Hb)-Wert von <12 g/dl und bei männlichen Patienten ein Wert von $<13,5$ g/dl als Anämie.

- Bei den erhobenen, metabolischen Daten zeigte sich außerdem eine Tendenz zu einem höheren BMI (Median 27 vs. 24, $p=0,093$) und einem höheren metabolischen Risiko (9 von 16 vs. 3 von 13, $p=0,071$, fehlende Werte $n=12$) bei CU-Patienten. Das metabolische Risiko wurde wie folgt in Anlehnung an die Kriterien der International Diabetes Federation (IDF 2005)⁴ für das metabolische Syndrom definiert:
 - Frauen Taille ≥ 80 cm + 1 mindestens abweichender metabolischer Laborwert (erhöhte Triglyzeride, erhöhter HbA1c oder niedriges HDL)
 - Männer Taillenumfang ≥ 94 cm + 1 mindestens abweichender metabolischer Laborwert (s.o.)



⁴ <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome>

3.2 Ansprechen auf die Therapie

Insgesamt sprachen 73,2% der Patienten auf die IFX-Therapie an, was 30 von 41 Patienten entspricht. Ein Vergleich der Patienten bzgl. allgemeiner Charakteristika zeigte, dass sich die ansprechenden Patienten in folgenden Punkten von den nichtansprechenden unterschieden:

- Die ansprechenden Patienten hatten einen höheren Limberg Score an Woche 0 (Median 2 vs. 1, $p=0,021$), Abb. 6a.
- Sie hatten eine kürzere Erkrankungsdauer ($p=0,018$), Abb. 6b.
- Weibliche Ansprecher benutzten eher Kontrazeptiva ($p=0,035$), Abb. 6d.

Die Differenz des CRPs war signifikant höher unter den ansprechenden Patienten (Median 22,1 vs. 1,7 mg/l, $p=0,033$, fehlende Werte $n=10$; Abb. 6c). Andere Merkmale, wie z.B. klinische und apparative Score-Werte oder zusätzliche Medikation in Form von Steroiden oder Azathioprin waren nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 14). Es zeigte sich aber eine Tendenz, dass ansprechende Patienten eher ihre Steroidmedikation reduzierten als nichtansprechende (89 vs. 50%, $p=0,148$; Abb. 6e).

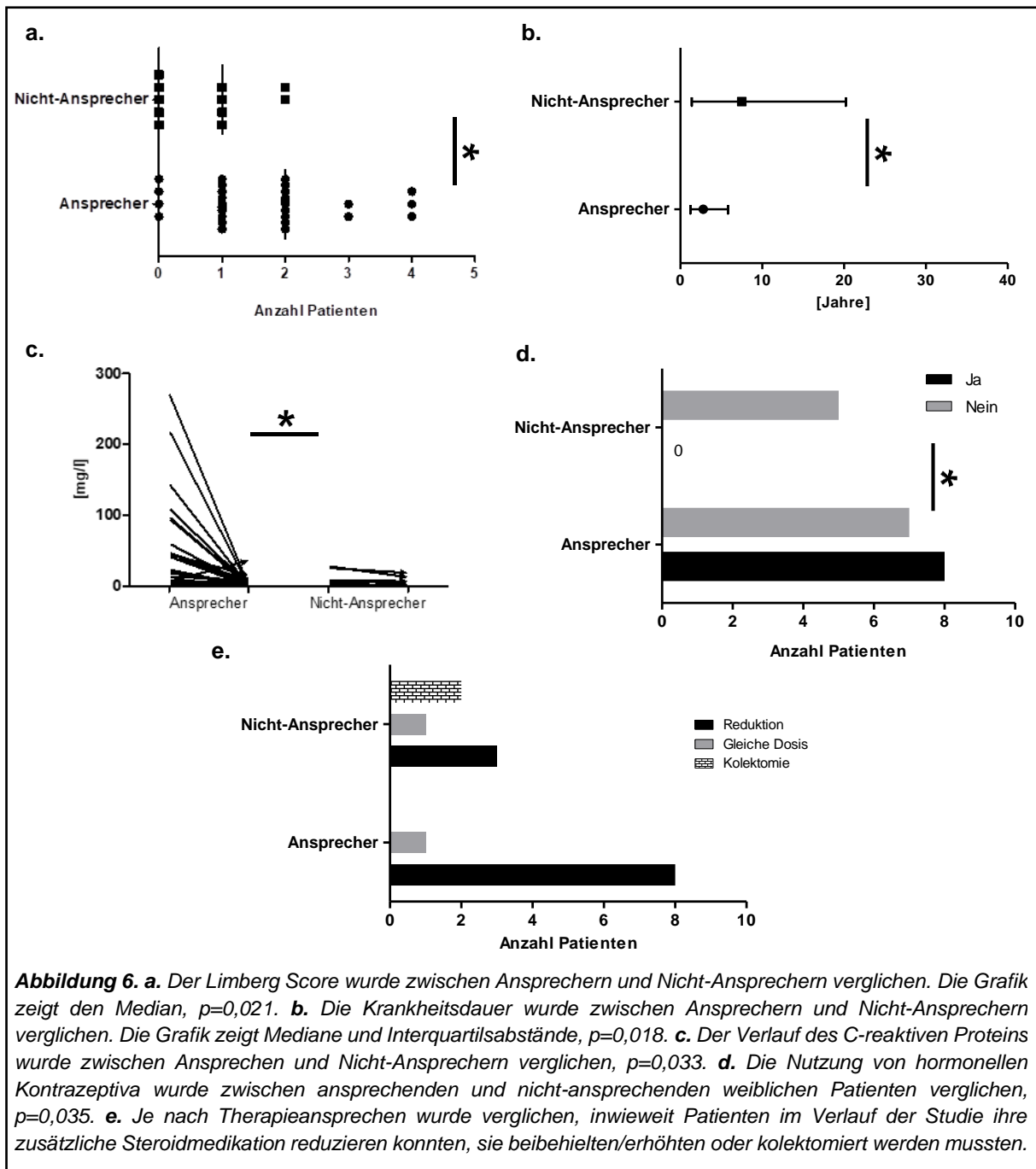


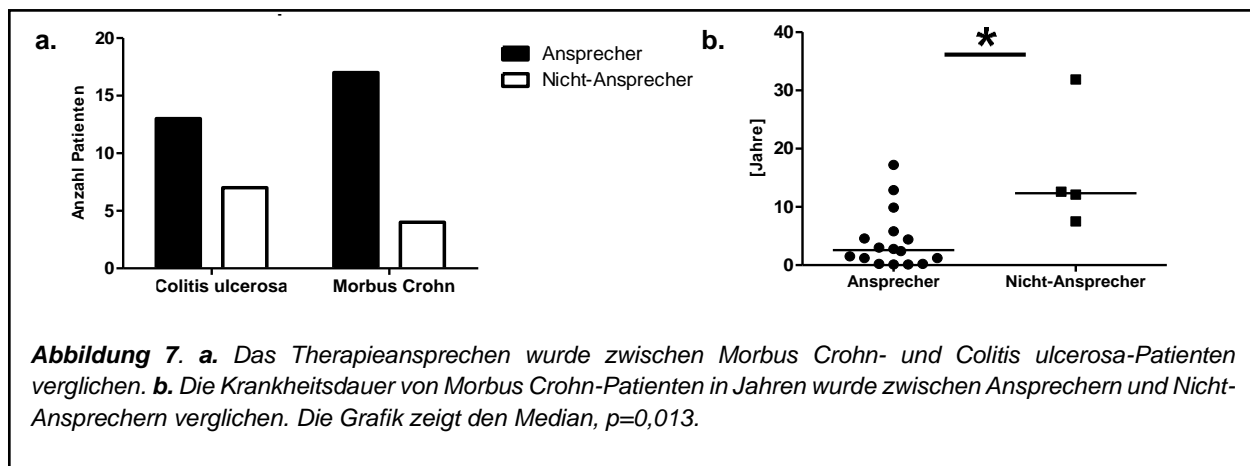
Abbildung 6. a. Der Limberg Score wurde zwischen Ansprechern und Nicht-Ansprechern verglichen. Die Grafik zeigt den Median, $p=0,021$. **b.** Die Krankheitsdauer wurde zwischen Ansprechern und Nicht-Ansprechern verglichen. Die Grafik zeigt Mediane und Interquartilsabstände, $p=0,018$. **c.** Der Verlauf des C-reaktiven Proteins wurde zwischen Ansprechen und Nicht-Ansprechern verglichen, $p=0,033$. **d.** Die Nutzung von hormonellen Kontrazeptiva wurde zwischen ansprechenden und nicht-ansprechenden weiblichen Patienten verglichen, $p=0,035$. **e.** Je nach Therapieansprechen wurde verglichen, inwieweit Patienten im Verlauf der Studie ihre zusätzliche Steroidmedikation reduzieren konnten, sie beibehielten/erhöhten oder kolektomiert werden mussten.

Tabelle 18: Vergleich der Patienten bezogen auf das Therapieansprechen

	Merkmal	Ansprecher (n=30)	Nicht-Ansprecher (n=11)	Statistik [p]
Allgemeine Daten und Klinische Scores	Alter bei Studieneintritt, <i>Median</i> (<i>Interquartilsabstand</i>); [Jahre]	32 (28-44)	44 (34-51)	0,075 ¹
	Geschlecht, <i>n</i> (%)			
	männlich	15 (50)	6 (54,5)	
	weiblich	15 (50)	5 (45,5)	0,796 ²
	Diagnose, <i>n</i> (%)			
	Colitis ulcerosa	13 (43,3)	7 (63,6)	
	Morbus Crohn	17 (56,7)	4 (36,4)	0,249 ²
	Alter			
	A1 <17 Jahre	1 (3,3)	0 (0)	
	A2 17-40 Jahre	25 (83,3)	8 (72,7)	
	A3 >40 Jahre	4 (13,3)	3 (27,3)	0,498 ²
	Colitis ulcerosa - Ausbreitung	13	7	
	E1 Proktitis	0 (0)	0 (0)	
	E2 distale CU	7 (53,8)	3 (42,9)	
	E3 extensive CU	6 (42,2)	4 (57,1)	0,639 ²
	Morbus Crohn, Ausbreitung/Verhalten	17	4	
	L1 Ileum	5 (29,4)	1 (25)	
	L2 Kolon	7 (41,2)	2 (50)	
	L3 Ileum+Kolon	5 (29,4)	1 (25)	0,950 ²
	+ L4 Oberer Gastrointestinaltrakt	5 (29,4)	0(0)	0,214 ²
B1 nicht strikturierend, nicht penetrierend	13 (81,3)	2 (50)		
B2 strikturierend	2 (12,5)	1 (25)		
B3 penetrierend	1 (6,3)	1 (25)	0,392 ²	
+ p perianaler Befall	2 (12,5)	0 (0)	0,456 ²	
Krankheitsdauer, <i>Median</i> (<i>Interquartilsabstand</i>); [Jahre]	2,3 (0,2-5,1)	7,5 (1,4-20,2)	0,018 ¹	
Medikation	Zusätzlich Prednisolon, <i>n</i> (%)	13 (43,3)	8 (72,7)	0,095 ²
	Zusätzlich Azathioprin, <i>n</i> (%)	8 (26,7)	2 (18,2)	0,575 ²
	Infliximab Marke, <i>n</i> (%)			
	Remicade®	27 (90)	7 (63,6)	
	Inflectra®	2 (6,7)	4 (36,4)	
	Remsima®	1 (3,3)	0 (0)	0,053 ²
	Hormonelle Kontrazeption in weiblichen Patienten (n=20), <i>n</i> (%)	8 von 15 (53,3)	0 von 5 (0,0)	0,035 ²
Scores	Klinische Scores, <i>Median</i> (<i>Interquartilsabstand</i>)			
	HBI	11,0 (5,5-16,5)	6,5 (3,8-9,3)	0,144 ¹
	Mayo	6,0 (5,0-8,0)	7,0 (3,0-8,0)	0,938 ¹
	Limberg Score, <i>Median</i> (<i>Interquartilsabstand</i>)	2 (1-2); *n=1	1 (0-1)	0,021 ¹

HBI, Harvey-Bradshaw index, 1=Mann-Whitney U Test; 2=Chi-Quadrat-Test; * fehlende Werte

Bei Betrachtung der einzelnen Diagnosen ergaben sich die folgenden Ansprechraten: CU-Patienten sprachen zu 65% (13 von 20) an, während MC-Patienten in 81% (17 von 21) der Fälle auf IFX eine klinische Besserung zeigten (Abb. 7a). Innerhalb der einzelnen Diagnosen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den erhobenen Baseline-Charakteristika mit Ausnahme der Krankheitsdauer bei MC-Patienten, welche auch hier signifikant länger bei Nicht-Ansprechern war (Median 2,4 vs. 12,4 Jahre, $p=0,013$; Abb. 7b).



3.3 Prädiktoren aus Anamnese, Körperlicher Untersuchung & Laborwerten

Weder in der Anamnese (Familienanamnese, Rauchstatus, Packungsjahre/ *pack years*) noch in der klinischen Untersuchung (BMI, Taille- und Hüftumfang) zeigten sich signifikante Unterschiede, die ein Therapieansprechen hätten vorhersagen können. Laborwerte bezogen auf Blutbild, Entzündung und Metabolismus ergaben auch keinen Hinweis auf prädiktive Unterschiede. Ein Vergleich innerhalb der MC-Patienten zeigte eine Tendenz, dass Nicht-Ansprecher eher anämisch (Hämoglobin Median 13 vs. 11 g/dl, $p=0,052$) und älter bei Studieneintritt waren (31 vs. 50 Jahre, $p=0,052$).

Tabelle 19: Mögliche Prädiktoren in Anamnese, Körperlicher Untersuchung & Labor

	Merkmal	Ansprecher (n=30)	Nicht-Ansprecher (n=11)	Statistik [p]
Anamnese	Familienanamnese, n (%)			
	Keine/unbekannt	22 (73,3)	9 (81,8)	
	Ja, erstgradig	5 (16,7)	2 (18,2)	
	Ja, andere	3 (10,0)	0 (0)	0,552 ²
	Raucher bei Studienbeginn, n (%)	5 (19,2); *n=4	3 (27,3)	0,587 ²
Anamnese	Packungsjahre, Median (interquartile range); [years]	5,0 (0,0-18,5)	0,0 (0,0-11,0)	0,495 ¹
	Körperliche Untersuchung			
Körperliche Untersuchung	BMI, median (interquartile range); [kg/m ²]	24,4 (21,0-28,2)	26,2 (21,4-30,8); n=1	0,508 ¹
	WHO Adipositas Klassifikation (155), n (%)			
	normal	14 (46,7)	4 (40)	
	Übergewicht	2 (6,7)	1 (10)	
	Untergewicht	9 (30)	3 (30)	
Körperliche Untersuchung	Adipositas °I-III	5 (16,7)	2 (20); *n=1	0,972 ²
	Taille-/Hüftumfang, Median (Interquartilsabstand)	0,9 (0,8-0,9); *n=5	0,9 (0,8-1,0); *n=4	0,175 ¹
Laborwerte Blutbild/Entzündung	Anämie, n (%)	19 (63,3)	8 (72,7)	0,574 ²
	Albumin, Median (Interquartilsabstand); [g/l]	35,5 (29,3-39,5); *n=4	38,7 (33,6-39,3); *n=3	0,288 ¹
	Ferritin, Median (Interquartilsabstand); [µg/l]	107,8 (32,6-259,9); *n=5	48,2 (14,4-193,1), *n=2	0,355 ¹
	CRP, Median (Interquartilsabstand); [mg/l]	28,2 (6,4-97,6)	11,3 (1,8-54,5)	0,359 ¹
	Leukozyten, Median (Interquartilsabstand); [/nl]	9,7 (7,3-12,1)	11,4 (6,8-12,5)	0,591 ¹
	Thrombozyten, Median (Interquartilsabstand); [/nl]	373 (309-472)	339 (295-402)	0,329 ¹
	Calprotectin, Median (Interquartilsabstand); [µg/g]	440 (205-800); *n=14	800 (408-800); *n=4	0,249 ¹
	Laborwerte Metabolismus			
Laborwerte Metabolismus	Gesamtcholesterin, Median (Interquartilsabstand); [mg/dl]	146 (108-177), *n=2	168 (116-204), *n=3	0,443 ¹
	HDL, Median (Interquartilsabstand); [mg/dl]	47 (28-57), *n=1	54 (44-75), *n=3	0,266 ¹
	LDL, Median (Interquartilsabstand); [mg/dl]	84 (60-108), *n=1	98 (50-104), *n=3	0,814 ¹
	Triglyzeride, Median (Interquartilsabstand); [mg/dl]	102 (89-129), *n=1	117 (91-125), *n=3	0,625 ¹
	HbA1c, Median (Interquartilsabstand); [%]	5,4 (5,2-5,6), *n=2	5,6 (5,1-6,1), *n=3	0,443 ¹
	Metabolisches Risiko, n (%)	10 (41,7), *n=6	2 (40), *n=6	0,945 ²

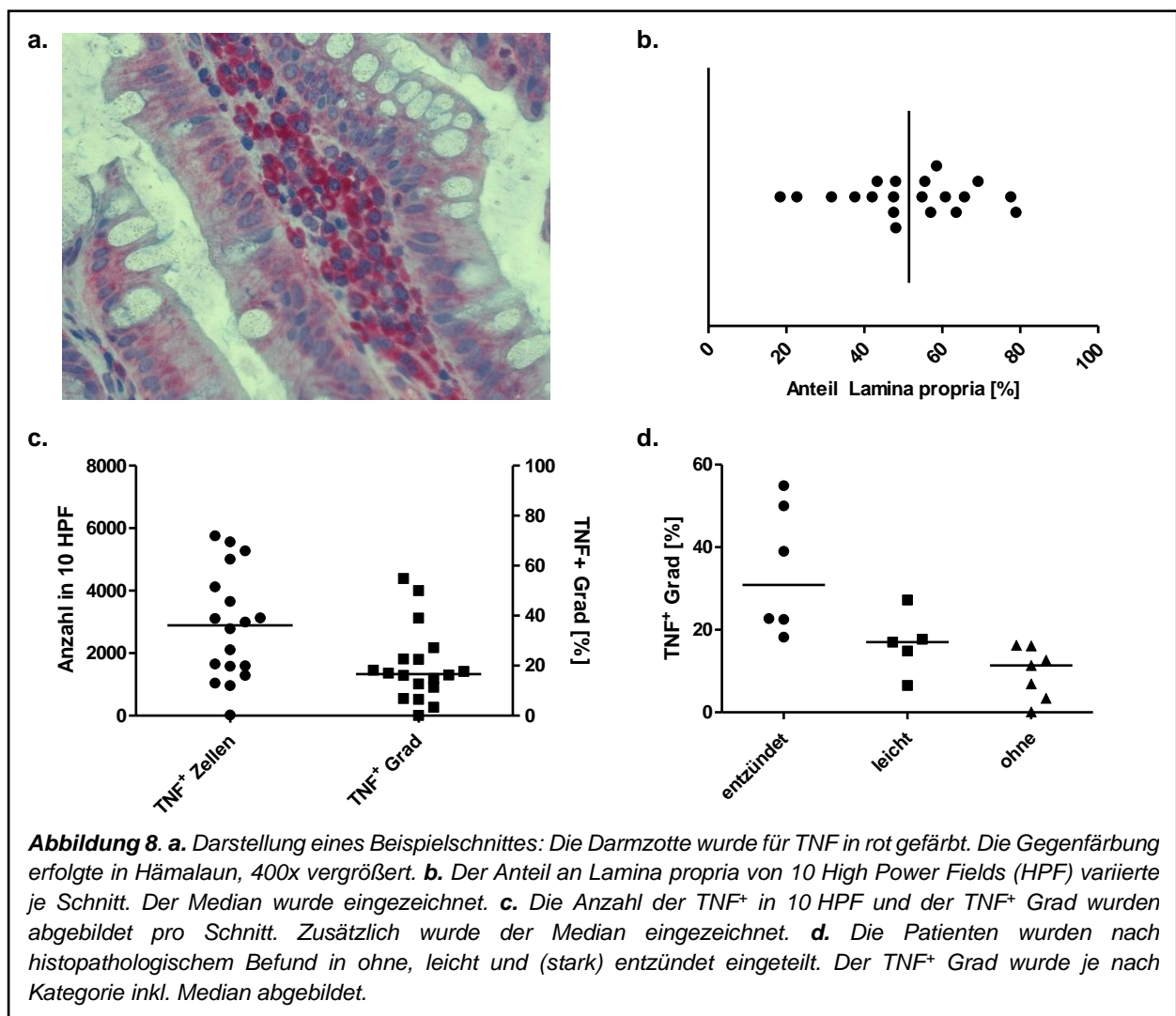
1=Mann-Whitney U Test; 2=Chi-Quadrat-Test; * fehlende Werte, WHO=World Health Organization, CRP=C-reaktives Protein, HDL=High-Density Lipoprotein, LDL=Low-Density Lipoprotein

3.4 Experimentelle Prädiktoren

Tumornekrosefaktor- α -Expression in der Lamina propria als Prädiktor

Es standen Biopsien von 8 Patienten zur Verfügung. Teilweise wurden mehrere Biopsien an verschiedenen Orten entnommen, was zu einer Gesamtzahl von 18 verschiedene Schnitten führte, welche gefärbt wurden. Aus jeweils 10 HPF pro Schnitt wurde ein Durchschnittswert für den Anteil an Lamina propria errechnet. Da dieser stark variierte (Abb. 3b), wurde die Gesamtanzahl TNF⁺ Zellen pro Schnitt (10 HPF) in einen TNF⁺ Grad in % umgerechnet.

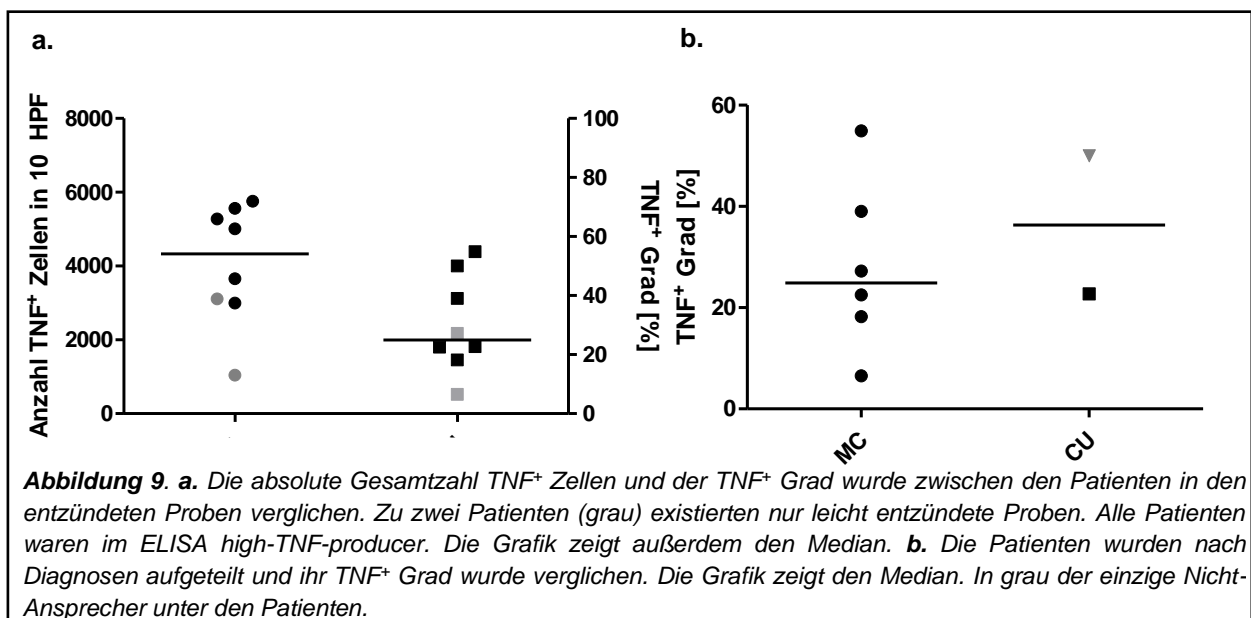
$$\text{TNF}^+ \text{ Grad} = (\text{TNF}^+ \text{ Zellen/alle Zellen}) \times (\text{Lamina propria Anteil})$$



Insgesamt variierte die Anzahl TNF⁺ Zellen stark von 537 bis 7017 in 10 HPF. Durch die Berechnung des TNF⁺ Grads blieb die Variation erhalten (Abb. 8c). Die Schnitte wurden nach histopathologischem Befund in entzündet, leicht (entzündet) und ohne

(Entzündung) eingeteilt. Es zeigte sich, dass der TNF⁺ Grad zunahm, wenn die Biopsie aus einem entzündeten Areal entnommen wurde, wobei aber innerhalb der entzündeten Proben weiterhin eine Variation bestand (Abb. 8d).

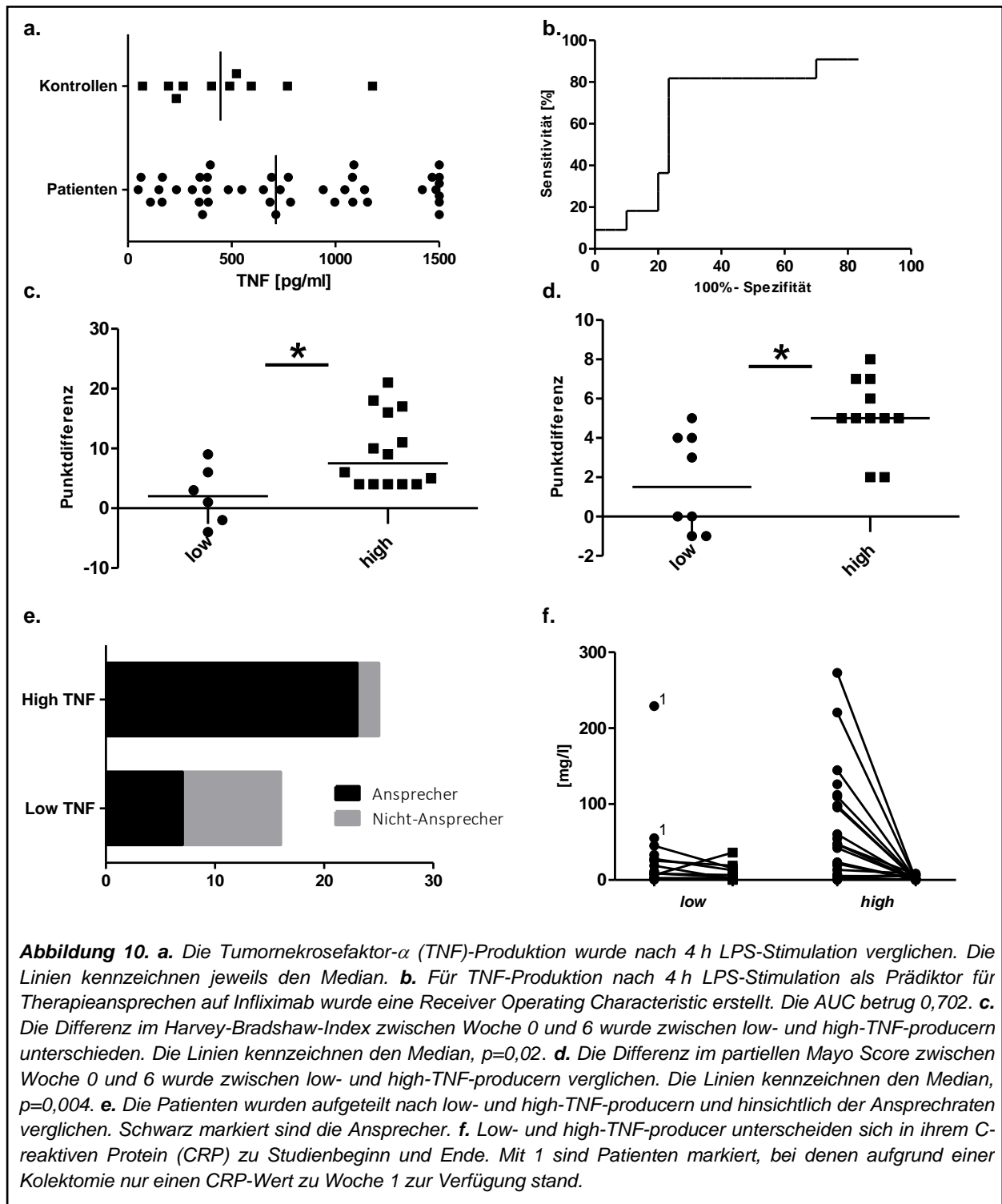
Abbildung 8c zeigt für jeden Patient die Anzahl TNF⁺ Zellen (bzw. den TNF⁺ Grad) aus der jeweiligen entzündeten Probe. Für zwei Patienten waren nur leicht entzündete Proben verfügbar. Die 8 Patienten unterschieden sich stark hinsichtlich ihres TNF⁺ Grades, wobei sich nach Entblindung herausstellte, dass alle Patienten im ELISA als *high-TNF-producer* klassifiziert waren (Abb. 9). Von den 8 Patienten hatten 7 auf die TNF-Therapie angesprochen. Aufgrund der niedrigen Fallzahl und des Fehlens von *low-TNF-producers* wurden keine Korrelation mit Therapieansprechen durchgeführt.



Tumornekrosefaktor- α -Expression im Blut als Prädiktor für Therapieansprechen

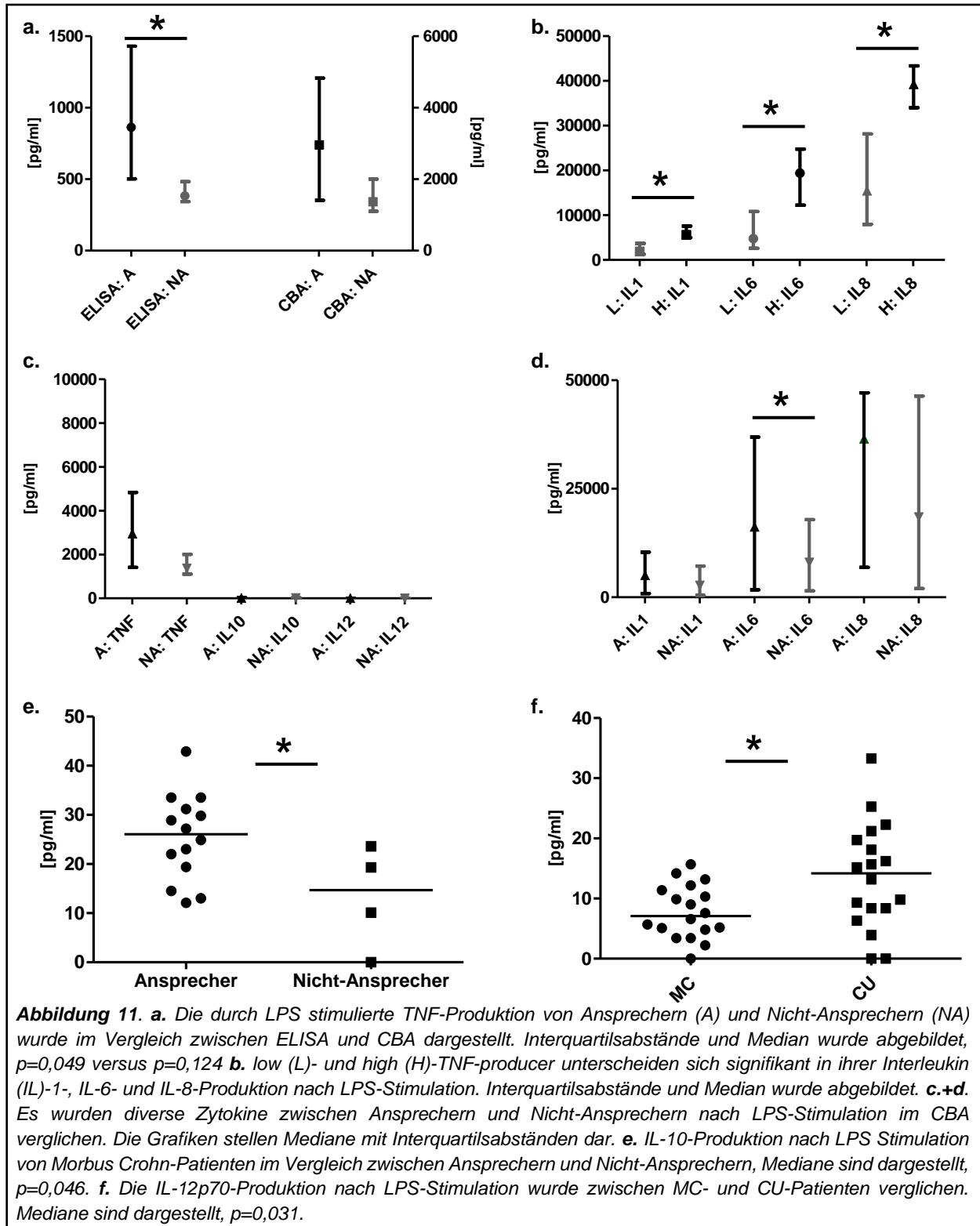
Die TNF-Produktion nach 4 h LPS Stimulation der Patienten war im Vergleich zu gesunden Kontrollen höher, wenn auch nicht statistisch signifikant (Median 713 vs. 490 pg/ml, $p=0,117$; Abb. 10a). In den unstimulierten Proben konnte zum größten Teil keine TNF-Produktion gemessen werden. Ansprecher produzierten signifikant mehr TNF als Nicht-Ansprecher ($p=0,049$). Um einen Grenzwert festzulegen, wurde mit allen TNF-Konzentrationen der Patienten eine (ROC) durchgeführt. Die *area under the curve* (AUC) betrug 0,702 (Abb. 10b). Der Grenzwert wurde bei 500 pg/ml gewählt, da er die beste Kombination aus Sensitivität und Spezifität mit einem Youden-Index von 0,6 ergab. Während die Sensitivität 82% erreichte, betrug die Spezifität 78%. Mittels des

Grenzwertes wurden die Patienten in *low*- und *high-TNF-producer* eingeteilt. Nur 44% der *low-TNF-producer* zeigten ein Ansprechen auf die IFX-Therapie, während mit 92%



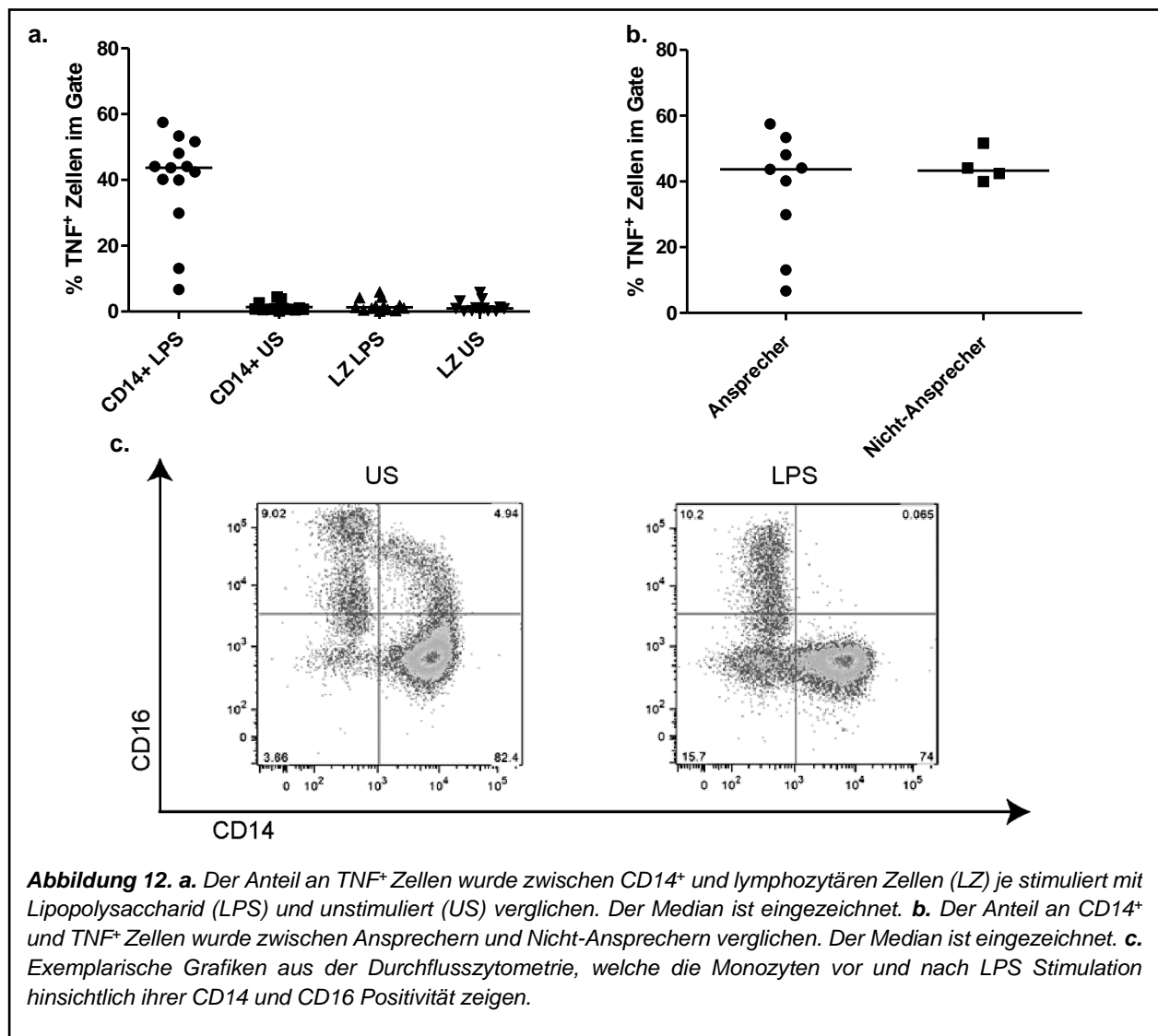
der *high-TNF-producer* ein deutlich höherer Teil profitierte (Abb. 10e). Die Differenz der jeweiligen klinischen Scores war signifikant höher bei *high-TNF-producern* (HBI Differenz: 7,5 vs. 2,0, $p=0,02$; pMayo Differenz 5, 0 vs. 1,5, $p=0,004$; Abb. 10c+d).

Außerdem hatten sie ein höheres Baseline-CRP (Median 46,9 vs. 10 mg/l, $p=0,063$), welches auch signifikant stärker abfiel im Verlauf der sechs Wochen (Median 39,9 vs. 1,8 mg/l, $p=0,02$; Abb 10f). Eine logistische Regression ergab, dass *low-TNF-producer* eine 14,8 Mal (OR) erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, nicht auf IFX anzusprechen (KI 2,6-85,1).



Weitere inflammatorische Zytokine im Blut als Prädiktoren

Im CBA zeigte sich, dass Ansprecher signifikant mehr IL-6 produzieren als Nicht-Ansprecher ($p=0,028$) (Abb. 11d). Im Gegensatz zum ELISA war im CBA die TNF-Produktion nicht signifikant unterschiedlich, wobei die Tendenz deutlich zu erkennen war (Abb. 11a+c). Bei Aufteilung der Patienten in bereits erläuterten Kategorien *low-* und *TNF-producer* nach ELISA-Daten ergab sich, dass eine hohe TNF-Produktion mit einer signifikant höheren IL-1-, IL-6- und IL-8-Produktion nach LPS-Stimulation einhergeht (IL-1 und IL-8 auch unstimuliert) (Abb. 11b). Innerhalb der einzelnen Diagnosen war bei MC-Patienten die IL-10 (26 vs. 15 pg/ml, $p=0,046$, fehlende Werte $n=3$; Abb. 11e) nach LPS-Stimulation bei Ansprechern signifikant erhöht. Ein Vergleich zwischen den CU- und MC-Patienten ergab eine erhöhte IL-12p70 bei CU-Patienten (7 vs. 14 pg/ml, $p=0,031$, fehlende Werte $n=5$; Abb. 11f).



Identifikation der Tumornekrosefaktor- α produzierenden Zellen im Blut

Die Durchflusszytometrie erfolgte für 13 Patienten. Im Vergleich waren CD14⁺ Monozyten deutlich häufiger TNF⁺ als Lymphozyten nach LPS-Stimulation (Abb. 12a). Bei unstimulierten Zellen waren kaum Unterschiede in der TNF-Produktion zu erkennen. Dies änderte sich durch Stimulation deutlich (SD 1,36 vs. 14,92%), während lymphozytäre Zellen weiterhin wenig bis gar nicht TNF⁺ waren. Der Anteil an TNF⁺ Zellen nach Stimulation korrelierte nicht mit *low* oder *high* TNF im ELISA. Ansprecher und Nicht-Ansprecher unterschieden sich nicht signifikant in ihrem Anteil an TNF⁺ CD14⁺ Zellen, wobei hier eine geringe Fallzahl vorlag (Abb. 12b). Bei der geplanten Subklassifikation der Monozyten erwies sich als schwierig, dass die CD16-Färbung nach LPS-Stimulation nicht auswertbar war. Ein Großteil der Monozyten war nach Stimulation nicht mehr CD16⁺ (Abb. 12c). Eine Literaturrecherche ergab, dass CD16 durch LPS-Stimulation herunterreguliert wird (156).

Identifikation des stärksten Prädiktors

Zusammenfassend hatten folgende Parameter eine Assoziation mit Ansprechen auf Infliximab gezeigt:

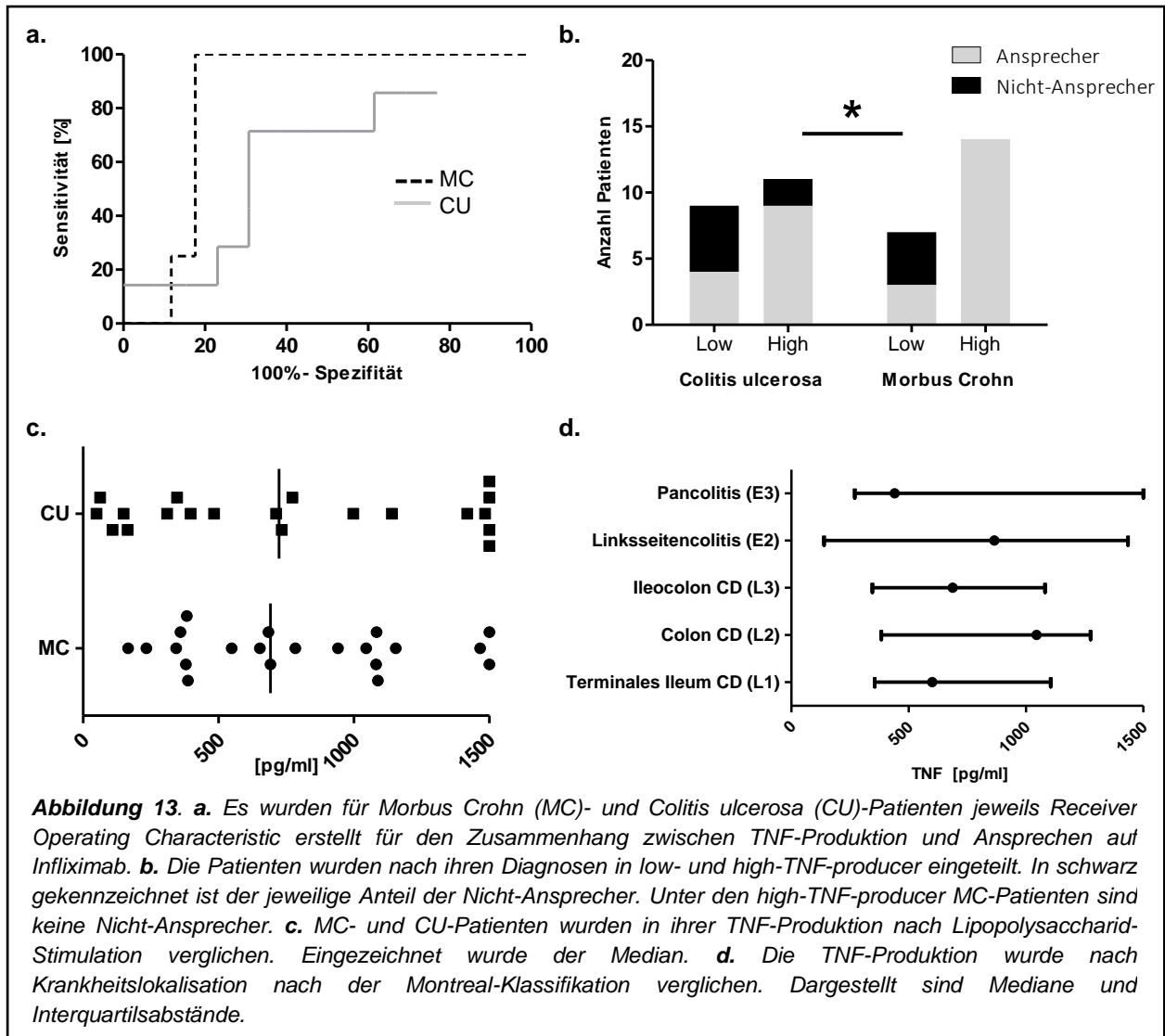
- TNF hoch/niedrig
- IL-6-Produktion
- Erkrankungsdauer
- Limberg-Score

Eine logistische Selektion mit Rückwärts-Selektion wurde mit o.g. Parametern durchgeführt, um mögliche Confounder auszuschließen. Da der Limberg-Score nur für MC validiert wurde, wurde er mathematisch mit der Diagnose MC verlinkt. Als Ergebnis zeigte sich, dass eine hohe-TNF-Produktion (OR 16,2, KI 1,8-148,7) stark unabhängig mit dem klinischen Ansprechen auf IFX nach Woche 6 assoziiert war.

Hohe Tumornekrosefaktor- α -Produktion als starker Prädiktor für MC-Patienten

Um zu untersuchen, ob die hohe-TNF-Produktion einen unterschiedlich starken Prädiktor für die einzelnen Diagnosen darstellt, wurde für die Patienten separat eine ROC durchgeführt. Die AUC war für MC-Patienten wesentlich höher als für CU-Patienten (0,838 vs. 0,621, Abb. 13a). Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen TNF-Produktion und dem Ort der Entzündung nach Montreal-Klassifikation (Abb. 13d). Die TNF-Produktion war außerdem nicht unterschiedlich zwischen MC- und CU-Patienten

(Abb. 13c). Der CUT-off bei 500 pg/ml führte bei CU-Patienten zu einem Youden-Index 0,26 (Sensitivität: 57% und Spezifität von 69%, Youden-Index für alle Patienten insgesamt 0,6). Für MC-Patienten erhöhte sich der Youden-Index auf 0,82 mit einer Sensitivität von ca. 100% und einer Spezifität von 82%. Alle *high-TNF-producer* unter den MC-Patienten sprachen auf die IFX-Therapie an (Abb. 13b). Bei CU-Patienten waren es hingegen nur 81%, was bedeutet, dass der Prädiktor stärker für MC ist.



4 Diskussion

Die TNF-Produktion von PBMC nach LPS-Stimulation unterscheidet sich in Patienten mit CED und kann vor allem für MC-Patienten als Prädiktor für ein Therapieansprechen auf IFX genutzt werden. Hierbei ist hervorzuheben, dass es ein unabhängiger, starker Prädiktor im Vergleich zu z.B. Krankheitsdauer, Limberg Score oder IL-6-Produktion war. Es sind dabei vor allem die CD14⁺ Monozyten, die das TNF produzieren. Atreya et al. konnten bereits früher zeigen, dass man durch das Anfärben von membrangebundenem TNF während der Endoskopie und anschließender endomikroskopischer Auswertung Ansprechen vorhersagen kann. Patienten mit einer hohen Anzahl TNF⁺ Zellen sprachen zu 92% an, während Patienten mit niedrigem TNF-Signal nur zu 15% ansprachen (135). In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Assoziation zwischen hoher TNF-Produktion und Ansprechen auf eine anti-TNF-Therapie durch die Isolation von mononukleären Zellen im Blut und deren Stimulation durch LPS hergestellt werden. Dieser Ansatz ist weniger invasiv und breiter verfügbar, da keine endomikroskopische Auswertung benötigt werden. Auch in der Histologie und der Durchflusszytometrie zeigten sich Unterschiede in der TNF-Produktion, wobei hier die Fallzahl sehr gering war. Für den Prädiktor *high/low* TNF-Produktion auf Basis der ELISA-Daten war die Sensitivität für MC-Patienten mit ca. 100% ein vielversprechendes Ergebnis.

Neben der geringen Fallzahl ist eine Schwäche der Studie die Bestimmung des klinischen Ansprechens durch den HBI und den pMS. Das klinische Scoring beinhaltet subjektive Faktoren. „Bauchschmerzen“ im HBI können durch Schmerzmedikation unterschiedlich stark wahrgenommen werden und Resistenzen im Abdomen zu palpieren ist untersucherabhängig. Der Limberg Score, der in der Darmsonographie zur Beurteilung der Entzündung der Darmwand eingesetzt wird (siehe Tabelle 4), sollte als objektive klinische Untersuchung unterstützen, wobei er nur für den MC validiert wurde (157). Eine endoskopische Beurteilung nach sechs Wochen wäre objektiver gewesen, wobei der pMS z.B. als guter Ersatz für den kompletten Mayo Score inkl. Endoskopie empfohlen wurde (148). Der CRP-Verlauf entsprach außerdem überwiegend dem klinischen Ansprechen. Die Differenz zwischen Woche 0 und 6 war signifikant größer bei Ansprechern als bei Nicht-Ansprechern. Unsere Ergebnisse waren wesentlich eindeutiger im ELISA, als im CBA, der Durchflusszytometrie oder der Histologie. Eine andere Studie konnte Zusammenhänge in der Durchflusszytometrie erkennen (137). Niedriges TNF in unstimulierten Proben war assoziiert mit Nicht-Ansprechen. Die Ergebnisse entsprechen

im Kern denen dieser Studie, wobei hier keine Unterschiede in der TNF-Produktion in unstimulierten Proben in der Durchflusszytometrie, im ELISA oder CBA beobachten werden konnten. Für die Histologie und Durchflusszytometrie wären größere Fallzahlen für bessere Aussagen erforderlich. ELISA scheint am besten geeignet, da es verhältnismäßig günstig, einfach und häufiger verfügbar ist. Der CBA bietet den Vorteil andere Zytokine mitmessen zu können. Die Ergebnisse waren im CBA zwar nicht signifikant, die Tendenz aber gleich. Der CBA wurde erst am Ende der Studie durchgeführt, nach dem die Proben unterschiedlich oft aufgetaut worden waren, weswegen der ELISA eine höhere Vergleichbarkeit in dieser Kohorte bot.

Die Krankheitsdauer unterschied sich signifikant zwischen Ansprechern und Nicht-Ansprechern (2,3 vs. 7,5 Jahre, $p=0,018$), wobei die Subgruppenanalyse zeigte, dass dies eher auf die MC-Patienten zurückzuführen war ($p=0,013$ vs. $p=0,311$). Dies entspricht der Studienlage, die Krankheitsdauer auch eher für MC als Prädiktor identifiziert. Bei CU-Patienten gab es entweder keine Unterschiede im Ansprechen auf IFX bezogen auf die Krankheitsdauer oder eine Krankheitsdauer von weniger als 3 Jahren war sogar prädiktiv für eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Kolektomie nach Infliximab oder Placebo (128, 158). Während bei MC-Patienten einzelne Studien einen Zusammenhang zwischen kürzerer Krankheitsdauer und Ansprechen herstellen konnten (159, 160), zeigten andere keine Assoziation (121, 129, 161). Längere Krankheitsdauer führt eher zu strukturellen Schäden, während akute Entzündung eine geringere Rolle spielt, was erklären könnte warum IFX schlechter wirkt. Dies zeigt sich an unseren Limberg Score Daten. Nicht-Ansprecher hatten einen signifikant niedrigeren Limberg Score ($p=0,021$), der auf weniger starke Entzündung hinweist. Dementsprechend hatten die nicht-ansprechenden MC-Patienten zur Hälfte bereits strukturelle Schäden in der Montreal Klassifikation (25% strikturierendes und 25% penetrierendes Verhalten), während die Ansprecher zu 81% nur inflammatorisches Verhalten zeigten (nicht signifikant auf Grund geringer Fallzahl).

Die signifikant unterschiedliche IL-6-Produktion ist auf die Induktion durch TNF zurückzuführen (162). In der logistischen Regression war TNF der stärkere unabhängige Prädiktor.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Patienten in *low-* und *high-TNF-producer* aufgeteilt werden können und dies das Ansprechen auf IFX vorhersagt. Ein

Zusammenhang konnte bestätigt werden, wobei die zusätzliche Überprüfung, ob *high-TNF-producer* auch vermehrt TNF⁺ Makrophagen in der Lamina propria aufweisen auf Grund der niedrigen Verfügbarkeit an Biopsien, nicht untersucht werden konnte. Hinzu kam, dass nur die TNF-Färbung zuverlässig in den Biopsien funktionierte, wohingegen die Charakterisierung von Makrophagen und/oder T-Zellen in den Schnitten unterschiedlich gut funktionierte. Hierbei könnten der Weg von der Endoskopie zur Pathologie und eine evtl. unterschiedlich gute Fixierung verantwortlich sein. In einer zukünftigen Studie sollte versucht werden, die Biopsien direkt nach Entnahme und nach gleichem Protokoll zu fixieren und weiter zu behandeln.

Auffällig war, dass bei den MC-Patienten alle *high-TNF-producer* auf die Therapie ansprachen. *High-TNF-producer*, die nicht ansprachen (n=2), fanden sich bei den CU-Patienten. Hierbei könnte es sich um sog. pharmakokinetische Nicht-Ansprecher handeln. In der Literatur wird zwischen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Nicht-Ansprechern unterschieden und empfohlen Talspiegel von IFX und Antikörper gegen IFX zu bestimmen (133). Bei einem pharmakokinetischen Nicht-Ansprechen könnten die Talspiegel von IFX erniedrigt sein, während normale Talspiegel eher für ein pharmakodynamisches Nicht-Ansprechen sprechen würden. Bei niedrigen Talspiegeln müsste evtl. einfach die Dosierung angepasst werden und Patienten würden ansprechen. Papamichael et al. empfiehlt frühes therapeutisches Messen des Medikamentenspiegels (*therapeutic drug monitoring*, TDM), wobei andere Studien zeigten, dass klinisch basiertes Dosieren nicht unterlegen ist (163, 164). Es wird aktuell versucht ein Konsens zu finden, wobei man hier bei den anti-TNF-Medikamenten weiter ist als bei anderen Biologika (165).

Für einen der beiden CU-Patienten, die zwar hoch TNF produzierten, aber nicht ansprachen, lag der pMS für Woche 2 vor. Beide hatten zu Beginn der Studie ein Calprotectin >800 µg/g als objektiver Marker für eine vorliegende Colitis. Der Score war von initial 6 auf 2 gefallen, was einem deutlichen Ansprechen entspricht. Zu Woche 6 ergab der Score allerdings wieder 6 und der Patient wurde bei einem insgesamt Rückgang um 2 Punkte als Nicht-Ansprecher klassifiziert. Der Patient ist außerdem einziger Nicht-Ansprecher unter den Patienten, für die eine Biopsie vorlag. Auch hier ist der TNF⁺ Grad überdurchschnittlich hoch (50%), wobei zum Vergleich kein TNF⁺ Grad für *low-TNF-producer* vorliegt. Ein weiterer Grund könnte eine schnelle Clearance von IFX sein, was durch niedrige Albuminserumkonzentration vorhergesagt werden könnte

(125, 166). Der Patient hatte eine normale Albuminserumkonzentration, weswegen evtl. in diesem Fall ein pharmakokinetisches Nicht-Ansprechen aufgrund unzureichender Dosierung vorlag. Diesen Patienten könnte man mit einer angepassten Dosierung vielleicht helfen (167).

Insgesamt waren die Ergebnisse für CU-Patienten weniger eindeutig als für MC-Patienten. Bei den CU-Patienten erhielten die Ansprecher signifikant häufiger ($p=0,033$) das Original statt ein Biosimilar Präparat, wobei die Gleichwertigkeit von Biosimilars in großen Studien nachgewiesen wurde und dieses Ergebnis auf Grund der niedrigen Fallzahl nicht berücksichtigt wurde (168). Die TNF-Produktion war im Vergleich zwischen den Diagnosen nicht unterschiedlich (Abb. 4c). Auch in den Grundcharakteristika gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bis auf die Familienanamnese, die für MC-Patienten häufiger positiv war. Ob die TNF-Produktion auf LPS-Stimulation genetisch determiniert ist, müsste überprüft werden. Es gibt Hinweise darauf, dass TLR-4 Polymorphismen mit Ansprechen in Zusammenhang stehen (169). Auch die IL-10-Produktion von MC-Patienten war unter Ansprechern signifikant höher. Inwieweit auch IL-10 prädiktiv nutzbar ist bei MC-Patienten, muss in größeren Kohorten überprüft werden. In einer Studie von 2019 konnte eine Assoziation zwischen hohen oder niedrigen IFX-Talspiegeln mit IL-10 Genpolymorphismen bei MC-Patienten hergestellt werden (170). Die CU-Patienten dieser Kohorte zeigten insgesamt eine Tendenz zu metabolischen Abweichungen (höherer BMI ($p=0,09$, fehlende Werte $n=1$), häufigeres metabolisches Risiko (9 von 16 vs. 3 von 13, $p=0,071$, fehlende Werte $n=12$)). Ob dies mit der schlechteren Prädiktion assoziiert werden kann, ist aufgrund der geringen Fallzahl nicht abschließend geklärt.. Andererseits könnte eine immunologische Antwort auf eine Barrierestörung im Darm durch den Stoffwechsel beeinflusst werden und somit z.B. weniger TNF abhängig sein. So konnte bereits gezeigt werden, dass z.B. Leptin Einfluss auf die Immunzellfunktion nehmen kann, wobei es in dem beschriebenen Fall zu einer TNF abhängigen Entzündung geführt hat (171). CU-Patienten produzierten im Median nach LPS-Stimulation signifikant mehr IL-12, wobei die Streuung sehr groß war. In der Literatur zeigten MC-Patienten eher erhöhte IL-12-Produktion, obwohl diese Ergebnisse aus Zellen der Lamina propria stammen (172). Für IL-12 (und IL-23) steht der monoklonale Antikörper Ustekinumab mittlerweile auch für CU-Patienten in der Therapie zur Verfügung (170). Die hohe IL-12-Produktion bei CU-Patienten korrelierte allerdings nicht mit niedriger TNF-Produktion oder Nicht-Ansprechen auf Infliximab in dieser

Studienpopulation, weswegen hier kein Zusammenhang hergestellt werden konnte. Es wurden auch MC-Patienten mit einem Befall des Colons eingeschlossen. Diese Patienten ähnelten sich in Ihrer TNF-Produktion nicht den CU-Patienten (Abb. 4d). Man könnte vermuten, dass evtl. der transmurale Charakter der Entzündung beim MC ursächlich für die unterschiedlich starke Prädiktion durch TNF-Produktion auf LPS-Stimulation ist. Evtl. spielen hier extrazelluläre LPS-Vesikel eine Rolle, zu denen erst kürzlich eine Arbeit erschien. Ein Zusammenhang zwischen Barrierestörung und den Vesikeln konnte dargestellt werden (173). Es wäre interessant zu sehen, ob es Unterschiede zwischen CU- und MC-Patienten gibt, die eine unterschiedliche TNF Produktion auf LPS Stimulation erklären könnten.

Low-TNF-producer, die nicht ansprechen, könnten pharmakodynamische Nicht-Ansprecher gewesen sein. Dies bedeutet, dass sie die gleichen Talspiegel wie Ansprecher aufweisen und dabei keine Antikörper gegen IFX entwickelt haben, die auf ein sekundäres Versagen hindeuten würden (174). Eine Ursache für pharmakodynamisches Nicht-Ansprechen könnten in der Literatur beschriebene angeborene anti-TNF-Antikörper sein (175). Eine relativ neue Studie zeigt außerdem, dass Nicht-Ansprecher mit einem Mangel des Proteins *myeloid differentiation primary response 88* assoziiert sind (176). Dieser Mangel führt u.a. zu einer gestörten Funktion der TLR-2/4 und der IL-6 Signalkaskade. Es könnte sein, dass *low-TNF-producer* diesen Mangel vorweisen und dadurch weniger gut LPS über die Toll-like Rezeptoren erkennen und somit geringer TNF produzieren. Dazu passend wäre die niedrigere IL-6 Produktion der *low-TNF-producer*. *Triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM1) wurde in der gleichen Studie als Prädiktor identifiziert. Der Rezeptor ist proinflammatorisch und an der TNF-Expression beteiligt (177, 178). Der in Nicht-Ansprechern herunterregulierte Rezeptor wird u.a. von Monozyten und Makrophagen exprimiert und könnte mit niedriger TNF-Produktion assoziiert sein. Der Rezeptor war in Biospien von Nicht-Ansprechern hochreguliert und ging einher mit einer erhöhten Anzahl proinflammatorischer Makrophagen und Plasmazellen. Die Autoren diskutieren, dass Nicht-Ansprecher evtl. höhere Dosierungen benötigten, da sie eine überdurchschnittlich starke Inflammation aufweisen. Dies würde pharmakodynamisches und pharmakokinetisches Nicht-Ansprechen verknüpfen und schwer vereinbar mit den Ergebnisse zu niedriger TNF-Produktion im Blut und niedrigem TNF-Signal in der endoskopischen Mikroskopie bei Nicht-Ansprechern sein. Ein zukünftige Überprüfung, ob ein Zusammenhang besteht und

evtl. sogar die Prädiktion verbessert, wäre erstrebenswert. Die Daten weisen daraufhin, dass bei Nicht-Ansprechern andere inflammatorische Signalkaskaden relevant sind. So deckte auch eine andere Analyse auf, dass hohe Oncostatin M (OSM) Expression mit Nicht-Ansprechen assoziiert war (179). Es scheinen nicht ansprechende Patienten IL-23p19, IL-23R und IL-17A hochzuregulieren und Apoptose resistente TNFR2⁺IL-23R⁺ T-Zellen zu entwickeln. Für sie könnte eine Therapie mit Ustekinumab eine Option darstellen (180). Es steht aus zu untersuchen, ob die IL-23-Daten, TREM1, OSM und TNF-Produktion im Zusammenhang stehen oder sie doch unterschiedliche Ursachen für Nicht-Ansprechen darstellen.

Es verbleiben sieben Patienten (drei MC, vier CU), die niedrig TNF produzierten, aber trotzdem auf eine IFX-Therapie ansprachen. Zwei dieser Patienten hatten zu Woche 6 immer noch ein CRP >10 mg/l. Es ist möglich, dass das CRP noch etwas nachhing, andererseits kann ein gewisser Placebo-Effekt nicht komplett ausgeschlossen werden in dieser Situation. Eine endoskopische Untersuchung wäre hier hilfreich gewesen, um Ansprechen objektiver zu evaluieren.

Neben dem Ziel Patienten möglichst zeitnah eine wirksame Therapie zu ermöglichen, um lange Phasen mit hohem Leidensdruck zu vermeiden, ergibt sich auch aus der wachsenden Zahl neuer Biologika und den sog. *small molecules* die Notwendigkeit einer individualisierten Therapie (181). Die Pathogenese von CED, insbesondere individuelle Unterscheide in der Immunantwort, müssen besser verstanden werden, um geeignete Biomarker entwickeln zu können. Patienten, die ein primäres Therapieversagen bei anti-TNF-Therapie zeigen, sprechen weniger auf andere Biologika-Therapien an (182). Hierbei könnte das Fortschreiten der Erkrankung mit Entstehung von strukturellen Schäden während unzureichender Therapien von Bedeutung sein. Prädiktoren könnten die Zeit, in der CED-Patienten unzureichend behandelt werden, verkürzen. Zusätzlich würden die Kosten der teuren Biologikatherapien sinken, wenn Patienten weniger vergebliche Therapieversuche starten. Eine 2017 erschienene Arbeit evaluierte Antikörpertherapien noch als nicht kosteneffektiv bei CED (183). Eine neuere Arbeit aus 2019 hingegen zeigte, dass Biologika zuehrend mehr in der Therapie verwendet werden, wobei die Gesamttherapiekosten sinken (97). Dieser Effekt würde durch personalisierte Therapie mit weniger Fehlversuchen noch verstärkt werden.

In dieser Arbeit konnte ein starker Zusammenhang zwischen hoher TNF-Produktion und Therapieansprechen, insbesondere bei MC-Patienten, hergestellt werden. Zukünftige Studien sollte überprüfen, ob der Prädiktor in die klinische Tätigkeit integriert werden könnte und zuverlässig Ansprechen vorhersagt. Neben einer Reduktion der Therapiekosten würden für Patienten Zeiträume mit unzureichender symptomatischer Kontrolle und hohem Leidensdruck verkürzt werden.

Literaturverzeichnis

1. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-e30.
2. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1518-32.
3. Gece KB, Vermeire S. Differential diagnosis of inflammatory bowel disease: imitations and complications. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3(9):644-53.
4. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* (London, England). 2012;380(9853):1590-605.
5. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Lancet* (London, England). 2017;389(10080):1756-70.
6. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Dis Mon*. 2018;64(2):20-57.
7. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(8):1982-92.
8. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology*. 2002;123(3):714-8.
9. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V, Prinz Vavricka BM, Zeitz J, Rogler G, Schoepfer AM. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *The American journal of gastroenterology*. 2011;106(1):110-9.
10. Williams IR. Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. *Immunol Res*. 2004;29(1-3):283-92.
11. Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, Ebert EC, Kassam N, Qin S, Zovko M, LaRosa GJ, Yang LL, Soler D, Butcher EC, Ponath PD, Parker CM, Andrew DP. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med*. 1999;190(9):1241-56.
12. Kmiec Z, Cyman M, Slebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci*. 2017;62(1):1-16.
13. Chan JK, Ng CS, Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology*. 1988;12(5):461-80.
14. Hegazy AN, West NR, Stubbington MJT, Wendt E, Suijker KIM, Datsi A, This S, Danne C, Champion S, Duncan SH, Owens BMJ, Uhlig HH, McMichael A, Bergthaler A, Teichmann SA, Keshav S, Powrie F. Circulating and Tissue-Resident CD4(+) T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology*. 2017;153(5):1320-37.e16.
15. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1993;34(12):1705-9.
16. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*. 1997;150(3):823-32.

17. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1996;157(3):1261-70.
18. Schett G, Elewaut D, McInnes IB, Dayer JM, Neurath MF. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med*. 2013;19(7):822-4.
19. Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, Powrie F. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity*. 2010;33(2):279-88.
20. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jurgens M, Schmechel S, Konrad A, Goke B, Ochsenkuhn T, Muller-Myhsok B, Lohse P, Brand S. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(4):437-45.
21. Ueno A, Jijon H, Chan R, Ford K, Hirota C, Kaplan GG, Beck PL, Iacucci M, Fort Gasia M, Barkema HW, Panaccione R, Ghosh S. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(12):2522-34.
22. 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, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129(2):550-64.
23. Sanderson IR, Boulton P, Menzies I, Walker-Smith JA. Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut*. 1987;28(9):1073-6.
24. Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1320-8.
25. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. 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*. 2007;56(1):61-72.
26. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci*. 1999;112 (Pt 1):137-46.
27. Johansson ME, Gustafsson JK, Holmen-Larsson J, Jabbar KS, Xia L, Xu H, Ghishan FK, Carvalho FA, Gewirtz AT, Sjoval H, Hansson GC. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(2):281-91.
28. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *Faseb j*. 2000;14(12):1749-53.
29. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, Ripke S, Lee JC, Jostins L, Shah T, Abedian S, Cheon JH, Cho J, Dayani NE, Franke L, Fuyuno Y, Hart A, Juyal RC, Juyal G, Kim WH, Morris AP, Poustchi H, Newman WG, Midha V, Orchard TR, Vahedi H, Sood A, Sung JY, Malekzadeh R, Westra HJ, Yamazaki K, Yang

- SK, Barrett JC, Alizadeh BZ, Parkes M, Bk T, Daly MJ, Kubo M, Anderson CA, Weersma RK. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 2015;47(9):979-86.
30. 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, Geary 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, Steinhardt 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, Parkes M. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42(12):1118-25.
31. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411(6837):599-603.
32. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411(6837):603-6.
33. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet (London, England).* 2001;357(9272):1925-8.
34. Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;122(7):2091-2.
35. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet (London, England).* 2018;390(10114):2769-78.
36. Sutherland LR, Ramcharan S, Bryant H, Fick G. Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1990;98(5 Pt 1):1123-8.
37. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, Cattan S, Gendre JP, Cosnes J. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology.* 2001;96(7):2113-6.
38. Gomollón F, Dignass A, Annesse V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P, Ecco. 3rd European Evidence-based Consensus on the

Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's & colitis*. 2017;11(1):3-25.

39. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1996;110(2):424-31.

40. Madanchi M, Fagagnini S, Fournier N, Biedermann L, Zeitz J, Battegay E, Zimmerli L, Vavricka SR, Rogler G, Scharl M. The Relevance of Vitamin and Iron Deficiency in Patients with Inflammatory Bowel Diseases in Patients of the Swiss IBD Cohort. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(8):1768-79.

41. Casanova MJ, Chaparro M, Molina B, Merino O, Batanero R, Duenas-Sadornil C, Robledo P, Garcia-Albert AM, Gomez-Sanchez MB, Calvet X, Trallero MDR, Montoro M, Vazquez I, Charro M, Barragan A, Martinez-Cerezo F, Megias-Rangil I, Huguet JM, Marti-Bonmati E, Calvo M, Campdera M, Munoz-Vicente M, Merchante A, Avila AD, Serrano-Aguayo P, De Francisco R, Hervias D, Bujanda L, Rodriguez GE, Castro-Laria L, Barreiro-de Acosta M, Van Domselaar M, Ramirez de la Piscina P, Santos-Fernandez J, Algaba A, Torra S, Pozzati L, Lopez-Serrano P, Arribas MDR, Rincon ML, Pelaez AC, Castro E, Garcia-Herola A, Santander C, Hernandez-Alonso M, Martin-Noguerol E, Gomez-Lozano M, Monedero T, Villoria A, Figuerola A, Castano-Garcia A, Banales JM, Diaz-Hernandez L, Arguelles-Arias F, Lopez-Diaz J, Perez-Martinez I, Garcia-Talavera N, Nuevo-Siguairo OK, Riestra S, Gisbert JP. Prevalence of Malnutrition and Nutritional Characteristics of Patients With Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2017;11(12):1430-9.

42. Neuendorf R, Harding A, Stello N, Hanes D, Wahbeh H. Depression and anxiety in patients with Inflammatory Bowel Disease: A systematic review. *J Psychosom Res*. 2016;87:70-80.

43. Rungoe C, Langholz E, Andersson M, Basit S, Nielsen NM, Wohlfahrt J, Jess T. Changes in medical treatment and surgery rates in inflammatory bowel disease: a nationwide cohort study 1979-2011. *Gut*. 2014;63(10):1607-16.

44. Hata K, Ishihara S, Nozawa H, Kawai K, Kiyomatsu T, Tanaka T, Kishikawa J, Anzai H, Watanabe T. Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis in ulcerative colitis: Diagnosis, management, risk factors, and incidence. *Dig Endosc*. 2017;29(1):26-34.

45. Parragi L, Fournier N, Zeitz J, Scharl M, Greuter T, Schreiner P, Misselwitz B, Safroneeva E, Schoepfer AM, Vavricka SR, Rogler G, Biedermann L. Colectomy Rates in Ulcerative Colitis are Low and Decreasing: 10-year Follow-up Data From the Swiss IBD Cohort Study. *J Crohns Colitis*. 2018;12(7):811-8.

46. Andujar X, Loras C, Gonzalez B, Socarras M, Sanchiz V, Bosca M, Domenech E, Calafat M, Rodriguez E, Sicilia B, Calvet X, Barrio J, Guardiola J, Iglesias E, Casanova MJ, Ber Y, Monfort D, Lopez-Sanroman A, Rodriguez-Lago I, Bujanda L, Marquez L, Martin-Arranz MD, Zabana Y, Fernandez-Banares F, Esteve M. Efficacy and safety of endoscopic balloon dilation in inflammatory bowel disease: results of the large multicenter study of the ENEIDA registry. *Surg Endosc*. 2020;34(3):1112-22.

47. Yamamoto T, Fazio VW, Tekkis PP. Safety and efficacy of strictureplasty for Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(11):1968-86.

48. Basseri RJ, Basseri B, Vassilaki ME, Melmed GY, Ippoliti A, Vasiliauskas EA, Fleshner PR, Lechago J, Hu B, Berel D, Targan SR, Papadakis KA. Colorectal cancer screening and surveillance in Crohn's colitis. *J Crohns Colitis*. 2012;6(8):824-9.

49. Garcia-Olmo D, Van Assche G, Tagarro I, Diez MC, Richard MP, Khalid JM, van Dijk M, Bennett D, Hokkanen SRK, Panes J. Prevalence of Anal Fistulas in Europe:

Systematic Literature Reviews and Population-Based Database Analysis. *Adv Ther.* 2019;36(12):3503-18.

50. Zbar A. Long-term outcome following loose-seton technique for external sphincter preservation in complex anal fistula (*Br J Surg* 2004; 91: 476-480). *Br J Surg.* 2004;91(8):1073.

51. Nottingham JM, Rentea RM. *Anal Fistulotomy (Seton Placement)*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

StatPearls Publishing LLC.; 2020.

52. Kasperek MS, Glatzle J, Temeltcheva T, Mueller MH, Koenigsrainer A, Kreis ME. Long-term quality of life in patients with Crohn's disease and perianal fistulas: influence of fecal diversion. *Dis Colon Rectum.* 2007;50(12):2067-74.

53. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *The New England journal of medicine.* 1999;340(18):1398-405.

54. Wasmann K, de Groof EJ, Stellingwerf ME, D'Haens GR, Ponsioen CY, Gecse KB, Dijkgraaf MGW, Gerhards MF, Jansen JM, Pronk A, van Tuyl SAC, Zimmerman DDE, Bruin KF, Spinelli A, Danese S, van der Bilt JDW, Mundt MW, Bemelman WA, Buskens CJ. Treatment of perianal fistulas in Crohn's disease, seton versus anti-TNF versus surgical closure following anti-TNF (PISA): a randomised controlled trial. *J Crohns Colitis.* 2020.

55. Kucharzik T, Dignass AU, Atreya R, Bokemeyer B, Esters P, Herrlinger K, Kannengiesser K, Kienle P, Langhorst J, Luger A, Schreiber S, Stallmach A, Stein J, Sturm A, Teich N, Siegmund B. [August 2019 - AWMF-Registriernummer: 021-009]. *Z Gastroenterol.* 2019;57(11):e1.

56. An V, Cohen L, Lawrence M, Thomas M, Andrews J, Moore J. Early surgery in Crohn's disease a benefit in selected cases. *World J Gastrointest Surg.* 2016;8(7):492-500.

57. Brunner M, Vogelsang H, Greinwald R, Kletter K, Kvaternik H, Schrolnberger C, Eichler HG, Brunner H, Dudczak R, Muller M. Colonic spread and serum pharmacokinetics of budesonide foam in patients with mildly to moderately active ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2005;22(5):463-70.

58. Edsbacker S, Bengtsson B, Larsson P, Lundin P, Nilsson A, Ulmius J, Wollmer P. A pharmacoscintigraphic evaluation of oral budesonide given as controlled-release (Entocort) capsules. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2003;17(4):525-36.

59. Nicolaidis NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.* 2010;75(1):1-12.

60. Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol.* 2003;178(3):339-46.

61. Oray M, Abu Samra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert opinion on drug safety.* 2016;15(4):457-65.

62. Ford AC, Achkar JP, Khan KJ, Kane SV, Talley NJ, Marshall JK, Moayyedi P. Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. *The American journal of gastroenterology.* 2011;106(4):601-16.

63. Egan LJ, Mays DC, Huntoon CJ, Bell MP, Pike MG, Sandborn WJ, Lipsky JJ, McKean DJ. Inhibition of interleukin-1-stimulated NF-kappaB RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. *J Biol Chem.* 1999;274(37):26448-53.

64. Schoepfer AM, Bortolotti M, Pittet V, Mottet C, Gonvers JJ, Reich O, Fournier N, Vader JP, Burnand B, Michetti P, Froehlich F. The gap between scientific evidence and

- clinical practice: 5-aminosalicylates are frequently used for the treatment of Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;40(8):930-7.
65. Timmer A, Patton PH, Chande N, McDonald JW, MacDonald JK. Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016(5):Cd000478.
 66. Chande N, Patton PH, Tsoulis DJ, Thomas BS, MacDonald JK. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(10):Cd000067.
 67. Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2004;2(9):731-43.
 68. Kotlyar DS, Lewis JD, Beaugerie L, Tierney A, Brensinger CM, Gisbert JP, Loftus EV, Jr., Peyrin-Biroulet L, Blonski WC, Van Domselaar M, Chaparro M, Sandilya S, Bewtra M, Beigel F, Biancone L, Lichtenstein GR. Risk of lymphoma in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine and 6-mercaptopurine: a meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(5):847-58.e4; quiz e48-50.
 69. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86(3):301-7.
 70. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, Greenberg GR, Gillies R, Hopkins M, et al. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *The New England journal of medicine*. 1995;332(5):292-7.
 71. Herfarth HH. Methotrexate for Inflammatory Bowel Diseases - New Developments. *Dig Dis*. 2016;34(1-2):140-6.
 72. Hoffmann P, Wehling C, Krisam J, Pfeiffenberger J, Belling N, Gauss A. Performance of tacrolimus in hospitalized patients with steroid-refractory acute severe ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2019;25(13):1603-17.
 73. Laharie D, Bourreille A, Branche J, Allez M, Bouhnik Y, Filippi J, Zerbib F, Savoye G, Vuitton L, Moreau J, Amiot A, Cosnes J, Ricart E, Dewit O, Lopez-Sanroman A, Fumery M, Carbonnel F, Bommelaer G, Coffin B, Roblin X, van Assche G, Esteve M, Farkkila M, Gisbert JP, Marteau P, Nahon S, de Vos M, Lambert J, Mary JY, Louis E. Long-term outcome of patients with steroid-refractory acute severe UC treated with ciclosporin or infliximab. *Gut*. 2018;67(2):237-43.
 74. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*. 1992;13(4):136-42.
 75. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;8(5):215.
 76. von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *The New England journal of medicine*. 2003;348(1):68-72.
 77. Fedyk ER, Wyant T, Yang LL, Csizmadia V, Burke K, Yang H, Kadambi VJ. Exclusive antagonism of the alpha4 beta7 integrin by vedolizumab confirms the gut-selectivity of this pathway in primates. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(11):2107-19.
 78. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, Vyhnaek P, Zadorova Z, Palmer T, Donoghue S. Natalizumab for active Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 2003;348(1):24-32.
 79. Lobaton T, Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;39(6):579-94.

80. Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2005;353(4):369-74.
81. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, Fedorak RN, Pare P, McDonald JW, Dube R, Cohen A, Steinhart AH, Landau S, Aguzzi RA, Fox IH, Vandervoort MK. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *The New England journal of medicine*. 2005;352(24):2499-507.
82. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel JF, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh A. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 2013;369(8):711-21.
83. Feagan BG, Sandborn WJ, Gasink C, Jacobstein D, Lang Y, Friedman JR, Blank MA, Johanns J, Gao LL, Miao Y, Adedokun OJ, Sands BE, Hanauer SB, Vermeire S, Targan S, Ghosh S, de Villiers WJ, Colombel JF, Tulassay Z, Seidler U, Salzberg BA, Desreumaux P, Lee SD, Loftus EV, Jr., Dieleman LA, Katz S, Rutgeerts P. Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *The New England journal of medicine*. 2016;375(20):1946-60.
84. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012;13(8):722-8.
85. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Lizza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. 1997;112(4):1169-78.
86. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
87. Olivera P, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Next generation of small molecules in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2017;66(2):199-209.
88. Sandborn WJ, Su C, Sands BE, D'Haens GR, Vermeire S, Schreiber S, Danese S, Feagan BG, Reinisch W, Niezychowski W, Friedman G, Lawendy N, Yu D, Woodworth D, Mukherjee A, Zhang H, Healey P, Panes J. Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *The New England journal of medicine*. 2017;376(18):1723-36.
89. Panes J, Sandborn WJ, Schreiber S, Sands BE, Vermeire S, D'Haens G, Panaccione R, Higgins PDR, Colombel JF, Feagan BG, Chan G, Moscariello M, Wang W, Niezychowski W, Marren A, Healey P, Maller E. Tofacitinib for induction and maintenance therapy of Crohn's disease: results of two phase IIb randomised placebo-controlled trials. *Gut*. 2017;66(6):1049-59.
90. Lefevre PLC, Vande Casteele N. Clinical Pharmacology of Janus Kinase Inhibitors in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2020.
91. Coskun M, Salem M, Pedersen J, Nielsen OH. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res*. 2013;76:1-8.
92. O'Shea J J. Targeting the Jak/STAT pathway for immunosuppression. *Ann Rheum Dis*. 2004;63 Suppl 2:ii67-ii71.
93. Winthrop KL, Melmed GY, Vermeire S, Long MD, Chan G, Pedersen RD, Lawendy N, Thorpe AJ, Nduaka CI, Su C. Herpes Zoster Infection in Patients With Ulcerative Colitis Receiving Tofacitinib. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(10):2258-65.

94. Verden A, Dimbil M, Kyle R, Overstreet B, Hoffman KB. Analysis of Spontaneous Postmarket Case Reports Submitted to the FDA Regarding Thromboembolic Adverse Events and JAK Inhibitors. *Drug Saf.* 2018;41(4):357-61.
95. Derkx B, Taminiau J, Radema S, Stronkhorst A, Wortel C, Tytgat G, van Deventer S. Tumour-necrosis-factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet* (London, England). 1993;342(8864):173-4.
96. Papamichael K, Lin S, Moore M, Papaioannou G, Sattler L, Cheifetz AS. Infliximab in inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in chronic disease.* 2019;10:2040622319838443.
97. Burisch J, Vardi H, Schwartz D, Krznarić Z, L Lakatos P, Fumery M, Kupcinskis L, Magro F, Belousova E, Oksanen P, Arebi N, Langholz E, Turcan S, D'Inca R, Hernández V, Valpiani D, Vegh Z, Giannotta M, Katsanos K, Odes S. OP15 Cost analysis in a prospective European population-based inception cohort: is there a cost-saving effect of biological therapy? 2019. S009-S10 p.
98. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology.* 2006;130(2):323-33; quiz 591.
99. Sandborn WJ, Feagan BG, Marano C, Zhang H, Strauss R, Johanns J, Adedokun OJ, Guzzo C, Colombel JF, Reinisch W, Gibson PR, Collins J, Jarnerot G, Hibi T, Rutgeerts P. Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2014;146(1):85-95; quiz e14-5.
100. Schreiber S, Rutgeerts P, Fedorak RN, Khaliq-Kareemi M, Kamm MA, Boivin M, Bernstein CN, Staun M, Thomsen OO, Innes A. A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2005;129(3):807-18.
101. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens G, Diamond RH, Broussard DL, Tang KL, van der Woude CJ, Rutgeerts P. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine.* 2010;362(15):1383-95.
102. Issuree PD, Maretzky T, McIlwain DR, Monette S, Qing X, Lang PA, Swendeman SL, Park-Min KH, Binder N, Kalliolias GD, Yarilina A, Horiuchi K, Ivashkiv LB, Mak TW, Salmon JE, Blobel CP. iRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation.* 2013;123(2):928-32.
103. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.
104. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):49-62.
105. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, Tremaine WJ, Johnson T, Diehl NN, Zinsmeister AR. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 2001;121(5):1088-94.
106. Toussirot E, Houvenagel E, Goeb V, Fouache D, Martin A, Le Dantec P, Dernis E, Wendling D, Ansemant T, Berthelot JM, Bader-Meunier B, Kantelip B. Development of inflammatory bowel disease during anti-TNF-alpha therapy for inflammatory rheumatic disease: a nationwide series. *Joint Bone Spine.* 2012;79(5):457-63.
107. Levin AD, Wildenberg ME, van den Brink GR. Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis.* 2016;10(8):989-97.

108. Van den Brande JM, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1774-85.
109. Lamanna WC, Mayer RE, Rupprechter A, Fuchs M, Higel F, Fritsch C, Vogelsang C, Seidl A, Toll H, Schiestl M, Holzmann J. The structure-function relationship of disulfide bonds in etanercept. *Sci Rep*. 2017;7(1):3951.
110. ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(2):206-11.
111. Vos AC, Wildenberg ME, Arijis I, Duijvestein M, Verhaar AP, de Hertogh G, Vermeire S, Rutgeerts P, van den Brink GR, Hommes DW. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(3):401-8.
112. Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kuhl AA, Erben U, May C, Schulzke JD, Siegmund B. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(6):1297-305.
113. Zeissig S, Bojarski C, Buergel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut*. 2004;53(9):1295-302.
114. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9317):1541-9.
115. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *The New England journal of medicine*. 2005;353(23):2462-76.
116. D'Haens GR, Panaccione R, Higgins PD, Vermeire S, Gassull M, Chowers Y, Hanauer SB, Herfarth H, Hommes DW, Kamm M, Lofberg R, Quary A, Sands B, Sood A, Watermeyer G, Lashner B, Lemann M, Plevy S, Reinisch W, Schreiber S, Siegel C, Targan S, Watanabe M, Feagan B, Sandborn WJ, Colombel JF, Travis S. The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD with the European Crohn's and Colitis Organization: when to start, when to stop, which drug to choose, and how to predict response? *The American journal of gastroenterology*. 2011;106(2):199-212; quiz 3.
117. Dobler CC. Biologic Agents and Tuberculosis. *Microbiol Spectr*. 2016;4(6).
118. Verstockt B, Ferrante M, Vermeire S, Van Assche G. New treatment options for inflammatory bowel diseases. *Journal of gastroenterology*. 2018;53(5):585-90.
119. Harper JW, Sinanan MN, Zisman TL. Increased body mass index is associated with earlier time to loss of response to infliximab in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(10):2118-24.
120. Juillerat P, Sokol H, Froehlich F, Yajnik V, Beaugerie L, Lucci M, Burnand B, Macpherson AJ, Cosnes J, Korzenik JR. Factors associated with durable response to infliximab in Crohn's disease 5 years and beyond: a multicenter international cohort. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(1):60-70.
121. Vermeire S, Louis E, Carbonez A, Van Assche G, Noman M, Belaiche J, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Reynaert H, D'Haens G, Rutgeerts P. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of

anti-tumor necrosis factor (infliximab) treatment in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 2002;97(9):2357-63.

122. Moran GW, Dubeau MF, Kaplan GG, Yang H, Seow CH, Fedorak RN, Dieleman LA, Barkema HW, Ghosh S, Panaccione R. Phenotypic features of Crohn's disease associated with failure of medical treatment. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2014;12(3):434-42.e1.

123. Louis E, Vermeire S, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Reynaert H, D'Haens G, Malaise M, Belaiche J. A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2002;37(7):818-24.

124. Jurgens M, Mahachie John JM, Cleynen I, Schnitzler F, Fidler H, van Moerkercke W, Ballet V, Noman M, Hoffman I, van Assche G, Rutgeerts PJ, van Steen K, Vermeire S. Levels of C-reactive protein are associated with response to infliximab therapy in patients with Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2011;9(5):421-7.e1.

125. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Olson A, Strauss R, Davis HM. Serum albumin concentration: a predictive factor of infliximab pharmacokinetics and clinical response in patients with ulcerative colitis. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2010;48(5):297-308.

126. Lee KM, Jeon YT, Cho JY, Lee CK, Koo JS, Park DI, Im JP, Park SJ, Kim YS, Kim TO, Lee SH, Jang BI, Kim JW, Park YS, Kim ES, Choi CH, Kim HJ. Efficacy, safety, and predictors of response to infliximab therapy for ulcerative colitis: a Korean multicenter retrospective study. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28(12):1829-33.

127. Oussalah A, Evesque L, Laharie D, Roblin X, Boschetti G, Nancey S, Filippi J, Flourie B, Hebuterne X, Bigard MA, Peyrin-Biroulet L. A multicenter experience with infliximab for ulcerative colitis: outcomes and predictors of response, optimization, colectomy, and hospitalization. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(12):2617-25.

128. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Lu J, Horgan K, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Present D, Sands BE, Colombel JF. Colectomy rate comparison after treatment of ulcerative colitis with placebo or infliximab. *Gastroenterology*. 2009;137(4):1250-60; quiz 520.

129. Fefferman DS, Lodhavia PJ, Alsahli M, Falchuk KR, Peppercorn MA, Shah SA, Farrell RJ. Smoking and immunomodulators do not influence the response or duration of response to infliximab in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(4):346-51.

130. Parsi MA, Achkar JP, Richardson S, Katz J, Hammel JP, Lashner BA, Brzezinski A. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123(3):707-13.

131. Colombel JF, Narula N, Peyrin-Biroulet L. Management Strategies to Improve Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017;152(2):351-61.e5.

132. Lopetuso LR, Gerardi V, Papa V, Scaldaferrri F, Rapaccini GL, Gasbarrini A, Papa A. Can We Predict the Efficacy of Anti-TNF-alpha Agents? *International journal of molecular sciences*. 2017;18(9).

133. Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, Vande Casteele N. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with

- TNF antagonists in IBD: evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(1):182-97.
134. Ding NS, Hart A, De Cruz P. Systematic review: predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease - algorithm for practical management. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2016;43(1):30-51.
135. Atreya R, Neumann H, Neufert C, Waldner MJ, Billmeier U, Zopf Y, Willma M, App C, Munster T, Kessler H, Maas S, Gebhardt B, Heimke-Brinck R, Reuter E, Dorje F, Rau TT, Uter W, Wang TD, Kiesslich R, Vieth M, Hannappel E, Neurath MF. In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nat Med.* 2014;20(3):313-8.
136. Martinez-Borra J, Lopez-Larrea C, Gonzalez S, Fuentes D, Dieguez A, Deschamps EM, Perez-Pariente JM, Lopez-Vazquez A, de Francisco R, Rodrigo L. High serum tumor necrosis factor-alpha levels are associated with lack of response to infliximab in fistulizing Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology.* 2002;97(9):2350-6.
137. Amini Kadijani A, Asadzadeh Aghdai H, Sorrentino D, Mirzaei A, Shahrokh S, Balaii H, Nguyen VQ, Mays JL, Reza Zali M. Transmembrane TNF-alpha Density, but not Soluble TNF-alpha Level, is Associated with Primary Response to Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical and translational gastroenterology.* 2017;8(9):e117.
138. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(1):66-75.
139. Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstensen TS, Fausa O, Scott H. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut.* 1994;35(5):669-74.
140. Grimm MC, Pullman WE, Bennett GM, Sullivan PJ, Pavli P, Doe WF. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 1995;10(4):387-95.
141. Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability *in vitro* and *in vivo* by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology.* 2013;182(2):375-87.
142. Vaure C, Liu Y. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Frontiers in Immunology.* 2014;5(316).
143. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):535-42.
144. Spekhorst LM, Visschedijk MC, Alberts R, Festen EA, van der Wouden EJ, Dijkstra G, Weersma RK. Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(41):15374-81.
145. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, Sostegni R, Rocca R, Pera A, Gevers A, Mary JY, Colombel JF, Rutgeerts P. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc.* 2004;60(4):505-12.
146. Travis SP, Schnell D, Krzeski P, Abreu MT, Altman DG, Colombel JF, Feagan BG, Hanauer SB, Lemann M, Lichtenstein GR, Marteau PR, Reinisch W, Sands BE, Yacyszyn BR, Bernhardt CA, Mary JY, Sandborn WJ. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut.* 2012;61(4):535-42.

147. Limberg B. [Diagnosis of chronic inflammatory bowel disease by ultrasonography]. *Z Gastroenterol.* 1999;37(6):495-508.
148. Lewis JD, Chuai S, Nessel L, Lichtenstein GR, Aberra FN, Ellenberg JH. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(12):1660-6.
149. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet* (London, England). 1980;1(8167):514.
150. Brosseron F, Marcus K, May C. Isolating peripheral lymphocytes by density gradient centrifugation and magnetic cell sorting. *Methods Mol Biol.* 2015;1295:33-42.
151. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 2015;72:4-15.
152. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical immunology* (Orlando, Fla). 2004;110(3):252-66.
153. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(2):163-76.
154. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, Chalasani G, Taboas JM, Lakkis FG, Metes DM. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176460.
155. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
156. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2002;168(7):3536-42.
157. Kucharzik T, Wittig BM, Helwig U, Borner N, Rossler A, Rath S, Maaser C. Use of Intestinal Ultrasound to Monitor Crohn's Disease Activity. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2017;15(4):535-42.e2.
158. Gonzalez-Lama Y, Fernandez-Blanco I, Lopez-SanRoman A, Taxonera C, Casis B, Tabernero S, Bermejo F, Martinez-Silva F, Mendoza JL, Martinez-Montiel P, Carneros JA, Sanchez F, Mate J, Gisbert JP. Open-label infliximab therapy in ulcerative colitis: a multicenter survey of results and predictors of response. *Hepato-gastroenterology.* 2008;55(86-87):1609-14.
159. Papamichael K, Vande Casteele N, Gils A, Tops S, Hauenstein S, Singh S, Princen F, Van Assche G, Rutgeerts P, Vermeire S, Ferrante M. Long-term outcome of patients with Crohn's disease who discontinued infliximab therapy upon clinical remission. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2015;13(6):1103-10.
160. Lionetti P, Bronzini F, Salvestrini C, Bascietto C, Canani RB, De Angelis GL, Guariso G, Martelossi S, Papadatou B, Barabino A. Response to infliximab is related to disease duration in paediatric Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2003;18(4):425-31.
161. Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N, Takazoe M, Muramatsu M. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1A and 1B affect responses to infliximab in Japanese patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 2008;27(9):765-70.
162. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:253-78.

163. Pouillon L, Ferrante M, Van Assche G, Rutgeerts P, Noman M, Sabino J, Vande Casteele N, Gils A, Vermeire S. Mucosal Healing and Long-term Outcomes of Patients With Inflammatory Bowel Diseases Receiving Clinic-Based vs Trough Concentration-Based Dosing of Infliximab. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2018;16(8):1276-83.e1.
164. Vande Casteele N, Ferrante M, Van Assche G, Ballet V, Compennolle G, Van Steen K, Simoens S, Rutgeerts P, Gils A, Vermeire S. Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2015;148(7):1320-9.e3.
165. Papamichael K, Cheifetz AS, Melmed GY, Irving PM, Vande Casteele N, Kozuch PL, Raffals LE, Baidoo L, Bressler B, Devlin SM, Jones J, Kaplan GG, Sparrow MP, Velayos FS, Ullman T, Siegel CA. Appropriate Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents for Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2019;17(9):1655-68.e3.
166. Kevans D, Murthy S, Mould DR, Silverberg MS. Accelerated Clearance of Infliximab is Associated With Treatment Failure in Patients With Corticosteroid-Refractory Acute Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*. 2018;12(6):662-9.
167. Gibson DJ, Heetun ZS, Redmond CE, Nanda KS, Keegan D, Byrne K, Mulcahy HE, Cullen G, Doherty GA. An accelerated infliximab induction regimen reduces the need for early colectomy in patients with acute severe ulcerative colitis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(2):330-5.e1.
168. Ye BD, Pesegova M, Alexeeva O, Osipenko M, Lahat A, Dorofeyev A, Fishman S, Levchenko O, Cheon JH, Scribano ML, Mateescu RB, Lee KM, Eun CS, Lee SJ, Lee SY, Kim H, Schreiber S, Fowler H, Cheung R, Kim YH. Efficacy and safety of biosimilar CT-P13 compared with originator infliximab in patients with active Crohn's disease: an international, randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority study. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10182):1699-707.
169. Bank S, Julsgaard M, Abed OK, Burisch J, Broder Brodersen J, Pedersen NK, Gouliaev A, Ajan R, Nytoft Rasmussen D, Honore Grauslund C, Roug S, Galsgaard J, Sprogøe Hoyer Finsen D, Lindby K, Sorensen J, Larsen L, Rohr Andersen M, Brandslund I, Thomassen M, Green A, Bo Bojesen A, Bek Sorensen S, Vogel U, Andersen V. Polymorphisms in the NFκB, TNF-alpha, IL-1beta, and IL-18 pathways are associated with response to anti-TNF therapy in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2019;49(7):890-903.
170. Salvador-Martin S, Lopez-Cauce B, Nunez O, Laserna-Mendieta EJ, Garcia MI, Lobato E, Abarca-Zabalía J, Sanjurjo-Saez M, Lucendo AJ, Marin-Jimenez I, Menchen LA, Lopez-Fernandez LA. Genetic predictors of long-term response and trough levels of infliximab in crohn's disease. *Pharmacol Res*. 2019;149:104478.
171. Ziegler JF, Bottcher C, Letizia M, Yerinde C, Wu H, Freise I, Rodriguez-Sillke Y, Stoyanova AK, Kreis ME, Asbach P, Kunkel D, Priller J, Anagnostopoulos I, Kuhl AA, Miehle K, Stumvoll M, Tran F, Fredrich B, Forster M, Franke A, Bojarski C, Glaubien R, Loscher BS, Siegmund B, Weidinger C. Leptin induces TNFalpha-dependent inflammation in acquired generalized lipodystrophy and combined Crohn's disease. *Nat Commun*. 2019;10(1):5629.
172. Fuss IJ, Becker C, Yang Z, Groden C, Hornung RL, Heller F, Neurath MF, Strober W, Mannon PJ. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(1):9-15.

173. Tulkens J, Vergauwen G, Van Deun J, Geurickx E, Dhondt B, Lippens L, De Scheerder MA, Miinalainen I, Rappu P, De Geest BG, Vandecasteele K, Laukens D, Vandekerckhove L, Denys H, Vandesompele J, De Wever O, Hendrix A. Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. *Gut*. 2020;69(1):191-3.
174. Ainsworth MA, Bendtzen K, Brynskov J. Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluid-phase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 2008;103(4):944-8.
175. Ebert EC, Das KM, Mehta V, Rezac C. Non-response to infliximab may be due to innate neutralizing anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. *Clinical and experimental immunology*. 2008;154(3):325-31.
176. Gaujoux R, Starosvetsky E, Maimon N, Vallania F, Bar-Yoseph H, Pressman S, Weisshof R, Goren I, Rabinowitz K, Waterman M, Yanai H, Dotan I, Sabo E, Chowers Y, Khatri P, Shen-Orr SS. Cell-centred meta-analysis reveals baseline predictors of anti-TNFalpha non-response in biopsy and blood of patients with IBD. *Gut*. 2019;68(4):604-14.
177. Tamaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacology & therapeutics*. 2017;177:81-95.
178. Schenk M, Bouchon A, Seibold F, Mueller C. TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(10):3097-106.
179. West NR, Hegazy AN, Owens BMJ, Bullers SJ, Linggi B, Buonocore S, Coccia M, Gortz D, This S, Stockenhuber K, Pott J, Friedrich M, Ryzhakov G, Baribaud F, Brodmerkel C, Cieluch C, Rahman N, Muller-Newen G, Owens RJ, Kuhl AA, Maloy KJ, Plevy SE, Keshav S, Travis SPL, Powrie F. Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Nat Med*. 2017;23(5):579-89.
180. Schmitt H, Billmeier U, Dieterich W, Rath T, Sonnewald S, Reid S, Hirschmann S, Hildner K, Waldner MJ, Mudter J, Hartmann A, Grutzmann R, Neufert C, Munster T, Neurath MF, Atreya R. Expansion of IL-23 receptor bearing TNFR2+ T cells is associated with molecular resistance to anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Gut*. 2019;68(5):814-28.
181. Chudy-Onwugaje KO, Christian KE, Farraye FA, Cross RK. A State-of-the-Art Review of New and Emerging Therapies for the Treatment of IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2019;25(5):820-30.
182. Singh S, George J, Boland BS, Vande Castele N, Sandborn WJ. Primary Non-Response to Tumor Necrosis Factor Antagonists is Associated with Inferior Response to Second-line Biologics in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Crohns Colitis*. 2018;12(6):635-43.
183. Pillai N, Dusheiko M, Burnand B, Pittet V. A systematic review of cost-effectiveness studies comparing conventional, biological and surgical interventions for inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185500.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bosse R. Jessen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Identifizierung prädikativer Parameter für ein Therapieansprechen auf anti-TNF α -Antikörper bei Patient*innen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Bosse R. Jessen hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

- Jessen, B., Rodriguez-Sillke, Y., Sonnenberg, E., Schumann, M., Kruglov, A., Freise, I., Schmidt F, Maul J, Kuhl AA, Glauben R, Lissner D, Siegmund, B. (2020). Level of Tumor Necrosis Factor Production by Stimulated Blood Mononuclear Cells Can be Used to Predict Response of Patients With Inflammatory Bowel Diseases to Infliximab. Clin Gastroenterol Hepatol. doi:10.1016/j.cgh.2020.03.066

Beitrag im Einzelnen:

- Einleitung: Die Einleitung wurde von mir in Zusammenarbeit mit den Co-Autoren verfasst. Die Literaturrecherche erfolgte hauptsächlich durch mich.
- Methodik: Das Studiendesign wurde von Frau Dr. Lissner und Frau Prof. Siegmund entwickelt. Die Rekrutierung und klinische Beurteilung der Patienten erfolgte hauptsächlich durch das klinische Personal (Co-Autoren), während ich die Organisation und Befragung übernahm. Die Experimente wurden mit Ausnahme des IL-22 ELISA (Co-Autor) von mir durchgeführt. Im Einzelfall erhielt ich Unterstützung durch Co-Autoren bei anderen Experimenten.
- Ergebnisse: Alle Ergebnisse, Tabellen und graphische Darstellungen stammen aus meiner statistischen Auswertung. Die statistische Beratung des Instituts für Biometrie wurde mehrfach in Anspruch genommen. Formulierungen wurden teilweise durch Co-Autoren verbessert.
- Diskussion: Die Diskussion wurde von mir in Zusammenarbeit mit den Co-Autoren verfasst. Die Literaturrecherche erfolgte hauptsächlich durch mich.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Curriculum vitae – Bosse Ragnar Jessen

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- Zeitschriftartikel:
 - Jessen, B., Rodriguez-Sillke, Y., Sonnenberg, E., Schumann, M., Kruglov, A., Freise, I., Schmidt F, Maul J, Kuhl AA, Glauben R, Lissner D, Siegmund, B. (2020). Level of Tumor Necrosis Factor Production by Stimulated Blood Mononuclear Cells Can be Used to Predict Response of Patients With Inflammatory Bowel Diseases to Infliximab. Clin Gastroenterol Hepatol. doi:10.1016/j.cgh.2020.03.066

- Kongressvorträge
 - Jessen B, Lissner D, Sonnenberg E, Schmidt F, Kühl A, Siegmund B. Die TNF-Expression von Monozyten ist ein prädiktiver Parameter für ein Therapieansprechen auf Infliximab. Zeitschrift für Gastroenterologie. 2017;55(08):KV 055.

- Kongressposter
 - Lissner D, Jessen B, Sonnenberg E, Schumann M, Schmidt F, Rodriguez Sillke Y, Siegmund B. P501 High TNF-production of CD14+ cells and short disease duration are independent predictive factors for response to Infliximab treatment. Journal of Crohn's and Colitis. 2019;13(Supplement_1):S362-S3.
 - Jessen B, Lissner D, Sonnenberg E, Schumann M, Schmidt F, Kühl A, Siegmund B. P494 Monocytic TNF production predicts response to infliximab treatment in Crohn's disease but not ulcerative colitis. Journal of Crohn's and Colitis. 2018;12(supplement_1):S355-S6.
 - Delbue D, Itzlinger A, Jessen B, Heldt C, Branchi F, Lissner D, Schumann M. Peripheral monocytes impair the barrier function of intestinal epithelial cells: new insights on the pathogenesis of celiac disease. United European Gastroenterology Journal 2018; 6 (Supplement 1)
 - Lissner D, Jessen B, Sonnenberg E, Schmidt F, Siegmund B. TNF-expression of monocytes is a predictive marker for response to Infliximab treatment. United European Gastroenterology Journal 2017; 5 (Supplement 1)

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Siegmund und Frau Dr. Lissner für die Bereitstellung des Themas, die exzellente Betreuung, den intensiven wissenschaftlichen Austausch und die Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Dem Berliner Institut für Gesundheitsforschung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion.

Der AG Siegmund, insbesondere Frau Inka Freise, Frau Yasmina Rodriguez Sillke, Herrn Dr. Rainer Glaben & Frau Dr. Franziska Schmidt möchte ich für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor danken. Großer Dank für die nette Zeit im „Büroflur“ geht außerdem an alle Mitarbeitenden des Forschungsbereiches.

Der AG Kühl, insbesondere Frau PD Dr Anja Kühl und Frau Simone Spieckermann, danke ich für die Einarbeitung und herzliche Betreuung in der Immunhistochemie.

Dem Klinikpersonal, insbesondere Herrn Dr. Michael Schumann und Frau Dr. Elena Sonnenberg, möchte ich für die geduldige und zuverlässige Zusammenarbeit danken.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Jochen Maul & Concetta Casali-Clack vom Bayerischen Platz und Dr. Andrej Kruglov vom DRFZ möchte ich auch für die tolle Zusammenarbeit danken.

Meiner Familie und Freunden danke ich für die Unterstützung und Motivation während der Promotionszeit. Großer Dank geht außerdem an Frau Sarah Volkens und Frau Josephine Löffler für den regen wissenschaftlich Austausch, die vielen Ratschläge und Motivation während meiner Promotionszeit.

Bosse Jessen