

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

**Untersuchung von Polymorphismen mit möglicher funktioneller Relevanz in den Genen  
der organischen Kationentransporter *OCTN1* und *OCTN2* bei chronisch-entzündlichen  
Darmerkrankungen**

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

vorgelegt von  
Klaus Ott

aus  
Kirchheim bei München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Folwaczny

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Schmolke  
Priv. Doz. Dr. med. J. Schirra

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Helga-Paula Török

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

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2009

Teile dieser Dissertation wurden publiziert in:

Ott K., Glas J., Klein W., Lohse P., Ochsenkühn T., Folwaczny M.,

Folwaczny C., Török H.-P.

Mögliche funktionelle Relevanz von Polymorphismen in den Genen von *OCTN1* und *OCTN2* des *IBD5*-Locus bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

Medizinische Klinik 2006; 101: Abstract-Band P0325

Török H.P., Glas J., Ott K., Klein W., Lohse P., Ochsenkühn T., Folwaczny

M., Folwaczny C.

Polymorphisms with possible functional relevance in the genes for *OCTN1* and *OCTN2* in *IBD5* locus in inflammatory bowel disease.

Gastroenterology 2006; 130: A-593

Für meine Familie

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	8
1.1.1	Epidemiologie	8
1.1.2	Colitis-ulcerosa – Klinik und Therapie	9
1.1.3	Morbus Crohn – Klinik und Therapie	12
1.2	Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	13
1.2.1	Die Rolle der Genetik	13
1.2.2	Die Rolle von Antikörpern	14
1.2.3	Ätiologisch relevante Umweltfaktoren	15
1.2.4	Das mukosale Immunsystem	17
1.3	Genetische Zuordnung krankheitsrelevanter Gene chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	19
1.3.1	Relevante Kopplungsregionen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	19
1.3.2	Das <i>NOD2/CARD15</i> -Gen	22
1.3.3	Der <i>IBD5</i> -Locus	23
1.3.3.1	Die Rolle der <i>SLC22A (OCTN1)</i> und <i>SLC22A5 (OCTN2)</i> -Gene	25
1.3.3.2	Genotyp-phänotyp Korrelationen für den <i>IBD5</i> -Locus	28
1.4	Zielsetzung der Arbeit	29
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>30</b>
2.1	Studienpopulation	30
2.1.1	Patientenkollektiv	30
2.1.2	Kontrollkollektiv	31
2.2	Kits und Chemikalien	31
2.2.1	Materialien für die DNA-Isolierung	31
2.2.2	Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte	31
2.2.3	Materialien für den Restriktionsverdau	32
2.2.4	Materialien für die Agarosegelelektrophorese	32
2.2.5	Verwendete Oligonukleotide	33
2.3	Benutzte Geräte	33
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
3.1	Allgemeine Vorgehensweise	35

3.2	Molekularbiologische Methoden	35
3.2.1	Isolierung genomischer DNA	35
3.2.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	36
3.2.3	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
3.2.4	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse	39
3.2.5	Agarosegelelektrophorese	41
3.2.6	Reinigung der PCR-Produkte	42
3.3	Typisierung der Polymorphismen	42
3.3.1	Nachweis von Mutationen in den Genen für <i>OCTN1</i> und <i>OCTN2</i>	42
3.3.2	Nachweismethode für den Polymorphismus <i>SLC22A4</i> C917T ( <i>OCTN1</i> )	43
3.3.3	Nachweismethode für den Polymorphismus <i>SLC22A5</i> C1721T ( <i>OCTN2</i> )	43
3.3.4	Nachweismethode für den Polymorphismus <i>SLC22A4</i> IVS6+5G>A ( <i>OCTN1</i> )	44
3.4	Statistische Auswertung	46
3.4.1	Voraussetzungen	46
3.4.2	Der Chi-Quadrat-Test	46
3.4.3	Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	47
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1	Überblick	48
4.2	Untersuchte Varianten in den <i>OCTN1</i> - und <i>OCTN2</i> -Genen	48
4.2.1	Der Polymorphismus C917T im <i>SLC22A4</i> -Gen ( <i>OCTN1</i> )	48
4.2.2	Der Polymorphismus C1721T im <i>SLC22A5</i> -Gen ( <i>OCTN2</i> )	50
4.2.3	Der Polymorphismus IVS6+5G>A im <i>SLC22A4</i> -Gen ( <i>OCTN1</i> )	51
4.3	Genotyp-Phänotyp-Interaktionen der getesteten Polymorphismen bei Patienten mit M. Crohn	53
4.4	Interaktionen zwischen den hier untersuchten Mutationen in <i>OCTN1/2</i> und anderen, mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Genvarianten	56
4.4.1	Interaktionen mit dem vorbekannten <i>OCTN1</i> C1672T / <i>OCTN2</i> G207C Risikohaplotyp	57
4.4.2	Interaktion mit dem <i>IBD5</i> -Risikohaplotyp	59
4.4.3	Interaktion der untersuchten <i>OCTN</i> -Polymorphismen mit <i>NOD2/CARD15</i> -Mutationen bei M. Crohn Patienten	60

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
5.1	Aufbau der Studie	63
5.1.1	Genetische Assoziationsstudien	63
5.1.2	Genetische Typisierung	65
5.2	Genetische Bewertung der Ergebnisse	66
5.2.1	Vergleich der beobachteten Allelfrequenzen mit den in anderen Studien ermittelten Frequenzen	66
5.2.2	Frequenz der untersuchten Polymorphismen bei M. Crohn und Colitis ulcerosa und mögliche Interaktionen mit dem vorbekannten <i>OCTN1</i> C1672T / <i>OCTN2</i> G207C Risikohaplotyp	67
5.2.3	Mögliche Interaktion der untersuchten Polymorphismen mit dem <i>IBD5</i> -Risikohaplotyp	70
5.2.4	Mögliche Interaktion zwischen den untersuchten Polymorphismen und Mutationen im <i>NOD2/CARD15</i> -Gen bei M. Crohn	72
5.3	Genotyp-Phänotyp-Assoziationen	73
5.4	Funktionelle Bewertung der Ergebnisse	74
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>92</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>93</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Im medizinischen Sprachgebrauch werden der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU) mit dem Begriff Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) bezeichnet. Beide Krankheiten zeichnen sich durch einen chronisch-rezidivierenden Verlauf mit weitgehend unbekannter Ätiologie aus.

### **1.1.1 Epidemiologie**

In den letzten Jahrzehnten wurde eine stetig steigende Häufigkeit der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, besonders des M. Crohn, in den westlichen Industrienationen beobachtet (Bonen 2003). Epidemiologische Studien zeigen, dass sich sowohl die Inzidenz, als auch die Prävalenz der Erkrankungen geographisch und ethnisch stark unterscheiden. Inzwischen scheint sich sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz beider Erkrankungen in den traditionellen Hoch-Risiko Regionen Nordeuropa und Nordamerika zu stabilisieren. In Regionen mit von Haus aus niedrigeren Inzidenzen, wie z.B. Südeuropa, Asien und großen Teilen der Dritten Welt, steigt die Zahl der Erkrankten immer noch stetig an (Loftus 2004).

Epidemiologische Studien ergaben alleine für Nordamerika eine Inzidenz von 2,2 bis 14,3/100.000 für Colitis ulcerosa und 3,1 bis 14,6/100.000 für M. Crohn. Die Prävalenzen bewegten sich zwischen 37 und 246 Fällen pro 100.000 für Colitis ulcerosa und 26 bis 199/100.000 für M. Crohn. Diese Zahlen bedeuten, dass jedes Jahr bis zu 46.000 Patienten jeweils mit Colitis ulcerosa und M. Crohn neu diagnostiziert werden (Loftus 2004).

Im Gegensatz hierzu finden sich für Europa Inzidenzen von 1,5 bis 20,3/100.000 für Colitis ulcerosa und 0,7 bis 9,8/100.000 für M. Crohn. Die Prävalenz für Colitis ulcerosa liegt für Europa zwischen 21,4 bis 243/100.000 – bei M. Crohn bei 8,3 bis 214/100.000. Dies führt jährlich zu etwa 68.000 neu diagnostizierten Fällen einer Colitis ulcerosa, beziehungsweise ca. 41.000 neu diagnostizierten M. Crohn Fällen.

Dabei scheint die jüdische Bevölkerung das höchste Risiko für die Entwicklung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung zu haben (Oostenbrug 2003, Roth 1989, Yang 1993, Yang 2001).

Innerhalb Europas hat Großbritannien mit 387/100.000 die höchste Prävalenz an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Rubin 2000, Montgomery 1998). Dahingegen zeigen zum

Beispiel südlichere Regionen wie Spanien oder Kroatien eine Prävalenz von 62/100.000 bzw. 29,7/100.000 (Vucelic 1991, Mate-Jimenez 1994). Ausser diesem beobachteten Nord-Süd-Gefälle ergeben sich auch unterschiedliche Prävalenzen im Sinne eines West-Ost-Gefälles. Beispielsweise weist Singapur lediglich eine Prävalenz von 9,6/100.000 für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen auf. Allerdings steigen die Inzidenzen in dieser Region, speziell für Colitis ulcerosa, in letzter Zeit an (Lee 2000). Ursächlich wird eine zunehmende „Verwestlichung“ dieser Regionen in Bezug auf Ernährung und Lebenswandel diskutiert (Loftus 2004).

Schließlich scheint der Frauenanteil unter den M. Crohn Patienten leicht erhöht zu sein, während bei der Colitis ulcerosa die Männer anteilmässig dominieren.

Die Erstdiagnose M. Crohn wird im Schnitt in einem Alter von 29,5 Jahren gestellt, während die Diagnose Colitis ulcerosa meist erst ca. 5-10 Jahre später gestellt wird. Ein zweiter Erkrankungsgipfel ist v.a. für Männer mit Colitis ulcerosa zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade zu beobachten (Loftus 2004).

### **1.1.2 Colitis ulcerosa – Klinik und Therapie**

Die Colitis ulcerosa ist eine auf die Kolonschleimhaut begrenzte Entzündung, und tritt zu Beginn bevorzugt im distalen Kolon auf. Von dort breitet sie sich kontinuierlich nach proximal aus. In ca. 80% der Fälle breitet sie sich schliesslich über das ganze Kolon aus. Im Falle einer Pankolitis ist in 10-20% der Fälle auch das terminale Ileum betroffen (sog. Backwash-Ileitis). Histologisch zeigt sich eine oberflächliche chronisch-hämorrhagische Entzündung, die während eines aktiven Schubes auf die Submukosa übergreifen kann. Zytologisch dominieren hier Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen sowie Granulozyten. Kontaktblutungen können im aktiven Stadium der Erkrankung auftreten. Im Verlauf der Entzündung geht sowohl das Faltenrelief der Schleimhaut als auch die Haustrierung des Kolons verloren. Es entwickeln sich Erosionen und Ulzerationen, die dazu führen, dass die Kryptenarchitektur der Schleimhaut mitsamt Becherzellen verloren geht. Anhäufungen von Granulozyten in den Krypten, sog. Kryptenabszesse, charakterisieren das frische Stadium der Erkrankung.

Die Erkrankung kann chronisch-aktiv, oder rezidivierend mit symptomfreien Intervallen verlaufen. Ein akut fulminanter Verlauf ist möglich. Prinzipiell ist die Erkrankung durch eine Kolektomie heilbar (v. Tirpitz 2004, Otto 2001).

Leitsymptom der Colitis ulcerosa sind blutige Durchfälle, wobei insbesondere bei isoliertem Befall des Rektums das Blut an der Oberfläche des Stuhls zu finden ist. Die Beteiligung des

Rektums bewirkt ausserdem einen ausgeprägten Stuhldrang und Tenesmen. Auftretende Bauchschmerzen sind meist im linken Unterbauch lokalisiert. Sie können aber je nach Ausbreitung der Erkrankung auch anderweitig auftreten. Langfristig wird durch die Zerstörung der Schleimhaut ein vielfältiges klinisches Bild hervorgerufen, dass von Malabsorptionssyndromen bis hin zu Verschiebungen im Säure-Basen-Haushalt des Organismus reicht (v.Tirpitz 2004).

Obwohl histologisch gesehen die Erkrankung auf die Kolonschleimhaut begrenzt ist, ist sie durch mehrere extraintestinale Manifestationen gekennzeichnet. Betroffene Patienten zeigen in 4% der Fälle kutane Manifestationen wie Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum. Auch die Leber kann in Form einer primär sklerosierenden Cholangitis in Mitleidenschaft gezogen werden. Diese Erkrankung ist direkt mit Colitis ulcerosa assoziiert und betrifft etwa 7,5% aller Patienten (Barrie 2007). Klinisch leiden rund 25% aller Patienten an Arthropathien v.a. der Knie- und Sprunggelenke, wobei weder radiologisch noch szintigraphisch ein morphologisches Korrelat für die Beschwerden nachgewiesen werden kann (v. Tirpitz 2004). Augenerkrankungen wie Episkleritis oder Iridozyklitis sind insgesamt selten, können aber im Rahmen einer Colitis ulcerosa auftreten. Die Behandlung der als Ursache in Frage kommenden Grunderkrankung Colitis ulcerosa führt jedoch in der Regel zu einer Verbesserung der Symptome (Ghanchi 2003).

Etwas 15% aller Colitis ulcerosa Patienten stellen sich initial mit einer schweren Kolitis ambulant vor. Eine wichtige Komplikation hierbei ist das toxische Megakolon. Hierbei führt die Schwere der Entzündung zu einer Paralyse der glatten Muskulatur. Die durch den entzündlichen Schub erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut führt zur Übertragung von Bakterien und Toxinen in den menschlichen Kreislauf. Das toxische Megakolon stellt eine strenge OP-Indikation dar (Metcalf 2007).

Langfristig ergibt sich für alle Patienten ein erhöhtes Risiko für ein Kolitis-assoziiertes Karzinom basierend auf schweren Epitheldysplasien. Das Risiko ist nach zehn Jahren bestehender Krankheit besonders hoch und bei Patienten mit Pankolitis höher als bei Patienten mit Proktitis (v.Tirpitz 2004). Ausserdem haben männliche Patienten verglichen mit weiblichen Patienten ein erhöhtes Karzinomrisiko. Zusätzlich haben Colitis ulcerosa Patienten ein generell erhöhtes Risiko für Leber- und Gallenwegstumoren, was zum Teil auf eine Assoziation mit der primär sklerosierenden Cholangitis zurückzuführen ist (Bernstein 2001). Interessant ist auch, dass die Backwash-Ileitis die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms begünstigt (Heuschen 2001).

Die Therapie der Colitis ulcerosa richtet sich sowohl nach Entzündungsaktivität als auch nach dem Befallsmuster. Im Allgemeinen werden topisch wirksame Medikamente bevorzugt. Als Erhaltungstherapie im symptomfreien Intervall sowie für milde Verläufe hat sich v.a. 5-Aminosalicylsäure bewährt. Im Falle eines Versagens der 5-Aminosalicylsäuretherapie oder im schweren akuten Schub werden Glukokortikoide eingesetzt. Auch hier sollten speziell für den distalen Befall des Kolons oder des Rektums topisch wirksame Substanzen zum Einsatz kommen. Bei schweren Schüben müssen Steroide systemisch wirksam verabreicht werden (i.v. oder oral).

Bei, trotz Steroidgabe, persistierenden Verläufen kommen immunmodulierende Substanzen zum Einsatz. Azathioprin und sein aktiver Metabolit Mercaptopurin sind aus dieser Stoffgruppe bisher am häufigsten eingesetzt worden. Sie helfen nicht nur die applizierten Kortisonmengen zu reduzieren, sondern verlängern auch die Remissionsphasen. Allerdings brauchen sie bis zu sechs Wochen Zeit bis zum Wirkungsbeginn und sind daher für die akute Behandlung eines Schubs nicht geeignet. Für schwere akute Verläufe kommt Cyclosporin im Rahmen einer stationären Therapie in Frage.

Im Falle eines akuten fulminanten Verlaufes mit Komplikationen wie toxischem Megakolon, Perforation oder Sepsis, ist eine operative Therapie in Erwägung zu ziehen. Die Standardtherapie bei fulminanter Kolitis und toxischem Megakolon ist nach wie vor die subtotale Kolektomie mit Ileostoma. Für rezidivierende schwere Verläufe stellt hingegen eine kontinenserhaltende ileoanale Pouch-Operation einen therapeutischen Ansatz dar. Hierbei wird nach Entfernung der erkrankten Mukosa (sog. Proktomukosektomie) aus Teilen des Dünndarms und des verbliebenen Rektumschlauches ein ileoanales Reservoir angelegt. Postoperativ entwickeln ca. 8% der operierten Anastomosenstrikturen, die zu Diarrhöen führen können. Eine häufiger beobachtete Komplikation ist die Pouchitis (in ca. 10-20% der operierten Patienten), die klinisch mit Diarrhö und Fieber imponiert (Dürig 2003). Interessanterweise haben sich probiotische Kulturen als begleitende Therapie positiv auf die Klinik von Patienten speziell mit pouchitis ausgewirkt (Podolsky 2002).

Während der Therapie der Colitis ulcerosa sollte auf sekundär bedingte Erkrankungen geachtet werden. Diese können zum Beispiel therapeutisch verursacht sein wie im Falle einer langfristigen Steroidtherapie (Metcalf 2007, Podolsky 2002, v. Tirpitz 2004).

### **1.1.3 Morbus Crohn – Klinik und Therapie**

Anders als bei der Colitis ulcerosa können beim Morbus Crohn alle Wandschichten des gesamten Gastrointestinaltraktes betroffen sein. Dieser transmurale Befall ist meistens diskontinuierlich verteilt, betrifft jedoch zumeist das terminale Ileum (30% d. Fälle) sowie das Kolon (30% d. Fälle). Eine kombinierte Ileokolitis Crohn ist in 34% der Fälle anzutreffen. So entsteht ein makroskopisches Bild von abwechselnd gesunden und erkrankten Darmabschnitten, sog. Skip-Lesions, vorwiegend im unteren Gastrointestinaltrakt (v. Tirpitz 2004).

Während des Weltkongresses der Gastroenterologie in Wien 1998 führte man eine einfache Einteilung der Erkrankung ein – die sog. Vienna-Klassifikation. Die Einteilung erfolgte nach klinischen Variablen wie Erstmanifestationsalter, Lokalisation und Verlauf (Gasche 2000). Da der Morbus Crohn jedoch eine dynamische Krankheit darstellt, muss diese Einteilung kritisch betrachtet werden und dem individuellen Verlauf der Erkrankung ständig angepasst werden (Fedorak 2004).

Auch histologisch unterscheidet sich der Morbus Crohn grundlegend von der Colitis ulcerosa. Mikroskopisch finden sich Lymphfollikel mit klar erkennbaren Keimzentren, sowie entzündlich-degenerative Veränderungen sowohl in den Gefäßen als auch im Nervenplexus. Auch sind im Gegensatz zur Colitis ulcerosa die Kryptenarchitektur sowie die Zahl der Becherzellen weitgehend erhalten. Die transmurale Entzündung führt schliesslich zu einer Fibrosierung der Darmwand, was zu Stenosen und Strikturen und Fisteln führen kann. Ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zur Colitis ulcerosa sind die in ca. 50% der Fälle nachweisbaren nicht-verkäsenden Granulome beim M. Crohn (Otto 2001).

Klinisch imponiert das Krankheitsbild primär durch starke schleimige Diarrhöen und Bauchschmerzen. Im akuten Schub kann durch die entzündliche Schwellung der Schleimhaut eine Stenosesymptomatik bis hin zum Ileus entstehen. Durch Malnutrition sind häufig sekundäre Erkrankungen wie Anämie, Vitaminmangelzustände, Osteoporose und Hypoalbuminämie nachzuweisen (v. Tirpitz 2004).

Die langfristig schlimmste Komplikation ist die Entstehung eines Karzinoms im Kolon- und Dünndarmbereich, wobei das Risiko mit der Krankheitsdauer steigt. Das relative Risiko für die Entstehung eines Kolonkarzinoms beträgt ca. 2,5. Erstaunlicherweise beträgt es für die Entstehung eines Dünndarmkarzinoms 31,2. Zurzeit wird eine mögliche protektive Wirkung von 5-ASA Präparaten in der medikamentösen Therapie diskutiert (Hagymasi 2006).

Die Therapie des Morbus Crohn basiert bei milden Verläufen auf Kortikosteroiden und Aminosalicylaten. Im akuten Schub kommen zusätzlich Antibiotika wie Metronidazol zum Einsatz. Allerdings zeigen diese Medikamente keinen positiven Einfluss auf die langfristige Remission, weshalb sich hier für die Langzeitprophylaxe Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Methotrexat bewährt haben. Zusätzlich ist seit 1999 in Deutschland ein monoklonaler, gegen den Tumornekrosefaktor gerichteter Antikörper (Infliximab), zur Therapie zugelassen. Hiervon scheinen insbesondere Patienten mit schweren Krankheitsverläufen und Fisteln zu profitieren (Lopez San Roman 2007, v. Tirpitz 2004).

Die chirurgische Intervention sollte Komplikationen wie Fistelbildungen und Abszessen vorbehalten sein und im Sinne einer „minimal surgery“ durchgeführt werden.

## **1.2 Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen**

Als der Morbus Crohn 1932 erstmals von Crohn, Ginsberg und Oppenheimer als Ileitis terminalis beschrieben wurde, war die Ätiologie dieser Erkrankung noch völlig unklar. Wie auch für die Colitis ulcerosa ist bis heute die Ursache dieser Erkrankungen noch nicht völlig geklärt. Zunächst ließ eine familiäre Häufung der Erkrankungen auf eine genetische Komponente schließen, was jedoch die vielen sporadischen Fälle außer Acht ließ. Inzwischen glaubt man, dass eine Aktivierung des mukosalen Immunsystems, verursacht durch verschiedene Umweltfaktoren, in einem genetisch prädisponierten Menschen die Erkrankungen bedingt (Silverberg 2006, Podolsky 2002).

### **1.2.1 Die Rolle der Genetik**

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zeigen eine grosse Vielfalt an geographischer und ethnischer Verteilung. So sind in den USA geringere Prävalenzen unter der schwarzen, süd-amerikanischen und asiatischen Bevölkerung zu beobachten (Kurata 2002). Im Gegensatz dazu haben Juden, besonders die Ashkenazi, das höchste Risiko eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung im Laufe ihres Lebens zu entwickeln (Oostenbrug 2003, Roth 1989, Yang 1993, Yang 2001). Auch das bekannte Nord-Süd-Gefälle und West-Ost-Gefälle (s. auch 1.1.1), sprechen für eine starke genetische Komponente beider Erkrankungen.

Bis zu 5-10% aller Erkrankten haben eine positive Familienanamnese, die im Vergleich zu sporadischen Formen auch den früheren Krankheitsbeginn bedingt (Bonon 2003). Interessant ist, dass in 75% der betroffenen Familien die betroffenen Individuen entweder M. Crohn oder

Colitis ulcerosa haben. In den übrigen 25% treten beide Erkrankungen innerhalb der Familie auf. Das relative Risiko für Verwandte ersten Grades eines Erkrankten beträgt 10 für die Colitis ulcerosa und 14 für den Morbus Crohn (Orholm 1991). Schon lange ist bekannt, dass das Risiko, an Colitis ulcerosa zu erkranken, bei Verwandten von M. Crohn Patienten erhöht ist, und umgekehrt. Beides weist auf eine, zumindest partielle, gemeinsame genetische Grundlage beider Erkrankungen hin (Mathew 2004).

Am stärksten wird die genetische Komponente durch Zwillingsstudien belegt. Die Konkordanz für Morbus Crohn unter eineiigen Zwillingen liegt zwischen 42% und 58%. Auf der anderen Seite unterscheidet sich die Konkordanz nicht signifikant zwischen zweieiigen Zwillingen und anderen Geschwisterpaaren. Für die Colitis ulcerosa wurde eine Konkordanz für ein- und zweieiige Zwillinge von bis zu 17% bzw. 5% berichtet. Da selbst bei eineiigen Zwillingen die Konkordanz beider Erkrankungen weit unter 100% liegt, kann man auch hier davon ausgehen, dass die Penetranz der verantwortlichen Gene auch von anderen Faktoren abhängt (Subhani 1998, Thompson 1996, Tysk 1988).

Diese Daten stärken insgesamt die These, dass beide Erkrankungen durch einen sich zum Teil überschneidenden Genpool bedingt sein könnten (Binder 1998). Im allgemeinen wird aber durch die Abwesenheit einer klassischen Mendelschen Vererbung auch deutlich, dass nicht nur die Penetranz, sondern auch die Anzahl der gesamten an der Ätiologie beteiligten Gene variabel ist, was auf einen starken Einfluss von Umweltfaktoren schliessen lässt (Podolsky 2002). Es handelt sich also um eine komplexe genetische multifaktorielle Erkrankung, deren Entstehung und Klinik von multiplen Genen bestimmt wird, was bisher die Isolation eines einzigen verantwortlichen Gens schwierig macht (Bonen 2003).

### **1.2.2 Die Rolle von Antikörpern**

Beobachtet wurde auch ein familiär gehäuftes Vorkommen von Autoantikörpern. Insbesondere bei der Colitis ulcerosa sind hohe Titer an pANCA mit der Krankheitsaktivität assoziiert. Sie werden aber auch bei nicht erkrankten Verwandten nachgewiesen, was auf eine gewisse Heterogenität zurückzuführen ist (Duerr 1991, Satsangi 1998). Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) sind bei bis zu 64% der M. Crohn Patienten positiv. Mangels genügender Sensitivität beider Marker sind sie zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht diagnostisch einsetzbar (Sandborn 2001, Bonen 2003). In letzter Zeit gab es jedoch erste Hinweise auf eine mögliche Assoziation der Antikörpertiter mit dem Schweregrad der Erkrankung. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass M. Crohn Patienten mit hohen

Titern an Antikörpern ein erhöhtes Risiko haben, an Dünndarmkomplikationen wie Stenosen und Perforationen zu erkranken (Papp 2007).

### **1.2.3 Ätiologisch relevante Umweltfaktoren**

Die bisher besprochenen genetischen Beobachtungen lassen keinen Schluss auf eine rein genetische Ätiologie zu. Dies ist besonders deutlich anhand der Tatsache, dass eineiige Zwillinge keine Konkordanzraten von 100% aufweisen – wie es bei einer rein genetischen Ätiologie zu erwarten wäre (s. auch 1.2.1). Ausserdem steigen die Inzidenzen sowohl des Morbus Crohn als auch der Colitis ulcerosa in geographischen Regionen, die traditionell eher niedrige Krankheitszahlen vorweisen (s. auch 1.1.1). Diese Beobachtungen, kombiniert mit der Tatsache, dass sich Prävalenzen der Erkrankungen für bestimmte ethnische Gruppen nach Auswanderung in andere Teile der Welt ändern, lassen auf eine starke Beteiligung von Umweltfaktoren bei der Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen schliessen (Shanahan 2002).

Einer der wichtigsten diskutierten Umweltfaktoren ist das Rauchen (Ahmad 2004). Mehrere Studien haben einen Bezug zwischen Rauchen und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hergestellt. So ist bereits bekannt, dass Rauchen mit M. Crohn assoziiert ist und den klinischen Verlauf der Erkrankung negativ beeinflusst. Dahingegen haben sowohl aktive als auch passive Raucher ein niedrigeres Risiko, an einer Colitis ulcerosa zu erkranken. Zusätzlich mildert Rauchen bei bereits erkrankten Patienten den Verlauf der Colitis ulcerosa. Patienten mit Colitis ulcerosa, die das Rauchen aufgaben, zeigten anschliessend einen aktiveren Krankheitsverlauf mit gehäufte stationärer Aufnahme. Dies führte zu einer Diskussion über die mögliche ätiologische Rolle des Nikotins, die jedoch bis heute nur unbefriedigende Antworten lieferte (Bonen 2003, Beaugerie 2001, Rubin 2000).

Medikamentös scheinen insbesondere nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) eine Rolle zu spielen. Diese Stoffgruppe hemmt die Cyclooxygenase und kann, möglicherweise durch Veränderung der intestinalen Permeabilität, akute Krankheitsschübe der Colitis ulcerosa auslösen (Evans 1997).

Protektiv auf die Colitis ulcerosa wirkt sich auch eine vorangegangene Appendektomie aus. Dahingegen wurde eine Appendektomie in starkem Zusammenhang mit einer ileocecalen Beteiligung beim M. Crohn gebracht. Diskutiert wird hier ein vorher nicht diagnostizierter M. Crohn als Ursache für die Appendektomie, da ein zeitlicher Zusammenhang zwischen Appendektomie und folgender Diagnose eines M. Crohn beobachtet wurde (Russel 1997).

Eine bisher bestehende These, dass die Art der Entbindung mit einer veränderten Keimbeseidung des Darmes einhergeht und damit die Entstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung begünstigen kann, scheint inzwischen zweifelhaft. So wurde keine Assoziation zwischen der Art der Geburt (vaginal vs. Kaiserschnitt) und einem erhöhten Risiko für M. Crohn oder Colitis ulcerosa gefunden. Auch scheint kein Zusammenhang mit Stillen zu bestehen. Allerdings konnte ein positiver Zusammenhang mit Frühgeburten hergestellt werden (Sonntag 2007).

Im 20. Jahrhundert hat sich die Ernährung der westlichen Welt grundlegend verändert. Bessere Hygieneverhältnisse, der vermehrte Genuss von nicht-fermentierten Nahrungsmitteln und verbreitete Impfungen der Population führten zu einer keimarmen Umgebung. Man nimmt an, dass diese Verhaltensweisen im Alltag auch die mikrobielle Zusammensetzung im Darm beeinflusst hat. Einer immer seltener werdenden Infektion mit Helminthen auf der einen Seite steht eine steigende Prävalenz des M. Crohn auf der anderen Seite gegenüber (Shanahan 2002, Elliott 2000, Cho 2007, Rook 2007). Im Gegensatz wirken sich schlechte Hygiene und hohe Bevölkerungsdichte meist protektiv aus (Gent 1994, Cho 2007).

Auch die Aufbewahrung der Nahrungsmittel im Kühlschrank scheint sich auf die Entstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auszuwirken. Bakterien wie Yersinien und Listerien können sich im kühlen Umfeld besonders gut vermehren. Sie wurden in Läsionen bei M. Crohn bereits nachgewiesen, was mitunter eine ätiologische Beteiligung dieser Bakterien möglich macht (Hugot 2003). Auch wird eine spezifische Beteiligung von Mycobacterium paratuberculosis und des Masernvirus kontrovers diskutiert (Shanahan 2002, Robertson 2001).

Die Entwicklung einer der beiden Erkrankungen scheint geradezu ein bakterielles Umfeld zu benötigen. Beide Erkrankungen treten bevorzugt im Bereich des Kolons und des ileozökalen Übergangs auf – den Bereich des Gastrointestinaltraktes mit der höchsten Bakteriendichte (v. Tirpitz 2004). Der Darm beinhaltet mehr als 10 mal so viele Bakterien wie unser Körper Zellen hat (Shanahan 2002).

Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass Mäuse, die in einer sterilen Umgebung aufwachsen, keine Kolitis entwickelten, während sich diese schnell entwickelte, als jene Mäuse Bakterien ausgesetzt wurden (Rath 2001, Elson 1999). Es konnte auch gezeigt werden, dass Kontakt mit Darminhalt aus betroffenen Arealen bei partiell Ileokolektomierten Patienten mit M. Crohn ein Rezidiv proximal der Anastomose auslösen kann (D'Haens 1998). Hinzu kommt, dass ein Ileostoma zu einer Verbesserung des M. Crohn im distalen Teil des

Darmes führt, während die Wiederherstellung der Darmpassage zu einem Rezidiv führen kann (Shanahan 2000).

Dazu passt, dass Antibiotika wie Metronidazol speziell in der Behandlung des M. Crohn wirksam sind (Podolsky 2002). Eine protektive Wirkung von probiotischen Kulturen auf den Verlauf des M. Crohn unterstützt ebenfalls die Annahme, dass der wichtigste Umweltfaktor in der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen die bakterielle Darmflora ist. Dies könnte also entweder durch eine fehlerhafte Zusammensetzung der Darmflora oder durch eine Infektion mit bestimmten Keimen geschehen (Rembacken 1999).

Allerdings konnte auch hier noch kein einzelner Organismus für die Entstehung verantwortlich gemacht werden. Die additiven Effekte einer genetischen Prädisposition und multiplen Umweltfaktoren scheinen jedoch als gemeinsame Endstrecke das mukosale Immunsystem zu aktivieren (Podolsky 2002).

#### **1.2.4 Das mukosale Immunsystem**

Der menschliche Gastrointestinaltrakt erfüllt viele Aufgaben, die von der Verdauungsfunktion angefangen bis hin zur immunologischen Auseinandersetzung mit Fremdstoffen reichen. Die große Oberfläche des Darmes trägt nicht nur zur verbesserten Resorption von Nahrungsstoffen bei, sondern stellt auch eine riesige Oberfläche zur Aussenwelt dar. Um sich gegen potentiell pathogene Erreger und Stoffe zu schützen, besitzt der Gastrointestinaltrakt mechanische Barrieren (sog. Tight-junctions) und ein ausgewogenes mukosales Immunsystem. Dieses beinhaltet prozentual die meisten Lymphozyten im Körper, die sich diffus verteilen bzw. in Lymphfollikeln (sog. Peyer-Plaques) befinden. Oberhalb der Lymphfollikel sitzen zur Transzytose fähige M-Zellen, die in der Lage sind, Fremddantigene zu verarbeiten und dem körpereigenen Immunsystem zu präsentieren (Gratzl 2002).

Diese Fremdstoffe setzen sich aus Mikroorganismen einerseits und aus mit der Nahrung aufgenommenen Antigenen andererseits zusammen. Die große Fläche der gastrointestinalen Mukosa verlangt es, vom dortigen Immunsystem eine zielgerichtete immunologische Antwort gegen mögliche Krankheitserreger zu betreiben, während die residente bakterielle Flora, die ja auch für die Verdauungsfunktion des Darmes teilweise mitverantwortlich ist, toleriert wird (Shanahan 2002).

Eine gestörte Barrierefunktion der Mukosa kann dieses Gleichgewicht stören, indem Immunzellen der Lamina propria, speziell dendritische Zellen, dauerhaft der bakteriellen Flora und Antigenen aus der Nahrung ausgesetzt werden. Theoretisch wird das Immunsystem

dadurch konstant aktiviert und die Kaskade der Entzündungsmediatoren überproportional in Gang gesetzt oder ungenügend gehemmt. Es besteht beim Erkrankten also ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Botenstoffen (Sartor 1997).

Diese fehlgeleitete Immunantwort auf bakterielle Antigene der Darmflora kann somit in Kombination mit einer gewissen genetischen Prädisposition und begleitenden Umweltfaktoren zum Ausbruch einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung beitragen (Shanahan 2002).

Beim M. Crohn wird die Mukosa von einem überproportional hohen Anteil an Th1-Helferzellen (CD4+) dominiert, die vermehrt IL-2, IL-12, Interferon- $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) produzieren. Diese von Th1-Zellen produzierten Zytokine aktivieren Makrophagen. Makrophagen wiederum setzen ebenfalls stark wirksame Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-12, IL-18 und TNF-  $\alpha$  frei, was den Entzündungsprozess weiter vorantreibt. Speziell das IL-12 bewirkt eine weitere Differenzierung von Th1-Zellen und unterhält somit den Zyklus der Entzündung. Die Freisetzung und Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen trägt zur chronischen Entzündung und der damit einhergehenden Zerstörung der Mukosa bei. Zusätzlich scheint eine erhöhte Apoptoseresistenz von T-Zellen der Lamina propria, möglicherweise verursacht durch IL-6 und IL-12, für die chronische Entzündung beim M. Crohn verantwortlich zu sein (Shanahan 2002, Podolsky 2002, Holtmann 2004).

Im Gegensatz hierzu stehen bei der Colitis ulcerosa atypische Th2 Helferzellen (CD4+) im Vordergrund, die TGF- $\beta$  und IL-5 freisetzen, jedoch kein IL-4. Im Tiermodell war dieser Effekt verstärkt bei gleichzeitigem Mangel an T-Supressorzellen (Th3- und Tr1-Zellen), die bei Gesunden die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  produzieren. Bei Colitis ulcerosa ist zudem eine verstärkte Bildung von IL-1, IL-6 und IL-8 in betroffenen Arealen der Darmschleimhaut nachgewiesen worden. Ebenfalls ist im Gegensatz zum M. Crohn (bei dem die Produktion von IL-12 stark erhöht ist) bei der Colitis ulcerosa die Produktion von EBI-3 (antagonisiert die Wirkung von IL-12) verstärkt. (Podolsky 2002, Holtmann 2004).

Bei beiden Erkrankungen scheint der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B eine wichtige Rolle zu spielen. In nicht aktivierten Makrophagen liegt NF $\kappa$ B normalerweise an das inhibitorische Molekül I $\kappa$ B gebunden vor. Nach Aktivierung der Zelle wird NF $\kappa$ B durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B freigesetzt, um direkt im Nukleus der Zelle Promotorregionen von proinflammatorischen Faktoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-12 zu stimulieren. Diese Pathophysiologie kann man sich bereits therapeutisch zunutze machen. Aminosalicylate inhibieren die I $\kappa$ B-Kinase, während Steroide sowohl die I $\kappa$ B-Synthese erhöhen als auch NF $\kappa$ B direkt hemmen. Physiologischerweise wird NF $\kappa$ B direkt von PPAR- $\gamma$  gehemmt. Dieser

Mechanismus scheint v.a. bei der Colitis ulcerosa beeinträchtigt zu sein (Holtmann 2004, Dubuquoy 2003).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine persistierende atypische Entzündungsreaktion, mitunter hervorgerufen durch eine defekte Barrierefunktion der Mukosa, zur Entstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung beiträgt.

### **1.3 Genetische Zuordnung krankheitsrelevanter Gene chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen**

Die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene ist bei komplexen multifaktoriellen Erkrankungen erschwert, da jeder einzelne genetische Faktor nur einen kleinen Beitrag zur Genese leistet. Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kommen neben der genetischen Prädisposition zusätzlich mehrere äußere Einflussfaktoren hinzu, welche den Prozess weiter erschweren.

Bei der Suche nach relevanten Genen kann man entweder Kopplungsanalysen oder Assoziationsstudien durchführen.

Um eine Kopplungsanalyse durchzuführen, untersucht man das Genom von betroffenen Geschwisterpaaren (sog. „affected-sib-pairs“) und wenn möglich auch das der Eltern (sog. „trios“). In Case-Control-Analysen wird das Genom der Patienten mit dem eines gesunden Kontrollkollektivs verglichen. Für die Kopplungsanalyse wird das Genom mittels Mikrosatellitenmarker oder Einzelnukleotidpolymorphismen auf chromosomale Abschnitte untersucht, die statistisch gehäuft bei betroffenen Individuen vorkommen. Wenn ein Gen nah genug am verwendeten Marker liegt, ist die Wahrscheinlichkeit einer gekoppelten Vererbung hoch. Wenn bestimmte Allele in Patienten gehäuft vorkommen, kann man vermuten, dass ein für die Krankheit verantwortliches Gen in diesem Abschnitt liegt.

Ist eine Kopplung erst einmal bewiesen, werden spezifische Kandidatengene mittels Assoziationsstudien bestimmt. Assoziationsstudien untersuchen die Allelhäufigkeiten funktioneller Kandidatengene in Patienten und vergleichen diese mit gesunden Kontrollen (Podolsky 2002, Bonen 2003).

#### **1.3.1 Relevante Kopplungsregionen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen**

Die intensive Suche nach verantwortlichen Genen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen führte über genomweite Kopplungsanalysen zur Identifizierung mehrerer Risikoregionen. Als erstes wurde 1996 von Hugot und Mitarbeitern (Hugot 1996) eine starke

Assoziation eines Locus in der perizentromeren Region von Chromosom 16 (16q12) und M. Crohn beschrieben. Dieses Areal auf Chromosom 16 wurde als *IBD1* („inflammatory bowel disease 1“) bezeichnet. Durch folgende Assoziationsstudien und Feinkartierung des Gebietes konnte 2001 schließlich das erste mit M. Crohn eindeutig assoziierte Gen *NOD2/CARD15* identifiziert werden (Hugot 2001, Ogura 2001).

Für die als *IBD2* bezeichnete Region auf Chromosom 12q31 konnte lediglich eine Assoziation für Colitis ulcerosa nachgewiesen werden (Satsangi 1996).

Der *IBD3* Locus auf Chromosom 6p13 wurde mit beiden Krankheitsbildern assoziiert und beinhaltet eine HLA-kodierende Region. Diese Assoziation wurde besonders für männliche Patienten bestätigt. Diese Region enthält ebenfalls kodierende Abschnitte für das Protein TNF- $\alpha$ , welches durch multiple Polymorphismen im Bereich seines Promotors in seiner Funktion beeinträchtigt sein könnte (Hampe 1999, Bonen 2003, Ahmad 2004).

Zusätzlich befindet sich auf Chromosom 14q11 der *IBD4* Locus (Duerr 2000).

Ein weiterer Durchbruch ereignete sich im Jahre 2000, als Rioux und Mitarbeiter in kanadischen Familien durch Kopplungsstudien eine weitere Region auf Chromosom 5q31 (*IBD5*) mit M. Crohn assoziieren konnten (Rioux 2000; s. auch 1.3.3).

Auf Chromosom 19p13 befindet sich der *IBD6*-Locus. Dieser ist mit beiden Krankheitsbildern assoziiert (Rioux 2000). *IBD7* liegt auf Chromosom 1p (Zheng 2003).

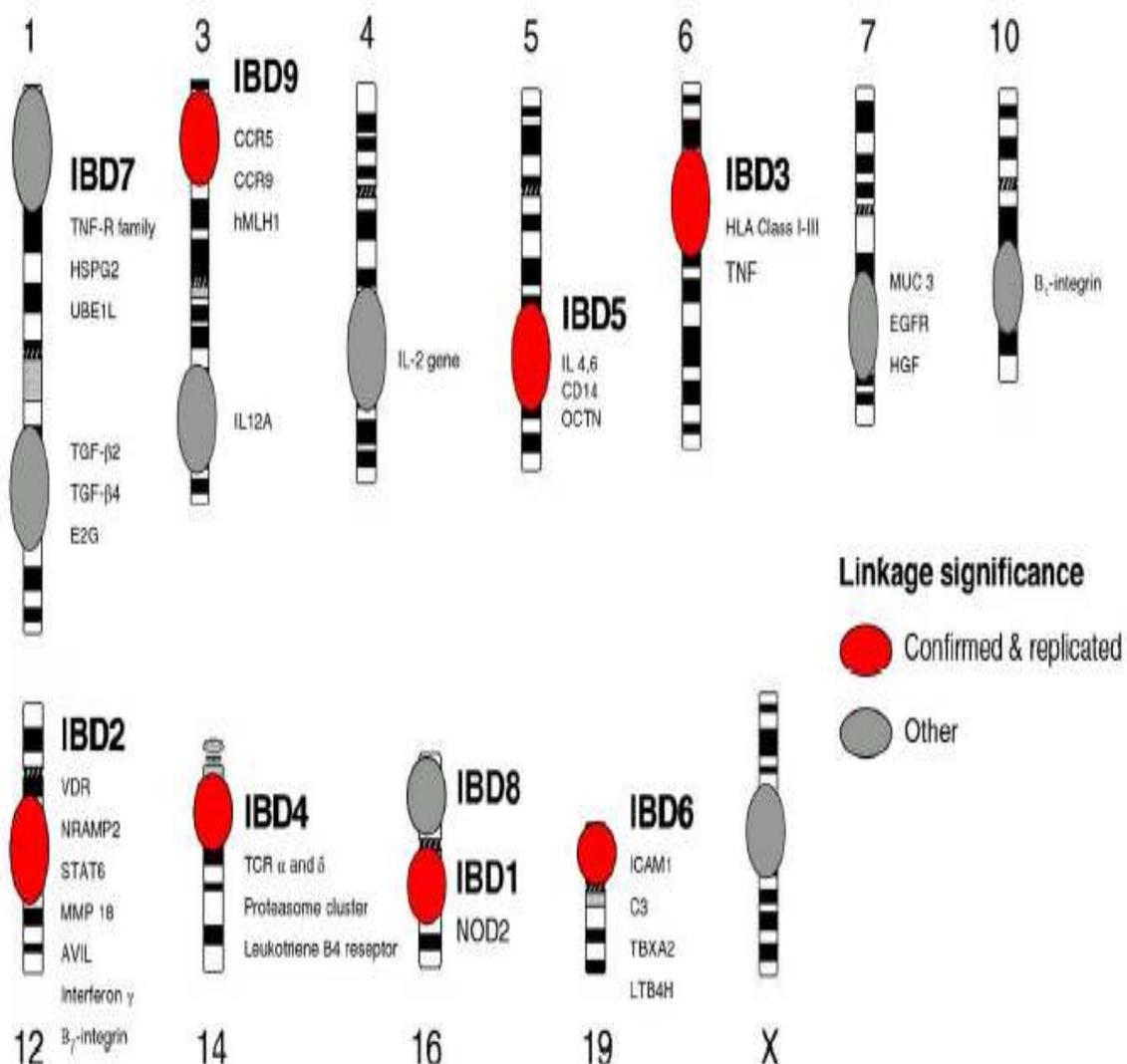
Stoll und Mitarbeiter konnten eine Kopplungsregion auf Chromosom 10q23 nachweisen und genetische Varianten im *DLG5*-Gen finden. Dieses Protein ist in seiner Funktion für die Unversehrtheit der Epithelien mitverantwortlich. Genetische Veränderungen des Gens könnten Einfluss auf seine Funktion nehmen und so die Assoziation mit M. Crohn erklären (Stoll 2004).

Zusammenfassend stellt Abbildung 1.1 die einzelnen Kopplungsregionen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung dar.

Neuerdings konnten weitere Gene in Zusammenhang mit M. Crohn und Colitis ulcerosa gebracht werden. Hierbei handelt es sich zum einen um Mutationen in Klasse II HLA-Genen, die die entzündliche Reaktion der Erkrankungen beeinträchtigen könnten. Auch im *ATG16L1*-Gen, welches mitunter die in intrazellulären Phagosomen stattfindende Verdauung von Bakterien steuert, konnten einzelne Genvarianten mit M. Crohn in Verbindung gebracht werden (Cho 2008).

Das proinflammatorische *IL23R*-Gen auf Chromosom 1p31 konnte mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Das *IL23R*-Gen kodiert eine wichtige Untereinheit des IL-23-Rezeptors. IL23 selber besteht aus den zwei

Untereinheiten p19 (*IL23A*, 12q13) und p40 (*IL12B*, 5q33). Der im *IL23R*-Gen gelegene Polymorphismus Arg381Gln mit seinem selteneren Glutamin-Allel tritt mit einer signifikant geringeren Rate bei nicht-jüdischen M. Crohn Patienten auf im Vergleich zur Kontrollbevölkerung (1.9% vs. 7,0%). Dies legt eine protektive Wirkung nahe, auch wenn bisher der genaue Mechanismus noch unklar ist. Vermutet wird jedoch eine gestörte proinflammatorische IL23-Reaktion durch die Rezeptormutation (Duerr 2006, Cho 2008). Ein therapeutischer Ansatz mit IL-23-Antagonisten (Anti-p40-Antikörper) konnte bereits erste Erfolge zeigen (Mannon 2004).



**Abbildung 1.1** Kopplungsregionen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (nach Ahmad 2004)

Die vielen bisher entdeckten Gene zeigen, dass es in Bezug auf M. Crohn und Colitis ulcerosa Überschneidungen gibt. Während manche Gene nur auf eine einzige Krankheit Einfluss zu nehmen scheinen, sind andere Gene wiederum mit beiden Erkrankungen assoziiert.

Auffallend ist jedoch die Dominanz von Genassoziationen mit proinflammatorischen beziehungsweise entzündungsmodulierenden Genen bei beiden Erkrankungen.

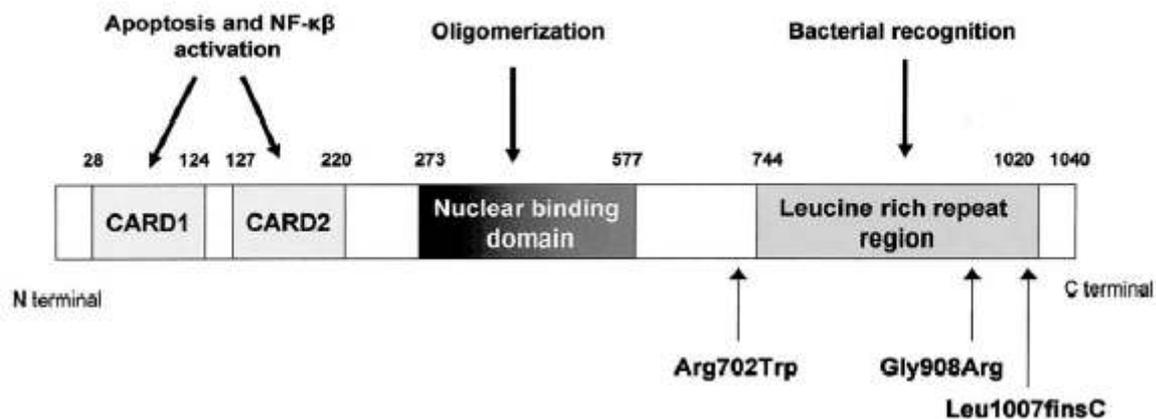
Bis zum heutigen Tage konnte kein einzelnes Gen isoliert werden, welches für die Entität der Erkrankungen allein verantwortlich ist. Dies unterstützt die These einer genetischen Heterogenität, welche annimmt, dass mehrere Gene an der Entstehung einer Entität (in diesem Falle eine der beiden Erkrankungen) beteiligt sind, bzw. modulierend auf deren Verlauf Einfluss nehmen.

### **1.3.2 Das *NOD2/CARD15* Gen**

Das *NOD2/CARD15* Gen war das erste überhaupt, das nachweislich mit M. Crohn in Verbindung gebracht wurde. Hugot und Mitarbeiter erkannten 1996 aufgrund von Kopplungsanalysen eine Region auf Chromosom 16, die später *IBD1* genannt wurde. Durch Feinkartierung gelang es, das *NOD2/CARD15* Gen im *IBD1*-Locus als verantwortliches Gen zu identifizieren. Innerhalb des Gens konnten mehrere Funktionsverlustmutationen entdeckt werden, von denen speziell drei (Arg702Trp, Gly908Arg und Leu1007fsinsC) unabhängig voneinander mit M. Crohn stark assoziiert sind (Hugot 2001, Ogura 2001). Mindestens einer dieser drei ist in etwa 30-40% aller europäischen Crohn-Patienten nachweisbar, verglichen mit 14% in gesunden Kontrollen. Für heterozygote Träger konnte ein 2,7-faches Risiko errechnet werden bzw. ein bis zu 40-faches für homozygote Träger (Übersicht in Karban 2007). Das relative Risiko erhöhte sich auf bis zu 40, wenn mindestens zwei der bekannten drei Mutationen nachweisbar waren, wobei die Assoziation für familiäre Fälle von M. Crohn stärker ist als für die häufigeren sporadischen Fälle (Ahmad 2004, Cho 2003). Es gibt auch Hinweise auf eine mögliche Assoziation mit Colitis ulcerosa. McGovern und Mitarbeiter konnten speziell für den Arg702Trp Polymorphismus eine Assoziation mit Colitis ulcerosa zeigen, wenn auch in Anwesenheit von Risikoallelen im *IBD5*-Locus (McGovern 2003).

Das *NOD2/CARD15* („caspase activation and recruitment domain“) Gen kodiert für ein intrazelluläres Rezeptorprotein des angeborenen Immunsystems. Es besteht aus einer zentralen „Nucleotide-binding“-Domäne und einer „Leucine-rich repeat“ Region (siehe Abb. 1.2). Besonders letztere Region ist für die Erkennung von intrazellulären bakteriellen Peptidoglycanen, speziell dem Muramyl-Dipeptid, wichtig. Dieser Schritt scheint durch die Leu1007fsinsC-Mutation besonders beeinflusst zu werden, da gezeigt werden konnte, dass Patienten mit den bekannten *NOD2/CARD15* Mutationen eine verringerte Aktivierung von NFκB nach Stimulierung mit Muramyl-Dipeptid hatten (Inohara 2003, Netea 2005).

*NOD2/CARD15* scheint auch die Apoptose von Makrophagen zu beeinträchtigen (Podolsky 2002). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die Variationen innerhalb des *NOD2/CARD15* Gens die Freisetzung von IL-10 durch mononukleäre Zellen beeinflussen. Ausserdem werden vermindert antiinflammatorische Botenstoffe nach Stimulierung der Zellen mit Bakterien freigesetzt, was auf eine überschüssige Entzündungsreaktion beim M. Crohn deutet (Netea 2004).



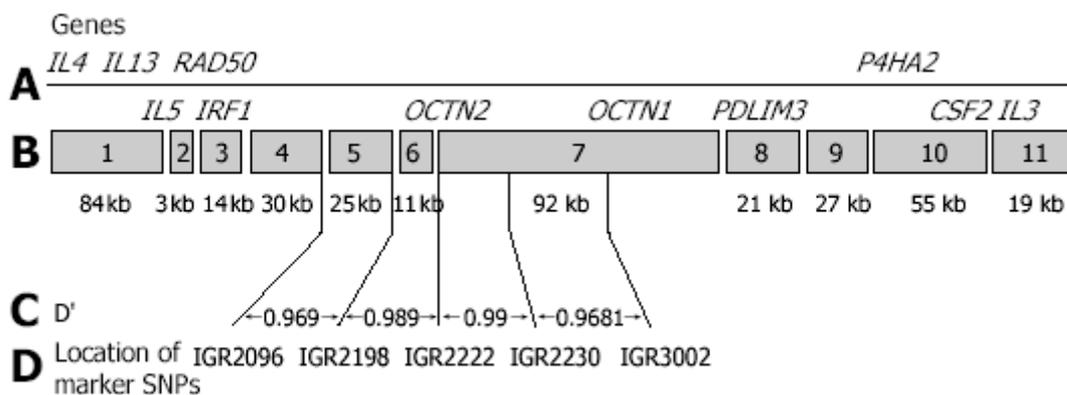
**Abbildung 1.2** Struktur des *CARD15* Gens mit Angabe der Lokalisation der mit M. Crohn assoziierten Mutationen. Die Zahlen stellen die Aminosäureposition dar. (Ahmad 2004)

Bisher konnte *NOD2/CARD15* klinisch sowohl mit einer Beteiligung des Ileums in Verbindung gebracht werden als auch mit einem frühen Krankheitsbeginn (Bonen 2003, Cuthbert 2002, Lesage 2002). Diese Genotyp-phänotypassoziation zeigt nicht nur den Einfluss von *NOD2/CARD15* auf die Klinik und den Verlauf der Erkrankung, sondern auch die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.

### 1.3.3 Der *IBD5*-Locus

Rioux und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 2000 158 betroffene Familien in Kopplungsstudien und entdeckten eine weitere mit M. Crohn assoziierte Region auf Chromosom 5q31 – den sog. *IBD5*-Locus. Die Assoziation bestand besonders für Patienten mit frühem Krankheitsbeginn.

Eine Parallelstudie zeigte die Aufteilung des *IBD5*-Lokus in stabile Haplotypblöcke mit wenig genetischer Variabilität, wobei zwei bis vier Haplotypblöcke ca. 90-98% aller Varianten ausmachen (s. Abb. 1.3) (Daly 2001).



**Abb. 1.3:** Der *IBD5*-Locus nach Daly und Mitarbeitern. A: im *IBD5*-Locus befindliche Kandidatengene B: 11 Haplotypblöcke mit genetischer Konstanz und Unterbrechung durch Rekombinationsabschnitte C: D'-Score zur Demonstration des starken Kopplungsungleichgewichtes der Region D: untersuchte „haplotype-tagging“ Polymorphismen des *IBD5*-Locus (Daly 2001)

Durch die genetische Feinkartierung von 256 Vater-Mutter-Kind-Trios (wobei das Kind jeweils an M. Crohn erkrankt und mindestens ein Elternteil gesund war) konnte in dieser Region ein sich auf 250kB erstreckender Risikohaplotyp mit 11 spezifischen „haplotype-tagging“ Polymorphismen positiv mit dem M. Crohn assoziiert werden (s. Tab. 1.1) (Rioux 2001).

Heterozygote Träger dieses Haplotyps haben ein circa zweifach erhöhtes Risiko, an M. Crohn zu erkranken. Geschätzt wird, dass zwei Drittel der betroffenen Europäer mindestens eine Kopie des Risikohaplotyp tragen. Die beobachtete Assoziation des *IBD5*-Risikohaplotyp mit M. Crohn konnte in vielen Studien bestätigt werden (Armuzzi 2003, Giallourakis 2003, McGovern 2003, Mirza 2003, Negoro 2003).

Interessant ist, dass *IBD5* auch die kodierende Region für die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5 und IL-13 beinhaltet, die bei der Immunabwehr des Organismus eine wichtige Rolle in der Th1/Th2-Antwort spielen (s. auch 1.2.4) (Rioux 2000). Ebenso befindet sich hier das *IRF1*-Gen als Transkriptionsfaktor für multiple proinflammatorische Zytokine, die besonders die Th1-Antwort stimulieren. Eine gesteigerte Th1-Antwort konnte in befallenen Darmabschnitten bei M. Crohn nachgewiesen werden (s.auch 1.2.4). Auf *IBD5* befindet sich

auch das *PDLIM4*-Gen, welches möglicherweise die Permeabilität der intestinalen Mukosa beeinflusst, die als wichtige Barriere für pathogene Darmkeime fungiert. Beim vierten Gen handelt es sich um das *P4HA2*-Gen. Verstärkte Aktivität dieses Gens führt zu einer gesteigerten Bildung von Kollagen bei entzündlichen Prozessen und könnte bei M. Crohn die Bildung von Stenosen begünstigen. Die bisher wichtigste Rolle scheinen jedoch die *OCTN1/2*-Genen zu spielen, deren kodierender Genabschnitt sich ebenfalls auf *IBD5* befindet (übersicht in Reinhard 2006).

Die Identifizierung der spezifischen kausalen Mutation ist bisher jedoch aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichtes in der Region nicht möglich gewesen (Rioux 2001).

SNP-Marker Name	Polymorphismus	Übertragenes Allel	Häufigkeit des Allels
IGR2055a_1	G/T	G	0,357
IGR2060a_1	C/G	C	0,351
IGR2063b_1	C/G	G	0,359
IGR2078a_1	A/G	A	0,364
IGR2096a_1	A/C	A	0,349
IGR2198a_1	C/G	G	0,364
IGR2230a_1	C/T	T	0,415
IGR2277a_1	A/G	G	0,417
IGR3081a_1	G/T	G	0,338
IGR3096a_1	C/T	C	0,429
IGR3236a_1	G/T	T	0,383

**Tab. 1.1:** Name des Polymorphismus, Basenaustausch und Häufigkeit der 11 untersuchten „haplotype-tagging“ Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) des Risikohaplotyp im *IBD5*-Locus (nach Rioux 2001)

### 1.3.3.1 Die Rolle der *SLC22A4* (*OCTN1*) und *SLC22A5* (*OCTN2*) Gene

Von allen im *IBD5*-Lokus enthaltenen Genen scheinen v.a. die *OCTN*-Gene eine besondere ätiologische Rolle zu spielen. *SLC22A4* und *SLC22A5* kodieren für die organischen Kationentransporter (*OCTN1* und *OCTN2*), die in vielen Geweben des Organismus vorkommen. Diese transmembranösen Kationentransporter sind unter anderem für den

Transport von Carnitin in menschliche Zellen verantwortlich und scheinen bei vielen chronischen Entzündungsprozessen - wie zum Beispiel Rheuma - eine ursächliche Rolle zu spielen (Tokuhiro 2003, Yabuuchi 1999). Carnitin ist besonders für den Stoffwechsel von Fettsäuren wichtig. Der beeinflusste Transport von Carnitin kann, unter metabolischen Stresszuständen, über eine gestörte beta-Oxidation von Fettsäuren zu einer Entzündung im Darmepithel führen (Peltekova 2004). Zusätzlich konnte für *OCTN2* eine ursächliche Rolle für den systemischen Carnitinmangel gezeigt werden. Diese Erkrankung betrifft besonders das Skelettsystem, die Muskeln und die Leber, jedoch nicht den Darm (Lahjouji 2001). Allerdings konnte im Tierversuch bei *OCTN2*-defizienten Mäusen eine lymphozytäre Infiltration des Darmes beobachtet werden, was ein weiteres Indiz für eine krankheitsverursachende Rolle der *OCTN*-Gene ist (Silverberg 2006).

Mittels Sequenzierung des Genlocus konnten Peltekova und Mitarbeiter 10 SNPs in den Genen *SLC22A4* (*OCTN1*) und *SLC22A5* (*OCTN2*) im *IBD5*-Locus bestimmen. Zwei Polymorphismen (C1672T, G207C) zeigten eine direkte Assoziation mit dem M. Crohn. Diese beiden Polymorphismen befinden sich jedoch im Kopplungsungleichgewicht und bilden einen Risikoassoziierten Zweipunkthaplotyp (TC). Dieser Haplotyp konnte nicht mit Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht werden. Die Mutation C1672T (*OCTN1*) führt zu einer Substitution der Aminosäure L503F, was die Transportfunktion des *OCTN1*-Proteins behindert. Patienten mit dem Polymorphismus C1672T hatten in vitro im Schnitt lediglich ein Drittel des normalen intrazellulären Carnitingehaltes. Der zweite Polymorphismus G207C in der Promotorregion von *OCTN2* unterbricht ein Hitzeschockprotein, das 207Bp vom Startkodon entfernt ist. Der *OCTN1/OCTN2* Zweipunkthaplotyp ist in 54% der M. Crohn Patienten vorhanden im Gegensatz zu 42% in der Kontrollbevölkerung. Die beschriebene Assoziation war in der ursprünglichen Studie unabhängig von dem von Rioux entdeckten *IBD5*-Risikohaplotyp (mittels dem „haplotype-tagging“ SNP-Marker IGR2078a\_1) beschrieben worden. Insbesondere auffallend war, dass Träger des *IBD5*-Haplotyp (in Abwesenheit des *OCTN1/OCTN2* TC-Haplotyp) sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe gleich verteilt waren (Peltekova 2004).

Eine größere Studie stellte jedoch die Ergebnisse von Peltekova in Frage. Noble und Mitarbeiter konnten in Abwesenheit des *IBD5*-Risikohaplotyp keine Assoziation des *OCTN1/OCTN2* TC-Haplotyp mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa nachweisen. Ebenfalls war auch keine Interaktion der *NOD2/CARD15* Mutationen mit dem TC-Haplotyp zu sehen. Erklärbar wäre dieses Ergebnis durch die Tatsache, dass sich der von Peltekova verwendete ht-SNP IGR2078a\_1 auf dem *IBD5*-Haplotypblock 4 befindet. Die *OCTN*-Gene befinden sich

jedoch auf Block 7 – also weit entfernt. Die von Noble und Mitarbeitern verwendeten ht-SNPs (IGR2096, IGR2198, IGR2230) waren jedoch wesentlich näher bzw. im gleichen Block wie die *OCTN*-Gene (s. auch Abb. 1.3) (Noble 2005, Giallourakis 2003). In einer japanischen Studie waren die zwei *OCTN* Polymorphismen überhaupt nicht nachweisbar, was auf ethnische Unterschiede deutet (Yamazaki 2004).

Eine Folgestudie unserer eigenen Arbeitsgruppe wies ebenfalls eine starke Assoziation des *OCTN1/OCTN2* TC-Haplotyp mit M. Crohn nach – allerdings schwächer als in der Originalarbeit. Eine signifikant erhöhte Frequenz bei M. Crohn konnte hier nur für die homozygoten Träger (TT/CC) beobachtet werden. Im Unterschied zur Studie von Peltekova und Mitarbeitern war bei unserer Studie der *OCTN1/OCTN2* TC-Haplotyp nicht unabhängig vom Suszeptibilitätsmarker im Locus *IBD5* (IGR2078a\_1) mit M. Crohn assoziiert, was im Gegensatz zu Peltekovas Ergebnissen eine alleinige kausale Rolle der beiden Polymorphismen fraglich erscheinen lässt (Török 2005).

Um die Rolle der *OCTN*-Gene weiter zu untersuchen, suchten Urban und Mitarbeiter weitere Polymorphismen. Sie fanden sechs potentiell funktionell relevante Polymorphismen – mit unterschiedlichen Häufigkeiten je nach ethnischer Zugehörigkeit (s. Tab. 1.2). Sie stellten die Hypothese auf, dass eine Assoziation von weiteren *OCTN*-Varianten mit M. Crohn in anderen ethnischen Gruppen als den bisher untersuchten (vorwiegend kaukasische Studien) die kausale Rolle der *OCTN*-Gene untermauern würde (Urban 2005). Dies trifft besonders auf die asiatische und schwarze Bevölkerung zu. Genetische Assoziationsstudien für diese Gruppen stehen zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch aus.

Drei der beschriebenen Polymorphismen mit möglicher funktioneller Relevanz (C917T, C1721T, IVS6+5G>A) kommen gehäuft bei Patienten mit europäischem Hintergrund vor und wurden in der vorliegenden Arbeit auf eine mögliche Assoziation mit M. Crohn und Colitis ulcerosa untersucht (Urban 2005).

Gen	Polymorphismus	Lokalisation	Allelhäufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung
<i>OCTN1</i>	C917T	T306I	0,338
<i>OCTN1</i>	IVS6+5G>A	Intron (splice donor)	0,056
<i>OCTN2</i>	C1721T	3'UTR	0,094

**Tab. 1.2:** Drei potentiell funktionell relevante Polymorphismen in den Genen von *OCTN1* und *OCTN2*, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (aus Urban 2005)

Der Polymorphismus *OCTN2* 3' UTR-C1721T befindet sich auf dem *IBD5* Risikohaplotyp. Die beiden Polymorphismen C917T und IVS6+5G>A befinden sich ausserhalb des Risikohaplotyp.

### 1.3.3.2 Genotyp-Phänotyp Korrelationen für den *IBD5*-Locus

Ähnlich wie für die *NOD2/CARD15*-Mutationen wurde der Risikohaplotyp im *IBD5*-Locus auf mögliche Genotyp-Phänotyp Korrelationen untersucht. Anfangs wurde über eine Assoziation des *IBD5*-Risikohaplotyp mit perianalem M. Crohn berichtet (Armuzzi 2003, Vermeire 2005). Andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen *IBD5* und einem stenosierenden Verlauf des M. Crohn bzw. einer ilealen Lokalisation herstellen. Daraus folgte ein erhöhtes Risiko für Perforationen und chirurgische Interventionen (Noble 2005, Latiano 2006, Brescianini 2007). Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass der aggressivere Verlauf zum größten Teil durch *NOD2/CARD15* vermittelt wurde und weniger durch *IBD5* alleine (Newman 2004, Latiano 2006). Török und Mitarbeiter konnten eine gehäufte Involvierung des Kolons bei homozygoten Trägern des TC-Haplotyp nachweisen. Allerdings beobachteten sie weder eine Assoziation mit einem fistulo-stenosierendem Verlauf noch eine erhöhte Inzidenz chirurgischer Interventionen (Török 2005).

Ebenfalls scheint die ethnische Zugehörigkeit eine Rolle zu spielen. In einer jüdischen Patientengruppe konnte kein Zusammenhang zwischen *IBD5* und perianalem Befall bei M. Crohn hergestellt werden (Karbon 2007),

Widersprüchliche Ergebnisse gab es in Bezug auf eine kausale Rolle von *IBD5* bei Colitis ulcerosa. Während die meisten Studien einen Zusammenhang zwischen beiden nicht herstellen konnten, zeigten einige Studien eine, wenn auch schwache, Assoziation für die Colitis ulcerosa besonders in Anwesenheit von *NOD2/CARD15*-Mutationen (Giallourakis 2003, McGovern 2003, Waller 2006). Hierbei scheint besonders der Schweregrad der Colitis durch *IBD5* verschlimmert zu werden (Latiano 2006, Palmieri 2006).

Der von Peltekova beschriebene TC-Haplotyp konnte sowohl bei der Colitis ulcerosa als auch beim M. Crohn bei Patienten mit niedrigem Körpergewicht gehäuft nachgewiesen werden (Russel 2006).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bis heute ist die Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen nicht gänzlich geklärt. Sicher scheint jedoch eine multifaktorielle Ätiologie mit umweltbedingten und genetischen Faktoren zu sein. Als erstes konnten Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen auf Chromosom 16 (*IBD1*) mit M. Crohn assoziiert werden. Gefolgt wurde diese Erkenntnis von einer weiteren starken Assoziation mit einem auf Chromosom 5q31 gelegenen Risikohaplotyp (*IBD5*). Dieser beinhaltet nicht nur ein Zytokin-Gene-Cluster sondern auch die Gene für die humanen Kationentransporter *OCTN1* und *OCTN2*.

Peltekova und Mitarbeiter konnten in diesen beiden Genen einen Zweipunkthaplotyp beschreiben, der signifikant mit dem M. Crohn assoziiert war und zwar unabhängig vom *IBD5*-Risikohaplotyp. Dies ließ auf eine ätiologische Rolle der Gene schließen, da in vitro ebenfalls eine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden konnte.

Durch das starke Kopplungsungleichgewicht in der Region ist jedoch die Kausalität der beiden Mutationen fraglich. Hinzu kommt, dass Folgestudien zum Teil abweichende Ergebnisse zur Originalarbeit ergaben.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von genetischen Assoziationsstudien die mögliche kausale Rolle weiterer Polymorphismen in den Genen für *OCTN1* und *OCTN2* in der Entstehung des M. Crohn zu untersuchen. Hierfür wurden drei weitere von Urban und Mitarbeitern beschriebene Polymorphismen untersucht, die potentielle Auswirkungen auf die Funktion der *OCTN*-Proteine haben. Diese sind zum einen *OCTN2* 3' UTR-C1721T, der sich auf dem *IBD5*-Haplotyp befindet, sowie die beiden nicht auf dem Haplotyp gelegenen *OCTN1*-306I (917T) und *OCTN1* IVS6+5A. (s. auch 1.3.3.1) Alle drei wurden bisher in keiner Studie auf eine potentielle Assoziation mit M. Crohn und Colitis ulcerosa hin untersucht.

In Bezug auf M. Crohn wurden alle drei Polymorphismen auf eine mögliche, vom *IBD5*-Risikohaplotyp (IGR 2078a\_1) unabhängige, Assoziation hin untersucht.

Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob die Polymorphismen beziehungsweise der Genotyp Auswirkungen auf den klinischen Phänotyp beim M. Crohn hat.

Es wurde auch auf Interaktionen mit den bekannten Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen, bzw. mit dem von Peltekova beschriebenen *OCTN1/OCTN2* TC-Risikohaplotyp, untersucht.

## 2. Material

### 2.1 Studienpopulation

#### 2.1.1 Patientenkollektiv

Die demographischen Daten des Kontroll- und Patientenkollektivs der vorliegenden Arbeit sind in Tabelle 2.1 wiedergegeben.

	<b>M. Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>	<b>Kontrollen</b>
<b>Patientenzahl</b>	606	354	991
<b>Altersschnitt (Median)</b>	36	38	45
<b>Altersspanne</b>	13-76	7-81	18-68
<b>Geschlechterverhältnis in % (weiblich/männlich)</b>	56,6/43,4	53,8/46,2	38,4/61,6

**Tabelle 2.1** Demographische Daten der Studienpopulation

Die Patienten kamen sowohl aus der Medizinischen Klinik bzw. Medizinischen Poliklinik, Standort Innenstadt, Klinikum der Universität München, sowie aus der Medizinischen Klinik II, Klinikum der Universität München, Standort Grosshadern. Ausserdem wurde die Datenbank ergänzt mit Patienten aus der Abteilung für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum und der Universitätsklinik Essen. Alle Patienten befanden sich in stationärer oder ambulanter Behandlung in den oben genannten Einrichtungen und waren kaukasischer Herkunft. Zur Aufnahme in die Studie war eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien gesicherte Diagnose einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Voraussetzung. Jeder Patient konnte eindeutig entweder zum Krankheitsbild des Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa zugeordnet werden. Alle Patienten gaben nach Aufklärung über Inhalt und Zielsetzung der Untersuchung ihr Einverständnis für die Teilnahme. Als Material wurde auf eine schon vorher bestehende DNA-Bank mit isolierter DNA aller Probanden zurückgegriffen.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission genehmigt.

### 2.1.2 Kontrollkollektiv

Als Kontrollkollektiv dienten gesunde, unverwandte Blutspender, welche vom Blutspendedienst der Stadt München zur Verfügung gestellt wurden (s. auch Tab. 2.1).

## 2.2 Kits und Chemikalien

### 2.2.1 Materialien für die DNA-Isolierung

- Ethanol absolut		Merck
- Isopropylalkohol (2-Propanol)		Merck
- Proteinase K		Qiagen
- QIAamp <sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit		Qiagen
- Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 400 mM NaCl 1 mM EDTA	
- Kernlysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8 400 mM NaCl 10 mM EDTA	
- gesättigte Natriumchloridlösung	5 M NaCl	
- Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	20 %	
- TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 1 mM EDTA	

### 2.2.2 Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR Produkte

- Aqua ad injectabilia		Braun
- Deoxynukleotid-Mix (dNTP, je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		Sigma
- HotStarTaq <sup>™</sup> DNA-Polymerase		Qiagen
- QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit		Qiagen

### 2.2.3 Materialien für den Restriktionsverdau

- Restriktionsenzyme: New England BioLabs

*Pvu II*

*Bgl I*

*Rsa I*

- Restriktionspuffer 1 × New England BioLabs

NE Buffer 1  
10 mM Bis-Tris-Propane-HCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM Dithiothreitol

NE Buffer 2:  
10 mM Tris-HCl  
50 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM Dithiothreitol

NE Buffer 3:  
50 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM Dithiothreitol

### 2.2.4 Materialien für die Agarosegelelektrophorese

- 100 bp DNA Molekulargrößenstandard Cambrex

- Agarose, Typ I-A Sigma

- Ethidiumbromid Sigma

- 10 × TBE:  
890 mM Tris  
890 mM Borsäure  
20 mM EDTA pH 8



Tischzentrifuge

UV-Transilluminator

Vortex-Schüttler

Zentrifuge

Universal 30RF, Hettich

LK Bromma

Heidolph

Rotixa/P,Hettich

### **3. Methoden**

#### **3.1 Allgemeine Vorgehensweise**

Insgesamt wurden drei Polymorphismen in den *OCTN-1* und *OCTN2*-Genen des *IBD5*-Locus in der Studienpopulation untersucht. Hierbei handelte es sich um folgende drei Polymorphismen: *SLC22A4 (OCTN1) C917T*, *SLC22A4 (OCTN1) IVS6+5G>A* und *SLC22A5 (OCTN2) C1721T*. Das untersuchte Patientenkollektiv wurde bereits in Vorarbeiten auf drei Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen [*C2104T (Arg702Trp)*, *G2722C (Gly908Arg)* und *3020insC (Leu1007fsinsC)*], den von Peltekova und Mitarbeitern beschriebenen *OCTN1/2* Polymorphismen (*C1672T*, *C207G*) und den *IBD5*-Risikohaplotyp assoziierten Marker *IGR2078a\_1* genotypisiert.

Die aus venösen Blutproben der Probanden gewonnene Leukozyten-DNA wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Mittels Polymerasekettenreaktion und folgender Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse wurden die untersuchten Polymorphismen genotypisiert. Hierbei wurde der DNA-Abschnitt, welcher den Polymorphismus beinhaltet, amplifiziert. Nachfolgend wurden die PCR-Produkte mittels eines Restriktionsenzym verdaut. Das Restriktionsenzym konnte das PCR-Produkt nur im Falle einer der möglichen Allelvarianten schneiden.

Im Anschluss konnten die Restriktionsfragmente elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die verschiedenen Bandenmuster auf dem Gel ließen den Genotyp erkennen. Eine Validierung der Ergebnisse wurde mittels Sequenzierung von Stichproben aller Genotypen durch die Firma SEQUISERVE, Vaterstetten, Deutschland erreicht. Die hierfür erzeugten speziellen PCR-Produkte enthielten den betreffenden Polymorphismus.

#### **3.2 Molekularbiologische Methoden**

##### **3.2.1 Isolierung genomischer DNA**

Als Basis für die in der vorliegenden Arbeit erfolgten Untersuchungen wurde eine bereits bestehende DNA-Bank des Labors benutzt. Deshalb soll der Übersicht halber kurz auf die verwendeten Methoden der DNA-Isolierung eingegangen werden. Die bereits vorhandene DNA wurde jeweils aus venös entnommenem Blut der Patienten/Kontrollen gewonnen. Die

genomische DNA wurde entweder mit Hilfe der Aussalzmethode (Miller 1988) oder mit einem kommerziellen Kit (QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kits, Qiagen) isoliert.

### 3.2.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen. Hier weisen Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum auf, während dies für Proteine bei 280 nm zutrifft. Mit Hilfe eines Quotienten der Extinktionen ( $E_{260} / E_{280}$ ) konnte die Reinheit der gewonnenen DNA bestimmt werden.

Über das Lambert-Beer Gesetz wurde die Konzentration der DNA-Probe bestimmt und mittels TE-Puffer auf 100 ng/μl für die PCR verdünnt.

### 3.2.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht es, spezifische DNA-Sequenzen gezielt zu amplifizieren. Hierfür reichen sehr geringe Mengen der Zielsequenz aus. Jedoch kann anhand dieser Methode auch eine bestimmte Sequenz unter Millionen unterschiedlicher Sequenzen vermehrt werden, weshalb dieses Verfahren sowohl eine hohe Sensitivität wie auch Spezifität aufweist.

Um eine Amplifizierung der DNA zu erreichen, muss anfangs diese zunächst denaturiert werden. Anschließend können sich Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 35 Bp, sog. Primer, an den nun aufgetrennten DNA-Strang anlegen. Diese Oligonukleotide sind zu je einem DNA-Strang in ihrer Basenfolge komplementär. Dieser Schritt der PCR ermöglicht es der hitzestabilen DNA-Polymerase den Abschnitt zu amplifizieren, der zwischen den Primern liegt. Die Schritte der PCR - Denaturierung der DNA, Primer-Annealing und Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes, werden mehrfach wiederholt. Dies führt dazu, dass am Ende einer durchgeführten PCR viele Kopien des gewünschten Abschnittes vorhanden sind. Dieser Ablauf der PCR ist schematisch in Tab. 3.1 dargestellt.

Zyklus	Temperatur (in Grad C)	Zeit	Zyklenzahl
Anfangsdenaturierung	95	15 Minuten	1
Denaturierung	94	30 Sekunden	35
Primer-Annealing	55/60/65	30 Sekunden	35
Extension	72	30 Sekunden	35

Endextension	72	10 Minuten	1
--------------	----	------------	---

**Tab. 3.1:** Exemplarische Darstellung einer PCR-Reaktionsfolge

Zu Beginn erfolgt eine Erhitzung des Reaktionsmixes auf 95° Celsius für 15 Minuten. Zur Reduzierung von unspezifischen PCR-Produkten wurde eine HeiStart DNA-Polymerase verwendet (HotStarTaq™ DNA-Polymerase, Qiagen). Sie wird erst durch 15 minütiges Erhitzen auf 95°C aktiviert. Es folgen ein je 30 Sekunden dauernder Denaturierungszyklus bei 94 °C, gefolgt vom Primer-Annealing (Temp. abhängig vom jeweils benutzten Primer). Abgeschlossen wird das Verfahren durch eine Extensionsphase bei 72 °C. Diese drei Abläufe werden nacheinander insgesamt 35 mal durchlaufen. Letztlich sorgt eine 10 Minuten dauernde Endextensionsphase für eine Fertigstellung von unvollständigen PCR-Produkten.

Die Stammlösung eines PCR-Ansatzes besteht aus mehreren Komponenten. Es werden ein dNTP-Mix aus Deoxinukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), ein PCR-Puffer, die Oligonukleotid-Primer, Magnesiumchlorid (optimale Konzentration durch Austestung bestimmt), gereinigtes Wasser sowie Taq-DNA-Polymerase benötigt. Ergänzt wird die Stammlösung durch die zu amplifizierende DNA des Probanden (s. Tab. 3.2). Um eine Kontamination der Stammlösung frühzeitig zu erkennen, wird bei jedem PCR-Ansatz eine sogenannte Wasserprobe angefertigt. Diese enthält anstatt der DNA-Komponente lediglich Wasser und dient als Negativkontrolle. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 10µl durchgeführt.

	<b>Konzentration (Stammlösung)</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
<b>PCR-Puffer</b>	10 x	1 x (= 1,5 mM MgCl)	1 µl
<b>dNTP-Mix</b>	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
<b>5'-Primer</b>	100 µM	0,25 µM	0,025 µl
<b>3'-Primer</b>	100 µM	0,25 µM	0,025 µl
<b>DNA-Polymerase</b>	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05 µl
<b>MgCl</b>		Durch Austestung bestimmt. (1,5-5,0 mM)	
<b>H<sub>2</sub>O</b>			ad 9,5 µl
<b>DNA</b>	100 ng/µl	5ng/µl	0,5 µl
<b><u>Endvolumen</u></b>			<b><u>10 µl</u></b>

**Tab. 3.2:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Sowohl die endgültige MgCl-Konzentration wie auch die Primer-Annealing-Temperatur wurden ausgetestet. Hierfür wurden je drei PCR-Ansätze mit unterschiedlichen MgCl-Konzentrationen (1,5-5mM) in 0,5mM Schritten angefertigt. Um die optimale Primer-Annealingtemperatur zu bestimmen, wurden Probeläufe bei 55, 60 und 65 °C durchgeführt. Als Kontrolle wurde in jedem Lauf eine Wasserprobe angefertigt. Anschliessend wurde das fertige PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und in der Dunkelkammer ausgewertet. Für die untersuchten Polymorphismen *SLC22A4* C917T, *SLC22A4* IVS6+5G>A und *SLC22A5* C1721T wurden die optimale Annealingtemperatur der Primer bzw. MgCl-Konzentration der PCR-Lösung jeweils einzeln bestimmt. Für alle ergab sich eine Annealingtemperatur von 60° Celsius und eine MgCl-Konzentration von 1,5mM. Da diese Konzentration bereits im Standard PCR-Puffer vorhanden ist, konnte auf eine zusätzliche Gabe von MgCl verzichtet werden.

Die endgültigen MgCl-Konzentrationen und Primer-Annealing-Temperaturen sind in Tab. 3.3 zusammen gefasst.

Polymorphismus	Name 5'-Primer	Name 3'-Primer	Produktlänge (Bp)	Annealingtemperatur	MgCl-Konzentration
<i>OCTN1 C917T</i>	<i>OCTN1-917-5</i>	<i>OCTN1-917-3</i>	155	60 °C	1,5 mM
<i>OCTN2 C1721T</i>	<i>OCT2-1721F</i>	<i>OCT2-1721R</i>	107	60 °C	1,5 mM
<i>OCTN2 C1721T-Sequenzierung</i>	<i>OCT2-1721F</i>	<i>OCTN1721Rs</i>	243	60 °C	1,5 mM
<i>OCTN1 IVS6+5G&gt;A</i>	<i>OCTN1-I6F</i>	<i>OCTN1-I6R</i>	142	60 °C	1,5 mM
<i>OCTN1 IVS6+5G&gt;A-Sequenzierung</i>	<i>OCTN1-I6F</i>	<i>OCTN1-I6Rs</i>	318	60 °C	1,5 mM

**Tab. 3.3:** Name der verwendeten Primer, PCR-Produktlänge, Annealingtemperaturen und MgCl-Konz. der einzelnen untersuchten Polymorphismen.

Alle untersuchten Polymorphismen wurden mittels Sequenzierung von Stichproben aller möglichen Genotypen durch ein Sequenzierunternehmen (Firma Sequiserve, Vaterstetten, Deutschland) bestätigt. Hierfür wurden PCR-Produkte hergestellt, die eine Länge von 155-318 Bp hatten und den gesuchten Polymorphismus enthielten. Das Endvolumen der PCR betrug 100 µl. Die Extensionszeit der PCR wurde auf 45 Sekunden verändert. Die Magnesiumchloridkonzentrationen und Primer-Annealingtemperaturen sind in Tab. 3.3 aufgeführt. Nach Reinigung der PCR-Produkte mittels eines kommerziellen Kits wurden die Proben zum Sequenzieren verschickt.

### 3.2.4 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) –Analyse

Für die RFLP-Analyse werden Restriktionsendonukleasen benötigt, die die DNA an spezifischen Erkennungsstellen schneiden können. Diese Restriktionsendonukleasen werden von Bakterien synthetisiert und in Typ I, II und III Restriktionsendonukleasen unterteilt. Typ II Restriktionsendonukleasen werden am häufigsten verwendet.

Sie schneiden die DNA in genau definierten Abschnitten, indem sie Palindrome erkennen. Palindrome sind mit der Komplementärsequenz identisch. Ziel ist es, einen Polymorphismus nachzuweisen, indem er im Bereich der Erkennungssequenz der Endonuklease liegt.

Sollte jedoch keine vollständige Erkennungssequenz vorliegen, kann sie mittels einer veränderten Primersequenz, die sich durch wenige Nukleotide von der Originalsequenz unterscheidet, während der PCR eingeführt werden.

Die Restriktion ist jedoch nur möglich, wenn in der direkten Umgebung des Polymorphismus eine Gensequenz vorhanden ist, die der Erkennungssequenz des benutzten Restriktionsenzymen gleicht. Auch hier muss die polymorphe Nukleotidposition in der Erkennungssequenz beinhaltet sein. Das verwendete PCR-Produkt sollte außerdem keine weiteren Abschnitte beinhalten, die als Erkennungssequenz für die Endonuklease dienen könnten.

Der Reaktionsmix des Restriktionsverdau selber setzt sich aus einem Puffer, dem Restriktionsenzym sowie aus dem fertigen PCR-Produkt zusammen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei einer enzymespezifischen Temperatur. Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese werden die entstandenen DNA-Fragmente dann aufgetrennt und mittels Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Tab. 3.4 faßt den Ansatz des Restriktionsverdau aller drei untersuchten Polymorphismen zusammen.

	Konzentration	Volumen in µl
<b>Enzym</b>	10.000 U/ml	1
<b>Puffer</b>	10 x	1,25
<b>H<sub>2</sub>O</b>		0,25
<b>PCR-Produkt</b>		10
<b><u>Endvolumen</u></b>		<b><u>12,5</u></b>

**Tab. 3.4:** Schematischer Ansatz des Restriktionsverdau

Die im einzelnen verwendeten Enzyme und Puffer sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Polymorphismus	Enzym	Puffer	Inkubationstemperatur	Inkubationsdauer
C917T	PVU II	2	37 °C	12 Stunden
C1721T	BGL I	3	37 °C	12 Stunden
IVS6+5G>A	RSA I	1	37 °C	12 Stunden

**Tab. 3.5:** Verwendete Restriktionsenzyme und Inkubationstemperatur

Der angesetzte Verdau wurde bei 37 °C über Nacht im Brutschrank belassen.

### **3.2.5 Agarosegelelektrophorese**

Um die im Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente aufzutrennen, werden sie im Anschluss einer Agarosegelelektrophorese zugeführt. Dieses Verfahren ermöglicht es, die einzelnen Fragmente durch Anlegen einer elektrischen Spannung ihrer Größe nach in horizontaler Ebene aufzutrennen. Im angesetzten elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren durch die Poren des Gels zur positiv geladenen Anode. Hierfür wird ein vorher angefertigtes Agarosegel in eine mit Pufferlösung gefüllte Kammer gelegt.

Während dieses Prozesses durchlaufen kleinere DNA-Fragmente das Gel schneller. Mit Hilfe eines mitlaufenden Molekulargewichtsstandards kann dann die Größe der einzelnen Fragmente ermittelt werden.

Um die Banden sichtbar zu machen, wird sowohl im Gel als auch im Laufpuffer der unter UV-Licht fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid gelöst. Als interkalierende Substanz bindet er an die DNA und ermöglicht so deren spätere Darstellung unter UV-Licht.

Für die Gelelektrophorese wurde eine Agarosekonzentration von 2,5% verwendet, da alle untersuchten DNA-Fragmente unter 200 Bp lang waren.

Zur Vorbereitung des Agarosegels wurden 6g Agarose in 250 ml TBE-Puffer (10%) in einer Mikrowelle ca. 2,5 Minuten lang aufgelöst. Nach Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid (10mg/ml, Sigma) wurde das Gemisch in eine Gelform (15x25cm) gegossen, die bereits vorher mit 4 Gelkämme (zu je 20 Zähnen) versehen wurde. Nach 20 minütigem Kühlen war das Gel erstarrt, und die Gelkämme konnten gezogen werden. Anschließend konnte das fertige Gel in die Gelkammer gelegt werden. Die Gelkammer enthielt den Laufpuffer (TBE-Puffer 10% mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid). Die aus dem Restriktionsverdau entstandenen DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel noch mit 2 µl eines DNA-Loading Buffers versehen. Dies ergab ein Ladevolumen von 14 µl. In eine am Rand gelegenen Tasche wurden 12 µl einer 100 Bp-DNA-Leiter als Größenstandard gefüllt.

Nach Auftragen der einzelnen Proben folgte nun für eine Dauer von zwei Stunden die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente bei einer Spannung von 120 Volt.

Nach zwei Stunden konnte das Gel auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und digital fotografiert werden.

### 3.2.6 Reinigung der PCR-Produkte

Sämtliche PCR-Produkte für die Sequenzierung wurden mittels eines Kits (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) gereinigt. So konnten Rückstände von nicht verbrauchten Primern sowie Primerdimere entfernt werden.

Hierfür wurden die PCR-Produkte in 1,5ml Gefäße übertragen und mit dem im Kit enthaltenen PB-Bindungspuffer vermischt. Nach Auftragen der Lösung auf die entsprechende Säule wurde sie für 1 Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert. Dieses Verfahren verursacht die Bindung der DNA an die Silica-Gel-Matrix der Säule. Für den folgenden Waschvorgang wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und der nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 UpM entstandene Durchfluss verworfen.

Eine weitere Zentrifugation (1 Minute bei 13.000 UpM) stellte sicher, dass alle Reste des PE-Puffers entfernt wurden. Die Säule wurde zur Lösung der enthaltenen DNA erneut in ein 1,5ml Gefäß gesteckt, wobei 40-60 µl EB-Elutionspuffer direkt auf die Membran aufgetragen wurden.

Nach 5 Minuten Inkubationszeit (Raumtemperatur) konnte für drei Minuten zentrifugiert werden (13.000 UpM). Eine hohe Konzentration der DNA wurde durch Wiederauftragen des Filtrats auf die Säule mit nochmaliger Zentrifugation (drei Minuten bei 13.000 UpM) erreicht. Das durch den QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, gewonnene PCR-Produkt wurde an die Firma SEQUISERVE, Vaterstetten, Deutschland, zur Sequenzierung verschickt.

### 3.3 Typisierung der Polymorphismen

#### 3.3.1 Nachweis von Mutationen in den Genen für *OCTN1* und *OCTN2*

Bereits 2004 haben Peltekova und Mitarbeiter einen Zweipunkthaplotyp *OCTN1/2* [C1672T (*SLC22A4*) und G207C (*SLC22A5*)] mit gehäuftem Vorkommen bei M. Crohn Patienten beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die beiden Polymorphismen sowohl die Expression als auch die Funktion der Kationentransporter unabhängig von weiteren Mutationen der *IBD5* Region beeinflussen. Es ist jedoch unklar, ob die beiden Varianten kausal für die Erkrankung sind. In der vorliegenden Arbeit wurden drei weitere Polymorphismen mit möglicher funktioneller Relevanz in den für die Kationentransporter kodierenden Genen *OCTN1* und *OCTN2* des *IBD5*-Locus auf eine mögliche Assoziation mit M. Crohn und Colitis ulcerosa hin untersucht.

### 3.3.2 Nachweismethode für den Polymorphismus *SLC22A4* C917T (*OCTN1*)

Der zuerst untersuchte Polymorphismus im *SLC22A4*-Gen, C917T führt zum Aminosäureaustausch T306I (s. Abb. 3.1).

Anhand der bekannten Sequenzen wurden passende Primer ausgesucht (TIB-MOLBIOL, Berlin). In diesem Fall handelt es sich um die Primer *OCN1-917-5* sowie *OCN1-917-3*.

Das fertige PCR-Produkt umfasst eine Gesamtlänge von 155 Basenpaaren.

```
GGGGAAACTCAGATTTAATAGTATCCAGCCCTGCTGTTGTGAAAAATTATTAATATTTAAAA
ATAAATTATAGGTTTCATTCCTGAATCTCCCCGATGGCTGATATCCCAGAGAAGATTTAGAGA
GGCTGAAGATATCATCCAAAAGCTGCAAAAATGAACAACACAGCTGTACCAGCAGTGATAT
TTGATTCTGTGGAGGTAAGCATTTGCAGATGTTTCTTTGAGATCAGCTATGCATTCTTGA
TTTTATGGAATTTAACTTAATTCAATATTTGTTAAGTGCCACTATGTACCAGGCA
```

**Abbildung 3.1:** Genotypisierung des Polymorphismus C917T im *SLC22A4*-Gen

Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung und Sequenzierung sind blau dargestellt. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym ist rot markiert. Die Position des gesuchten Polymorphismus ist unterstrichen.

Das verwendete Restriktionsenzym *Pvu II* mit der Erkennungssequenz CAG-CTG (s. Abb. 3.1) ermöglicht es, den gesuchten Polymorphismus zu erkennen. Ist die Erkennungssequenz vorhanden, schneidet das Enzym das PCR-Produkt in zwei Teile à 82 bzw. 73 Bp Länge. Im Falle des Austauschs der Base Cytosin gegen Tyrosin verändert sich die Erkennungssequenz, und die Restriktion entfällt. So entsteht im Falle des Genotyps „TT“ ein ungeschnittenes Genprodukt mit einer Länge von 155 Bp. Entsprechend liefert der heterozygote Genotyp „CT“ drei Produkte mit einer Länge von 155 (Allel T) sowie 73 und 82 Bp Länge (Allel C). Im Falle des Genotyps „CC“ entstehen für beide Allele je zwei Restriktionsprodukte mit 82 bzw. 73 Bp Länge.

### 3.3.3 Nachweismethode für den Polymorphismus *SLC22A5* C1721T (*OCTN2*)

Dieser Polymorphismus liegt im nicht-translatierten 3'-Ende des *OCTN2*-Gens. Für den Nachweis dieser Punktmutation wurde ein 107 Bp langes PCR-Produkt hergestellt. Zwei Nukleotide wurden im 3'Primer verändert, um eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bgl I* zu ermöglichen (T>G, G>C) (s. Abbildung 3.2).

```

TTGTTTGGAGACTGGGAGGCATCTTTTNAATGTGTTACTGACATATTTTGGCTTGTTTTT
ATAGANTGAAACACAGAAAACTCCAAGTCACACAAGGATGTTAAAAGATGGTCAAGAAAGG
NCCACAATCCTTAAAAGCACAGCCTTCTAACATCGCTTCCAGTAAGGGAGAACTGAAGAGG
AAAGACTGTCTTGCCAGAAAT*GG*CCAGCTTGTGCAGACTCCGAGTCTTCAGTGACAAAA
GGCCTTTGCTGTTTGTCTCTTGACCTGTGTCTGACTTGCTCCTGGATGGGCACCCACACTC
AGAGGCTACATATGGCCCTAGAGCACCACCTTCCTCTAGGGACACTGGGGCTACCTACAGAC
AACTTCATCTAAGTCCTAACTATTACAATGA

```

**Abbildung 3.2:** Genotypisierung des Polymorphismus C1721T im *SLC22A5*-Gen

Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung sind blau dargestellt. Die mit \* markierten Basen wurden verändert (T>G, G>C), um eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym zu ermöglichen. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bgl I* ist unterstrichen. Die Position des gesuchten Polymorphismus ist rot markiert. Die Primersequenz für den Sequenzierprimer *OCTNI721Rs* ist rosa dargestellt.

Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bgl I* ist 5'-GCCNNNN-NGGC-3' bzw. 3'CGGN-NNNNCCG-5'. Diese Sequenz ist nur im Fall des 1721C-Allels vorhanden (GCCNNNNN). Im Falle des Polymorphismus C>T entfällt hier die Restriktion. Entsprechend entsteht beim Genotyp „TT“ ein Produkt der Länge 107 Bp. Bei „CT“ entstehen drei Stücke der Längen 81 und 26 und 107 Bp. Beim Allel „CC“ entstehen entsprechend zwei Fragmente mit 81 bzw. 26 Bp Länge.

Der für die Sequenzierung verwendete Primer *OCTNI721-Rs* wurde benutzt, um eine größere Distanz zwischen Polymorphismus und Primersequenz in Richtung 3' zu schaffen (s. Abb. 3.2). Das 243 Bp lange Amplifikat enthielt ebenfalls den gesuchten Polymorphismus.

**3.3.4. Nachweismethode für den Inversionspolymorphismus *SLC22A4* IVS 6+5G>A (*OCTNI*)**

Für den Nachweis des Inversionspolymorphismus IVS6+5G>A wurde ein 142 Bp langes Amplifikat hergestellt. Es wurde ein A>C Austausch eines Nukleotids im 3'-Primer eingebaut. Dies ermöglichte die richtige Erkennungssequenz für das verwendete Restriktionsenzym *Rsa I* (s. Abbildung 3.3).

```

AGTGTCATATATGTAGATGCCCTATTGCCTCCAATCACCAGACTTCTAAGCATAGTCAAGTG
AAGTGAGAGTTGCATGCATAAGTTTTCCCATGCATCATAGCCAAAGATACTTCCTTACTAC
CTCTTAATCTCATGGTTATTTGCATTATTTTGGTTACAGGAGCTAAATCCCCTGAAGCAGCA
GAAAGCTTTCATTCTGGACCTGTTTCAGGACTCGGAATATTGCCATAATGACCATTATGTCTT
TGCTGCTATGGTAAGTAA*TAAGTGACCTGGAAATGCAGATATCCAGCACATAAGTATGCAA
CTGATTTTCTTAACTCAGAGGAACATTATGACAACGACTGGGTTTTCTGAGGAAAAATTAA
GATTATAAAATTCTAAATTATTTTGAAATGCCTCTATTTCAGTTCATGGGACTAGATATTGAA
AAATGTCACCTGGGCGCAATGGCTTACGCCTGTAATTCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGG
CAGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAGACGAATCTAGCCAACAT

```

**Abbildung 3.3:** Genotypisierung des Inversionspolymorphismus IVS6+5 G>A im *SLC22A4*-Gen

Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung sind blau dargestellt. Die mit \* markierten Basen wurden verändert (A>C) um eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym zu ermöglichen. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Rsa I* ist unterstrichen. Die Position des gesuchten Polymorphismus ist rot markiert. Die Primersequenz für den Sequenzierprimer *OCTNI-I6Rs* ist rosa dargestellt.

Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Rsa I* ist 5'-GT-AC-3' bzw. 3'-CA-TG-5'. Ist der Genotyp der untersuchten Probe „GG“ und die Base somit am richtigen Genort, kann das Enzym die Sequenz schneiden. Nach der Restriktion resultieren zwei Produkte der Längen 109 und 33 Bp. Ist jedoch durch Inversion die Base vertauscht, kann keine Restriktion erfolgen. Dies resultiert in einem Restriktionsprodukt der Länge 142 Bp für den Genotyp „AA“. Entsprechend wird der heterozygote Träger „GA“ zu drei Restriktionsprodukten a 142, 109 und 33 Bp Länge führen.

Auch hier wurde für die Sequenzierung ein alternativer 3' Primer (*OCTNI-I6Rs*) verwendet (s. Abb. 3.3), der weiter in 3'-Richtung gelegen ist. Dieses 318 Bp lange Amplifikat enthielt den Polymorphismus.

### 3.4 Statistische Auswertung

Das Ziel der Arbeit war, einzelne Polymorphismen der *OCTN1/2*-Gene auf eine mögliche Assoziation mit M. Crohn und Colitis ulcerosa hin zu untersuchen. Dafür wurde die Häufigkeit der Polymorphismen bei gesunden Kontrollen mit der Häufigkeit bei erkrankten Patienten verglichen.

Die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen wurden für alle drei Gruppen mit den durch das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht errechneten Häufigkeiten verglichen.

Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Chi-Quadrat ( $\chi^2$ )-Test oder des Fisher's-Exact-Test.

Für die statistischen Berechnungen wurde die Software SPSS Vs. 14.0 verwendet.

#### 3.4.1 Voraussetzungen

Um eine zuverlässige statistische Auswertung zu erreichen, wurde ein Patientenkollektiv mit einer hohen Anzahl von Patienten verwendet, wobei die Kontrollgruppe ein bis zweimal so groß wie die Gruppe der Patienten war.

#### 3.4.2 Der Chi-Quadrat ( $\chi^2$ )-Test

Für die statistische Auswertung mittels  $\chi^2$ -Test diente folgende Tabelle als Grundlage:

	Zahl der Patienten	Zahl der Kontrollen	Gesamtzahl
Positiv	A	c	a + c
Negativ	B	d	b + d
Gesamtzahl	a + b	c + d	a + b + c + d

Der errechnete Grad der Signifikanz kann unterschiedliche Grade annehmen.

1. Signifikant, wenn (5 %-Stufe,  $p \leq 0,05$ )  $3,84 \leq \chi^2 < 6,64$
2. Hochsignifikant, wenn (1 %-Stufe,  $p \leq 0,01$ )  $6,64 \leq \chi^2 < 10,83$
3. Höchsthochsignifikant, wenn (0,1%-Stufe,  $p \leq 0,001$ )  $10,83 \geq \chi^2$

Wichtig für die Anwendung des  $\chi^2$ -Tests ist eine ausreichend hohe Fallzahl ( $n > 5$ ). Für kleinere Fallzahlen wurde der Fisher's-Exact-Test verwendet.

Bei multiplen Vergleichen von Variablen wurden die Signifikanzwerte nach Bonferroni korrigiert.

### 3.4.3 Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die aus der vorliegenden Arbeit resultierenden Frequenzen der einzelnen Genotypen wurden mit den errechneten Frequenzen durch das Hardy-Weinberg-Gesetz verglichen. Voraussetzung für die Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes ist, dass die Häufigkeit der zwei Allele eines Gens in einer Population konstant bleibt.

Das Hardy-Weinberg-Gesetz berechnet die erwartete Genotypenfrequenz in einer Bevölkerung mit folgender Formel, unter der Annahme dass pro Gen zwei Allele („A“ und „a“) vorhanden sind:

Unter der Annahme:  $P$  = Anzahl der A-Allele und  $q$  = Anzahl der a-Allele gilt:

$$P+q=1$$

Mit Hilfe der Formel  $p^2$  (AA) +  $2pq$  (Aa) +  $q^2$  (aa) lassen sich nun die einzelnen Genfrequenzen einer entsprechenden Population berechnen:

$$F_{AA} = f_A^2$$

$$F_{Aa} = 2 \times f_A \times f_a$$

$$F_{aa} = f_a^2$$

Abschliessend wird die Signifikanz wie folgt berechnet:

$$\chi^2 = \frac{(\text{beobachtete Frequenz} - \text{erwartete Frequenz})^2}{\text{beobachtete Frequenz}}$$

Wenn eine Normalverteilung vorliegt sollten die beobachteten Frequenzen nicht signifikant von den erwarteten Genotypfrequenzen abweichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Überblick

Es wurden drei verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen in den Genen für *OCTN1/2* untersucht. Für jeden Polymorphismus existieren zwei mögliche Allele. Für jeden in dieser Arbeit untersuchten Probanden konnte der Genotyp eindeutig bestimmt werden. Hierfür wurde aus Leukozyten isolierte DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließendem Restriktionsverdau untersucht. Mit stichprobenartigen Sequenzierungen wurden für alle untersuchten Polymorphismen die jeweils drei möglichen Genotypen verifiziert.

Berechnungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes zeigten, dass sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die Patientengruppen die beobachteten Genotypfrequenzen sich nicht von den erwarteten Frequenzen unterschieden. Jede der drei untersuchten Gruppen befindet sich somit im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Die Allel- und Genotypenfrequenzen wurden in den Patientengruppen jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen. Für die M. Crohn Patientengruppe wurde außerdem auf eine Korrelation der untersuchten *OCTN*-Varianten mit *NOD2/CARD15*-Mutationen, dem von Peltekova und Mitarbeitern entdeckten *OCTN*-TC-Haplotyp, bzw. mit dem *IBD5*-Risikohaplotyp (Marker IGR2078a\_1), hin untersucht. Die Typisierung der Studienpopulation für diese Varianten erfolgte bereits in Vorgängerarbeiten. Zusätzlich wurde der mögliche Einfluss der drei untersuchten Polymorphismen auf die klinischen Subgruppen bei M. Crohn beurteilt.

Die statistische Auswertung erfolgte anhand des  $\chi^2$ -Tests mit Yates-Korrektur.

### 4.2 Untersuchte Varianten in den *OCTN1*- und *OCTN2*-Genen

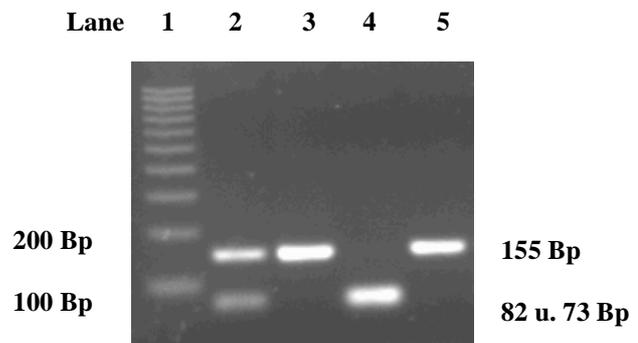
#### 4.2.1 Der Polymorphismus C917T im *SLC22A4* -Gen (*OCTN1*)

Der Polymorphismus *SLC22A4*, C917T führt in Position 306 zu einem Austausch der Base Cytosin gegen Tyrosin (T306I). Das für die Typisierung entstehende PCR-Produkt umfasst eine Gesamtlänge von 155 Basenpaaren. Mittels des verwendeten Restriktionsenzym *Pvu II* wurde das Produkt verdaut. Im Falle des Wildtyps („CC“) entstehen zwei Fragmente a 82 bzw. 73 Bp Länge. Im Falle des T-Allels blieb das PCR-Produkt unverdaut (155 Bp Länge),

wobei beim heterozygoten Genotyp („CT“) drei Fragmente entstanden mit 155, 73 und 82 Bp Länge (s. Abb. 4.1). In Abb. 4.1 erscheinen die Banden der Längen 82 und 73 Bp als eine dicke Bande. Eine elektrophoretische Trennung der Fragmente ist aufgrund der fast gleichen Länge nicht im einzelnen sichtbar.

**Abb. 4.1:** Der Polymorphismus C917T im *OCTNI* - Gen

Lane 1: 100 Bp DNA-Leiter  
 Lane 2: Heterozygoter Träger („CT“)  
 Lane 3: Homozygot („TT“)  
 Lane 4: Homozygot („CC“)



Die beobachteten Allel- und Genotypenfrequenzen stellt Tabelle 4.1 dar. Die Frequenzen der Patientengruppe wurden jeweils mit denen der Kontrollgruppe verglichen und mittels  $\chi^2$ -Test ausgewertet. Die errechneten p-Werte sind ebenfalls Tabelle 4.2 zu entnehmen.

	Allelfrequenzen		Genotypfrequenzen		
	C	T	CC	CT	TT
<b>M. Crohn</b> (n = 606)	751 (61,9%)	461 (38,1%) p=n.s.*	236 (39,0%) p=n.s.	279 (46,0%) p=n.s.	91 (15,0%) p=n.s.
<b>Colitis ulcerosa</b> (n = 354)	456 (64,4%)	252 (35,6%) p=n.s.	148 (41,8%) p=n.s.	160 (45,2%) p=n.s.	46 (13,0%) p=n.s.
<b>Kontrollgruppe</b> (n = 991)	1220 (61,5%)	762 (38,4%)	375 (37,9%)	470 (47,4%)	146 (14,7%)

**Tab. 4.1:** Allel- und Genotypfrequenzen des C917T Polymorphismus im *OCTNI*-Gen in der Studienpopulation. Die statistische Auswertung der p-Werte erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur jeweils für Patientengruppe vs. Kontrollgruppe. (\*n.s. = nicht signifikant)

Bemerkenswert war, dass das T-Allel bei M. Crohn nicht wie ursprünglich vermutet signifikant öfter vorkam als in der Kontrollgruppe. Allerdings schien es für Colitis ulcerosa sowohl in der Allelfrequenz als auch in der Genotypfrequenz weniger häufig übertragen zu

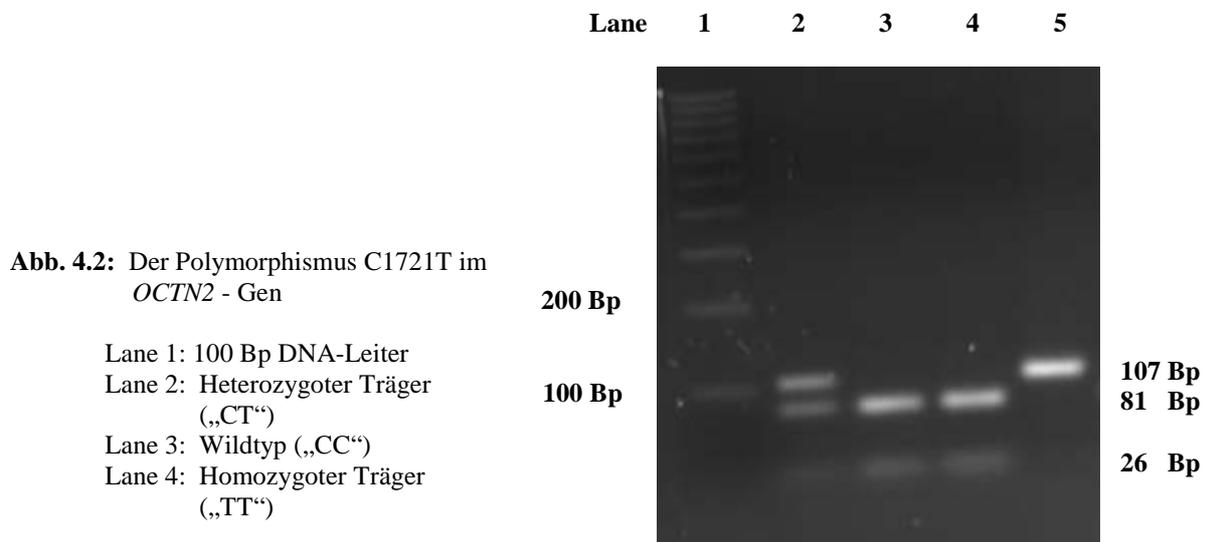
werden (35,6% vs. 38,4% bzw. 58,2% vs. 62,1%). Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollpopulation nachgewiesen werden ( $p=0,194$  bzw.  $p=0,211$ ).

Insgesamt waren in der untersuchten Studienpopulation keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz der C917T-Mutation im jeweiligen Vergleich zwischen M. Crohn, Colitis ulcerosa und der Kontrollgruppe bzw. zwischen den Patientengruppen nachzuweisen.

#### 4.2.2 Der Polymorphismus C1721T im *SLC22A5*-Gen (*OCTN2*)

Dieser Polymorphismus liegt im nicht-translatierten 3'-Ende des *OCTN2* Gens. Um die Punktmutation nachzuweisen, wurde hier ein PCR-Produkt mit 107 Bp Länge amplifiziert und anschließend enzymatisch (*Bgl I*) verdaut.

Im Falle des Wildtyps („CC“) ist die entsprechende Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym vorhanden, und es entstehen zwei Fragmente mit jeweils 81 bzw. 26 Bp Länge. Die Restriktion entfällt im Falle der Mutation. So entsteht für den homozygoten Allelträger („TT“) lediglich ein Fragment mit 107 Bp Länge, für heterozygote Träger („CT“) drei Fragmente mit 26, 81 und 107 Bp Länge. Die entstehenden Banden nach Agarosegelelektrophorese und die Bestimmung des Genotyps sind in Abb. 4.2 gezeigt.



Allel- und Genotypenfrequenzen für den Polymorphismus stellt Tabelle 4.2 dar. Die Frequenzen der Patientengruppen wurden auch hier jeweils mit denen der Kontrollgruppe verglichen und mittels  $\chi^2$ -Test ausgewertet.

	Allelfrequenzen		Genotypfrequenzen		
	C	T	CC	CT	TT
<b>M. Crohn</b> (n = 597)	1047 (87,6%)	147 (12,4%) p=n.s.*	459 (76,9%) p=n.s.	129 (21,6%) p= n.s.	9 (1,5%) p= n.s.
<b>Colitis ulcerosa</b> (n = 354)	621 (87,7%)	87 (12,3%) p= n.s.	278 (78,5%) p= n.s.	65 (18,4%) p= n.s.	11 (3,1%) p= n.s.
<b>Kontrollgruppe</b> (n = 989)	1713 (86,6%)	265 (13,4%)	740 (74,8%)	233 (23,6%)	16 (1,6%)

**Tab. 4.2:** Allel- und Genotypfrequenzen des C1721T Polymorphismus im *OCTN2*-Gen in der Studienpopulation. Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur jeweils für Patientengruppe vs. Kontrollgruppe. (\*n.s. = nicht signifikant)

In diesem Fall war die Häufigkeit des homozygoten TT-Genotyps in der Colitis-ulcerosa-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe (3,1% vs. 1,6%;  $p=0,135$ ). Dagegen war der heterozygote Genotyp in dieser Gruppe wesentlich kleiner als in der Kontrollgruppe (18,4% vs. 23,6%), wie auch der Carrier-Status generell (21,5% vs. 25,2%;  $p=0,185$ ). Die Allelfrequenzen selber unterschieden sich jedoch kaum (12,3% vs. 13,4%  $p=0,493$ ). Trotz der beobachteten Frequenzunterschiede konnte hierfür kein statistisch signifikanter Zusammenhang beobachtet werden.

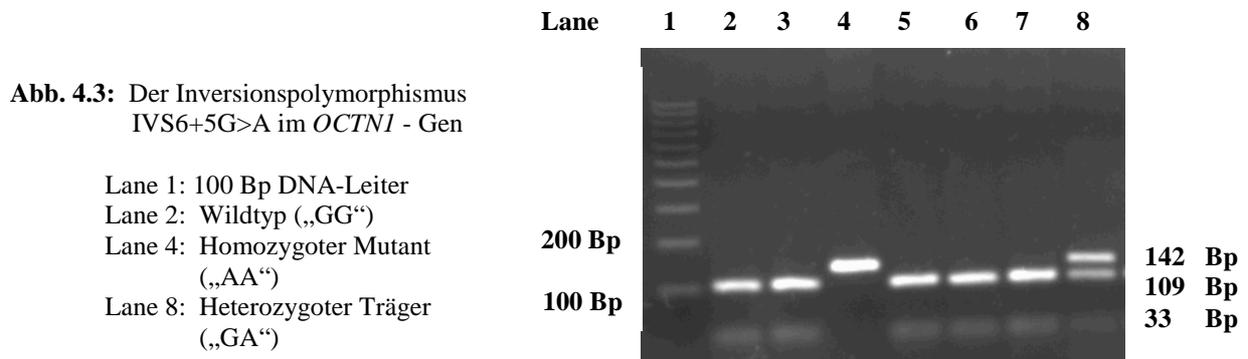
Ein signifikant gehäuftes Vorkommen des Polymorphismus konnte auch für Patienten mit M. Crohn nicht nachgewiesen werden. Der Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen zwischen den Patientengruppen ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

#### 4.2.3 Der Inversionspolymorphismus IVS6+5G>A im *SLC22A4* -Gen (*OCTN1*)

Der dritte in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus ist ein Inversionspolymorphismus. Der geninterne Austausch (Inversion) einer Base wurde mittels PCR mit anschließendem Restriktionsverdau nachgewiesen. Hierfür wurde zunächst ein 142 Bp langes Amplifikat hergestellt.

Das Restriktionsenzym *Rsa I* konnte im Falle des Wildtyps („GG“) das Gen entsprechend schneiden. Es resultierten zwei Produkte der Längen 109 und 33 Bp. Im Falle der Inversion erfolgte keine Restriktion, was im Falle des homozygoten Mutationsträgers („AA“) zu einem

unverdauten Fragment mit 142 Bp Länge führte. Entsprechend wurde der heterozygote Träger („GA“) zu drei Produkten à 142, 109 und 33 Bp Länge verdaut (s. Abb. 4.3).



Allel- und Genotypenfrequenzen für diesen Polymorphismus stellt Tabelle 4.3 dar. Analog zu den anderen Polymorphismen wurden die Frequenzen der Patientengruppe jeweils mit denen der Kontrollgruppe verglichen und mittels  $\chi^2$ -Test ausgewertet.

	Allelfrequenzen		Genotypfrequenzen		
	G	A	GG	GA	AA
<b>M. Crohn</b> (n = 580)	1087 (93,7%)	73 (6,3%) p= n.s.	509 (87,8%) p= n.s.	69 (11,9%) p= n.s.	2 (0,3%) p= n.s.
<b>Colitis ulcerosa</b> (n = 335)	620 (92,5%)	50 (7,5%) p= n.s.	287 (85,7%) p= n.s.	46 (13,7%) p= n.s.	2 (0,6%) p= n.s.
<b>Kontrollgruppe</b> (n = 968)	1782 (92,0%)	154 (8,0%)	821 (84,8%)	140 (14,5%)	7 (0,7%)

**Tab. 4.3:** Allel- und Genotypfrequenzen Polymorphismus IVS6+5G>A im *OCTN1*-Gen in der Studienpopulation. Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur jeweils für Patientengruppe vs. Kontrollgruppe. (\*n.s. = nicht signifikant)

Von den drei untersuchten Polymorphismen war die Frequenz der homozygoten A-Träger („AA“) hier insgesamt am niedrigsten. Sowohl für den homozygoten als auch für die heterozygoten Träger der Inversion konnten keine signifikanten Frequenzunterschiede berechnet werden. Auch die Allelhäufigkeiten zeigten innerhalb der untersuchten Kontroll- und Patientengruppen bzw. zwischen den zwei Patientengruppen keine signifikanten

Unterschiede. Eine direkte Assoziation des Polymorphismus mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen konnte also nicht nachgewiesen werden.

### **4.3 Genotyp-Phänotyp-Interaktionen der getesteten Polymorphismen bei Patienten mit M. Crohn**

Ein direkter kausaler Zusammenhang in Bezug auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen konnte für die hier untersuchten *OCTN*-Varianten nicht festgestellt werden.

Der heutige Kenntnisstand geht von einer multifaktoriellen Genese der Erkrankungen aus. Das Entstehen der Erkrankungen scheint in genetisch vorbelasteten Individuen durch multiple Umweltfaktoren beeinflusst zu werden (s. auch 1.2). Das Zusammenspiel vieler Gene scheint jedoch nicht nur auf die Ätiologie sondern auch auf den klinischen Verlauf, besonders des M. Crohn, Einfluss zu nehmen. In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit M. Crohn auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation hin untersucht, um eine mögliche Auswirkung der untersuchten Polymorphismen in den *OCTN*-Genen auf die klinische Präsentation der Erkrankung zu beweisen.

Die klinischen Subgruppen bei M. Crohn Patienten sind in Tab. 4.4 dargestellt. Die klinischen Daten wurden den Krankenakten der Patienten entnommen.

	<b>Patientengruppe „M. Crohn“</b>
<b>Patientenzahl</b>	606
<b>Altersschnitt (Median)</b>	36
<b>Isolierter Dünndarmbefall</b>	53 (N= 414) 12,8%
<b>Isolierter Dickdarmbefall</b>	59 (N= 414) 14,2%
<b>Dünn- und Dickdarmbefall</b>	302 (N= 414) 72,9%
<b>Fistel positiv</b>	223 (N= 412) 54,1%
<b>Fistel negativ</b>	189 (N= 412) 45,8%
<b>Stenose positiv</b>	261 (N= 413) 63,1%
<b>Stenose negativ</b>	152 (N= 413) 36,8%
<b>Inflammatorischer Subtyp</b>	95 (N= 411) 23,1%
<b>Nicht-inflammatorischer Subtyp</b>	316 (N= 411) 76,8%
<b>Ileozökalsektion positiv</b>	136 (N= 338) 40,2%
<b>Ileozökalsektion negativ</b>	202 (N= 338) 59,7%

**Tab. 4.4:** Klinische Subgruppen der untersuchten Patienten mit M. Crohn (Repräsentativ für *OCTN1 C917T*)

Zunächst wurde ein möglicher Einfluss von *OCTN*-Varianten auf das Befallsmuster untersucht, indem die Patienten in drei Gruppen aufgeteilt wurden (isolierter Dünndarmbefall, isolierter Dickdarmbefall, und kombinierter Dünn- und Dickdarmbefall). Hierbei zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluss des Genotyps aller drei untersuchter Polymorphismen auf das Befallsmuster.

Gleiches gilt für den inflammatorischen (keine Stenosen- und Fistelbildung) bzw. fistulierenden und stenosierenden Subtyp des M. Crohn. Für keinen der drei hier untersuchten Polymorphismen konnte eine signifikante Assoziation hergestellt werden.

Eine isolierte Unterscheidung zwischen Fistel positiven und Fistel negativen Patienten war ebenfalls vollkommen unabhängig vom Genotyp der hier bestimmten Polymorphismen.

Im Gegensatz dazu scheinen homozygote Träger der C917T-Variante im *OCTNI*-Gen ein erniedrigtes Risiko für die Bildung von Stenosen zu haben. Patienten ohne Stenosen waren signifikant häufiger homozygote Träger des T-Allels als Patienten mit Stenosen (**p=0,023**). Die Frequenzunterschiede des Carrier-Status waren bei „Stenose positiven“ Patienten im Vergleich zu „Stenose negativen“ Patienten nicht signifikant (60,9% vs. 61,1%; p=1,000). Die einzelnen Frequenzen des Genotyps samt p-Werten ( $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur) sind der Tabelle 4.5 zu entnehmen.

	<i>OCTNI</i> C917T			Gesamt
	CC	CT	TT	
<b>Stenose positiv</b>	102 (39,1%) P=n.s.*	130 (49,8%) p=n.s.	29 (11,1%) <b>P=0,023</b>	261
<b>Stenose negativ</b>	59 (38,8%)	63 (41,4%)	30 (19,7%)	152

**Tab. 4.5:** Genotyp-Phänotyp-Kreuztabelle für *OCTNI* C917T bei M. Crohn, bezogen auf Patienten mit Stenose und ohne Stenose. Die p-Werte wurden mittels  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur ermittelt. (\*n.s. = nicht signifikant)

Um den Verlauf der Erkrankung aus chirurgischer Sicht zu objektivieren, wurde der genetische Einfluss der Polymorphismen in den *OCTN*-Genen auf die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention in Form einer Ileozökalresektion untersucht. Die homozygoten Träger der Mutationen (C917T, C1721T, IVS6+5G>A) wurden nicht signifikant häufiger operiert.

Im Falle der heterozygoten Träger der *OCTNI* C917T-Mutation war dies anders. Die Häufigkeit des T-Allels in der Gruppe der operierten Patienten war signifikant höher als bei den nicht operierten (**p=0,040**). Auch die Frequenz des T-Carrier-Genotyps heterozygoter sowie homozygoter Träger (CT und TT) war unter den operierten Patienten höher (69,8% vs 55,5%; **p=0,011**) (s. Tabelle 4.6).

	Allelfrequenzen (C917T)		Genotypfrequenzen (C917T)		
	C	T	CC	CT	TT
<b>Ileozökalresektion positiv</b> (n = 136)	157 (57,7%)	115 (42,3%) <i>p=0,040</i>	41 (30,1%) <i>p=0,011</i>	75 (55,1%) <i>p=0,03</i>	20 (14,7%) p=n.s.*
<b>Ileozökalresektion negativ</b> (n = 202)	266 (65,8%)	138 (34,2%)	90 (44,6%)	86 (42,6%)	26 (12,9%)

**Tab. 4.6:** Allel- und Genotypfrequenzen bei Ileozökalresizierten und nicht-resizierten Patienten mit M. Crohn bezogen auf den Polymorphismus *OCTN1* C917T. (\*n.s. = nicht signifikant)

Nach Stratifizierung der Patienten nach Alter bei Erstdiagnose (<40 Jahre bzw. >40 Jahre) gemäß der Vienna Klassifikation konnte kein signifikanter Einfluss der *OCTN*-Varianten auf das Alter bei Ausbruch des M. Crohn beobachtet werden.

Wenn also auch keine direkte Assoziation der drei untersuchten Polymorphismen in den *OCTN1/2*-Genen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen per se hergestellt werden konnte, lässt sich doch ein modulierender Einfluss einer dieser drei Polymorphismen (*OCTN1* C917T) auf den klinischen Verlauf der Erkrankung nicht ausschließen. Homozygote Träger dieser Mutation haben im Verlauf ein signifikant selteneres Auftreten von Stenosen. Die ileozökale Resektion ist bei heterozygoten Trägern dieser Mutation signifikant häufiger als beim Wildtyp bzw. homozygoten Mutationsträgern.

Da es sich jedoch nicht um statistisch hoch signifikante Unterschiede handelt, ist eher ein niedriger Einfluß anzunehmen.

#### **4.4 Interaktionen zwischen den hier untersuchten Mutationen in *OCTN1/2* und anderen, mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Genvarianten**

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen sind potentiell funktionell relevante Mutationen in den *OCTN*-Genen. Eine direkte Assoziation mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen konnte für keinen der drei hier untersuchten Polymorphismen hergestellt werden. Im Folgenden soll jedoch eine mögliche Interaktion dieser Mutationen mit anderen beschriebenen ätiologisch relevanten Genen untersucht werden.

Diese sind zum einen der von Peltekova und Mitarbeiter beschriebene *OCTN*-TC-Haplotyp (*OCTN1* C1672T, *OCTN2* G207C), sowie die drei direkt mit dem M. Crohn assoziierten Mutationen im *NOD2/CARD15* Gen [C2104T (Arg702Trp), G2722C (Gly908Arg), 3020insC (Leu1007fsinsC)]. Abschließend wurde auf eine mögliche Abhängigkeit vom *IBD5*-Risikohaplotyp (mittels dem „haplotype-tagging“ SNP-Marker IGR2078a\_1) hin untersucht. Alle erwähnten Genotypisierungen wurden bereits in Vorarbeiten geleistet.

#### **4.4.1 Interaktion mit dem vorbekannten *OCTN1* C1672T / *OCTN2* G207C Risikohaplotyp**

Die in vorliegender Arbeit untersuchten Polymorphismen der *OCTN*-Gene haben allesamt potentiell relevante Auswirkungen auf die Funktion dieser Proteine. Dies wurde jedoch bisher noch nicht *in vitro* nachgewiesen. Peltekova und Mitarbeiter konnten jedoch einen *OCTN1/2*-Risikohaplotyp bestimmen, der direkt mit M. Crohn assoziiert ist (Peltekova 2004). Beide Varianten führten *in vitro* jedoch zu einer Funktionseinschränkung. Für alle drei in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen (*OCTN1* C917T, *OCTN2* C1721T, *OCTN1* IVS6+5G>A) ergab sich jedoch keine signifikante Interaktion mit dem von Peltekova und Mitarbeitern beschriebenen *OCTN1/2* Risikohaplotyp (s. Tab. 4.7 und 4.8).

Polymorphismus	Genotyp	<i>OCTN1 C1627T</i>	
		Träger des T-Allels	Wildtyp
<i>OCTN1 C917T</i>	CC	163 (p=n.s.*)	69
	CT	197	77
	TT	56 (p=n.s.)	31
<i>OCTN2 C1721T</i>	CC	315 (p=n.s.)	133
	CT	90	38
	TT	5 (p=n.s.)	3
<i>OCTN1 IVS5+6G&gt;A</i>	GG	354 (p=n.s.)	146
	GA	41	25
	AA	1 (p=n.s.)	0

**Tab. 4.7:** Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen bezogen auf den von Peltekova und Mitarbeitern beschriebenen *OCTN1 C1627T* Polymorphismus. Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur jeweils für Träger vom Risikoallel vs. Wildtyp für C1627T. (\*n.s. = nicht signifikant)

Polymorphismus	Genotyp	<i>OCTN2 G207C</i>	
		Träger des C-Allels	Wildtyp
<i>OCTN1 C917T</i>	CC	179 (p=n.s.*)	53
	CT	204	70
	TT	58 (p=n.s.)	29
<i>OCTN2 C1721T</i>	CC	303 (p=n.s.)	115
	CT	96	32
	TT	6 (p=n.s.)	2
<i>OCTN1 IVS5+6G&gt;A</i>	GG	376 (p=n.s.)	124
	GA	43	23
	AA	1 (p=n.s.)	0

**Tab. 4.8:** Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen bezogen auf den von Peltekova und Mitarbeitern beschriebenen *OCTN2 G207C* Polymorphismus. Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur jeweils für Träger vom Risikoallel vs. Wildtyp für G207C. (\*n.s. = nicht signifikant)

#### 4.4.2 Interaktion mit dem *IBD5*-Risikohaplotyp

Der von Rioux und Mitarbeitern beschriebene *IBD5*-Bereich auf Chromosom 5 ist direkt mit dem M. Crohn assoziiert und beinhaltet unter anderem auch die *OCTN1* und *OCTN2* Gene. Ein ca. 250kb Länge messender Abschnitt im *IBD5*-Bereich ist besonders stark mit dem M. Crohn assoziiert und trägt mehrere repräsentative Einzelnukleotidpolymorphismen. Um eine Abhängigkeit der hier untersuchten *OCTN*-Polymorphismen vom *IBD5*-Risikohaplotyp zu bestimmen, wurde für alle Patienten repräsentativ der Genotyp des haplotype-tagging Polymorphismus IGR2078a\_1 bestimmt. Träger des risikoassoziierten Allels „A“ haben ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung des M. Crohn.

Die Patienten wurden nach Allelträgern und nicht-Trägern stratifiziert. Es ergab sich für keinen der untersuchten *OCTN*-Polymorphismen eine signifikante Assoziation mit dem *IBD5*-Risikohaplotyp, bzw. dessen Marker IGR2078a\_1 (s. Tab 4.9).

Polymorphismus	Genotyp	<i>IBD5</i> IGR2078a_1	
		Allelträger	Wildtyp
<i>OCTN1</i> C917T	CC	154 (p=n.s.*)	68
	CT	191	76
	TT	51 (p=n.s.)	34
<i>OCTN2</i> C1721T	CC	302 (p=n.s.)	132
	CT	84	40
	TT	3 (p=n.s.)	4
<i>OCTN1</i> IVS5+6G>A	GG	334 (p=n.s.)	150
	GA	40	24
	AA	1 (p=n.s.)	0

**Tab. 4.9:** Allel- und Genotypfrequenzen der untersuchten Polymorphismen bezogen auf den *IBD5* „haplotype-tagging“- Polymorphismus (IGR2078a\_1). Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur jeweils für Träger vom Risikoallel vs. Wildtyp für IGR2078a\_1. (\*n.s. = nicht signifikant)

#### 4.4.3 Interaktion der untersuchten *OCTN*-Polymorphismen mit *NOD2/CARD15*-Mutationen bei M. Crohn Patienten

Alle Patienten aus der Gruppe „M. Crohn“ wurden zusätzlich auf eine mögliche Korrelation der untersuchten *OCTN*-Mutationen mit dem *NOD2/CARD15*-Gen untersucht. Das *NOD2/CARD15*-Gen war das erste, das direkt mit M. Crohn assoziiert wurde. Die drei Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen [C2104T (Arg702Trp), G2722C (Gly908Arg), 3020insC (Leu1007fsinsC)] sind jeweils unabhängig mit dem M. Crohn assoziiert. Der Genotyp der Patienten für die drei Mutationen wurde bereits in Vorgängerarbeiten bestimmt.

Es wurden die Genotypen der *OCTN*- und *NOD2/CARD15*-Gene der Studienpopulation verglichen, um eine mögliche Interaktion nachzuweisen. Hierfür wurde die Häufigkeit der Polymorphismen in den *OCTN*-Genen in Abhängigkeit von Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen untersucht. Die folgenden drei Tabellen zeigen die statistische Auswertung. Bei keinem der Polymorphismen konnte eine Assoziation mit einer der *NOD2*-Mutationen festgestellt werden.

	Genotypfrequenzen <i>OCTN1</i> (C917T)		
	CC	CT	TT
<b><i>NOD2/CARD15</i> Wildtyp (n=369)</b>	143 (38,8%)	171 (46,3%)	55 (14,9%)
<b><i>NOD2/CARD15</i> Mutiert (n = 233)</b>	92 (39,5%) p=n.s.*	108 (46,4%) p=n.s.	33 (14,2%) p=n.s.

**Tab. 4.10:** Verteilung der Genotypen für den C917T-Polymorphismus im *OCTN1*-Gen in Abhängigkeit vom *NOD2/CARD15* Status. Die M. Crohn Patienten wurden in Abhängigkeit vom *NOD2/CARD15*-Genotyp in *NOD2/CARD15*-Wildtyp Patienten (keine *NOD2/CARD15*-Mutation vorhanden) und *NOD2/CARD15*-Mutiert (Patienten mit mindestens einem mutierten *NOD2/CARD15*-Allel) unterteilt. Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur.

(\*n.s. = nicht signifikant)

	<b>Genotypfrequenzen (C1721T)</b>		
	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
<b><i>NOD2/CARD15</i> Wildtyp (n=365)</b>	286 (78,4%)	75 (20,5%)	4 (1,1%)
<b><i>NOD2/CARD15</i> Mutiert (n = 228)</b>	170 (74,6%) P=n.s.*	53 (23,2%) p=n.s.	5 (2,2%) p=n.s.

**Tab. 4.11:** Verteilung der Genotypen für den C1721T-Polymorphismus im *OCTN2*-Gen in Abhängigkeit vom *NOD2/CARD15* Status. Die M. Crohn Patienten wurden in Abhängigkeit vom *NOD2/CARD15*-Genotyp in *NOD2/CARD15*-Wildtyp Patienten (keine *NOD2/CARD15*-Mutation vorhanden) und *NOD2/CARD15*-Mutiert (Patienten mit mindestens einem mutierten *NOD2/CARD15*-Allel) unterteilt. Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur.

(\*n.s. = nicht signifikant)

	<b>Genotypfrequenzen (IVS6+5G&gt;A)</b>		
	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>
<b><i>NOD2</i> Wildtyp (n=355)</b>	306 (86,2%)	49 (13,8%)	0 (0,0%)
<b><i>NOD2</i> Mutiert (n = 221)</b>	201 (91,0%) p=n.s.*	19 (8,6%) p=n.s.	1 (0,5%) p=n.s.

**Tab. 4.12:** Verteilung der Genotypen für den IVS6+5G<A-Polymorphismus im *OCTN1*-Gen in Abhängigkeit vom *NOD2/CARD15* Status. Die M. Crohn Patienten wurden in Abhängigkeit vom *NOD2/CARD15*-Genotyp in *NOD2/CARD15*-Wildtyp Patienten (keine *NOD2/CARD15*-Mutation vorhanden) und *NOD2/CARD15*-Mutiert (Patienten mit mindestens einem mutierten *NOD2/CARD15*-Allel) unterteilt. Die statistische Auswertung erfolgte durch  $\chi^2$ -Test mit Yates-Korrektur.

(\*n.s. = nicht signifikant)

Insgesamt waren 233 der 602 M. Crohn Patienten (38,7%) Träger von mindestens einer der drei bekannten Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen. Davon waren 168 Patienten (27,9%) einfach heterozygote Mutationsträger (sog. „single-dose Mutation“), 65 Patienten waren Träger von Mutationen auf beiden Allelen („double-dose Mutation“: homozygote Träger

einer der drei Mutationen oder compound-heterozygote), während 369 Patienten (61,3%) homozygote Träger des Wildtyps in *NOD2/CARD15* waren.

Abhängig vom Genotyp der drei untersuchten *OCTN*-Polymorphismen konnte auch nach Stratifizierung der Patienten nach “single-dose“ bzw. „double-dose“ Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen kein signifikanter Zusammenhang zwischen den *OCTN*-Polymorphismen und *NOD2/CARD15*-Mutationen erkannt werden.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Aufbau der Studie**

#### **5.1.1 Genetische Assoziationsstudien**

Ziel der vorgestellten Arbeit war es, eine mögliche Assoziation zwischen ausgewählten Einzelnukleotidpolymorphismen in ätiologisch potentiell relevanten Genen und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen festzustellen. Eine eindeutige Zuordnung eines krankheitsverursachenden Gens ist bei multifaktoriellen Erkrankungen wie im Falle des M. Crohn bzw. der Colitis ulcerosa erschwert. Das Zusammenspiel mehrerer äußerer Einflussfaktoren mit einer genetischen Prädisposition in der Entstehung der Erkrankung erschwert eine eindeutig ursächliche genetische Zuordnung.

Die Fall-Kontroll-Assoziationsstudie, um die es sich bei der hier vorgestellten Arbeit handelt stellt einen Ansatz für die Identifizierung krankheitsrelevanter Gene bei multifaktoriellen Erkrankungen. Fall-Kontroll-Assoziationsstudien vergleichen die Allel- und Genotypenfrequenzen bestimmter genetischer Varianten in einer Patientengruppe mit denen einer gesunden Kontrollgruppe. Nach entsprechender statistischer Auswertung kann so ein signifikant häufigeres Auftreten der Einzelnukleotidpolymorphismen in einer Patientengruppe festgestellt werden, was eine mögliche ätiologische Rolle des untersuchten Gens nahe legt (Podolsky 2002, Bonen 2003).

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP = single nucleotide polymorphism) machen einen großen Teil der genetischen Variabilität der menschlichen DNA aus. Bei Einzelnukleotidpolymorphismen unterscheiden sich Nukleotidpositionen durch einzelne Basen. In aller Regel sind sie bi-allelisch, d.h. es gibt zwei mögliche Allele. Die Häufigkeit von Polymorphismen unterscheidet sich in Abhängigkeit von Genabschnitt und ethnischer Zugehörigkeit, wobei definitionsgemäß die Frequenz des seltenen Allels mindestens 1% in der entsprechenden Bevölkerung ausmacht. Auch wenn sich die Dichte der einzelnen Polymorphismen stark unterscheidet, ist die weltweite Frequenz konstant mit ca. 1 SNP pro 200-600 Basenpaaren (Tsalenko 2003).

Die Auswirkungen von SNPs richten sich besonders nach deren Lokalisation, die entweder im kodierenden oder im nicht-kodierenden Abschnitt eines Gens sein kann. Für die Untersuchung in Assoziationsstudien eignen sich SNPs in der Promotorregion eines Proteins (auch wenn dies ein nicht-kodierender Abschnitt des Gens ist), aber auch SNPs im

kodierenden Abschnitt eines Gens. Letztere können durch Veränderungen der Basensequenz die Struktur und Funktion des resultierenden Proteins beeinflussen (Chakravarti 2001). Häufig können aufgrund von regionalen Kopplungsungleichgewichten einzelne SNPs repräsentativ für einen ganzen Genabschnitt selektiert werden, sog. „haplotype-tagging SNPs“ (Saccone 2006).

Genetische Assoziationsstudien bieten einen systematischen Ansatz, um den Einfluss einzelner genetischer Variationen auf die Entstehung einer Krankheit zu untersuchen. Ein gehöriger Nachteil dieser Studien ist jedoch die häufig mangelnde Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Deshalb sollten einzelne, von anderen nicht bestätigte Ergebnisse in diesen Studien stets kritisch betrachtet werden (Hirschhorn 2002).

Die Ursache der mangelnden Reproduzierbarkeit ist auf viele verschiedene Faktoren zurückzuführen. Zum einen spielt die ethnische Zusammensetzung der Studienpopulation eine große Rolle. Die Allel-Heterogenität zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen bewirkt nicht nur eine variierende Häufigkeit bestimmter SNPs abhängig von der Herkunft des Probanden. Auch können verschiedene Mutationen je nach Herkunft eine unterschiedliche Auswirkung haben, da sie durch z.B. regional verschiedene Umweltfaktoren anderweitig beeinflusst werden. Ein zusätzlicher Faktor ist das Kopplungsungleichgewicht. Hierbei werden nicht Assoziationen für die eigentliche kausale Mutation hergestellt, sondern lediglich für Mutationen in deren Nachbarschaft, die jedoch gekoppelt vererbt werden. Falsch-positive Ergebnisse entstehen auch, wenn zu geringe Fallzahlen, besonders bei der Kontrollgruppe verwendet werden (Schreiber 2002, Colhoun 2003, Lohmueller 2003).

Entsprechend groß sollte dementsprechend die Studienpopulation gewählt werden, zum einen, um schwache Assoziationen erkennen zu können, zum anderen im Falle von sehr seltenen Allelen (Lohmueller 2003). Besonders die Kontrollpopulation sollte in etwa doppelt so groß sein wie die Patientengruppen. Auch die Verteilung auf Untergruppen sollte nach einheitlichen Kriterien geschehen und die genetische Typisierung mit gleichen Verfahren erfolgen (Übersicht in Colhoun 2003).

Die in der Kontrollbevölkerung beobachteten Genotypfrequenzen müssen, entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, mit den erwarteten Häufigkeiten verglichen werden und übereinstimmen (Mathew 2004).

Wenn es um die Reproduzierbarkeit einzelner Studien geht, muss auf ähnliche Zusammensetzung der Studienpopulation bzgl. Anzahl, Geschlechterverhältnis und ethnischer Herkunft in der Folgestudie geachtet werden.

Die in der vorliegenden Assoziationsstudie untersuchten Gene (*SCL22A4*, *SCL22A5*) liegen in der *IBD5*-Region auf Chromosom 5 (s. auch 1.3.3), und wurden auf eine Assoziation mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hin untersucht. Sie kodieren für die organischen transmembranösen Kationentransporter *OCTN1* und *OCTN2*. Diese überwiegend in den Nieren vorkommenden Proteine steuern insbesondere den Transport von Carnitin in menschliche Zellen. Bisher konnte ein TC-Risikohaplotyp zweier SNPs in den *OCTN*-Genen mit M. Crohn assoziiert werden (Peltekova 2004).

Weitere in diesen Genen befindliche SNPs wurden im Folgejahr beschrieben und sind möglicherweise funktionell relevant (Urban 2005). Drei dieser SNPs kommen auch bei der kaukasischen Bevölkerung vor und wurden in dieser Arbeit untersucht. Einer dieser SNPs, der C917T (T306I), führt als kodierender SNP im *OCTN1*-Gen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz. Ein weiterer (C1721) befindet sich in der 3'-Region des nicht-translatierten Abschnittes des *OCTN2*-Gens auf dem *IBD5*-Risikohaplotyp. Der untersuchte Inversionspolymorphismus IVS6+5G>A bewirkt eine Unterbrechung eines interagierenden Spliceodes im *OCTN1*-Gen (Urban 2005).

Die gesamte Studienpopulation war kaukasischer Herkunft. Anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien konnte für die Patientengruppen jeweils eindeutig die Diagnose eines M. Crohn oder einer Colitis ulcerosa gestellt werden.

Alle drei Polymorphismen standen in einem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, was systematische Fehler bei der Wahl der Studienpopulation und der Typisierung unwahrscheinlich macht.

### **5.1.2 Genetische Typisierung**

Die in vorliegender Arbeit untersuchten Polymorphismen wurden mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) – Analyse genotypisiert. Hierbei wird zunächst anhand der Polymerasekettenreaktion (PCR) eine spezifische DNA-Sequenz amplifiziert und anschließend durch Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Abschnitte der DNA, die möglichst den gesuchten Polymorphismus beinhalten. Liegt die Erkennungssequenz vor, wie im Falle des Wildtyps, wird das PCR-Produkt geschnitten. Im Falle der Mutation entfällt es.

Dieses Verfahren zur Genotypisierung ist generell sehr zuverlässig, da sowohl die benutzten Primer als auch Endonukleasen definierte DNA-Abschnitte sehr spezifisch erkennen. Des Weiteren wurde für alle untersuchten Polymorphismen jeder der jeweils möglichen Genotypen

stichprobenartig mittels Sequenzierung bestätigt. Fehler bei der Genotypisierung sind somit nicht anzunehmen.

Hinzu kommt, dass die beobachteten Allelfrequenzen in vorliegender Arbeit mit denen von Urban und Mitarbeitern (Urban 2005) beobachteten Allelfrequenzen weitgehend übereinstimmen (s. auch 5.2.1).

## 5.2 Genetische Bewertung der Ergebnisse

### 5.2.1 Vergleich der beobachteten Allelfrequenzen mit denen in anderen Studien ermittelten Frequenzen

Für die Validität der Ergebnisse einer genetischen Assoziationsstudie ist die korrekte Wahl einer Studienpopulation wichtig. Besonders wichtig hierfür ist das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Ein weiterer Anhaltspunkt für die Repräsentativität der Ergebnisse ist ebenfalls die Vergleichbarkeit der beobachteten Allelfrequenzen mit denen von anderen Studien. Die Studienbevölkerung anderer Studien sollte jedoch eine weitgehend identische ethnische Zusammensetzung haben. Die in vorliegender Studie untersuchten Polymorphismen in den *OCTN*-Genen wurden erstmals von Urban und Mitarbeitern (Urban 2005) beschrieben. Hierbei zeigten sich verschiedene Allelfrequenzen für die Mutationen, abhängig von der Abstammung der Individuen. Die beobachteten Allelfrequenzen in vorliegender Arbeit stimmten mit denen von Urban und Mitarbeitern beobachteten Allelfrequenzen weitgehend überein (s. Tab. 5.1).

Untersucher Polymorphismus	Allelfrequenz der Mutation in der eigenen Kontrollgruppe in % (n=991)	Allelfrequenzen aus Urban (2005) in % n=80	Herkunft der Individuen
<i>OCTN1</i> C917T	38,4	33,8	EA*
<i>OCTN2</i> C1721T	8	9,4	EA*
<i>OCTN1</i> IVS6+5G>A	8	5,6	EA*

**Tab. 5.1:** Vergleich der Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen mit den Daten von Urban und Mitarbeitern (Urban 2005); \*EA=“European American“.

Alle Individuen der eigenen Kontrollpopulation kamen aus dem süddeutschen Raum und sind somit am ehesten mit der „European-American“ Population von Urban und Mitarbeitern

vergleichbar (s. Tab. 5.1). Die leicht voneinander abweichenden Frequenzen (bis zu 4,6% für *OCTN1* C917T) werden allerdings durch den geringen Umfang der ursprünglichen Studie im Vergleich zu unserer Kontrollpopulation relativiert (n=991 vs. n=80).

Andere Vergleichspopulationen sind für die hier untersuchten Polymorphismen bisher noch nicht in der Literatur erhältlich.

### **5.2.2 Frequenz der untersuchten Polymorphismen bei M. Crohn und Colitis ulcerosa und mögliche Interaktionen mit dem vorbekannten *OCTN1* C1672T / *OCTN2* G207C Risikohaplotyp**

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymorphismen der *OCTN1/2*-Gene konnten in keinem der Fälle mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung assoziiert werden. Der Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen konnte jeweils keine statistisch signifikante Assoziation feststellen. Somit scheinen die hier untersuchten Polymorphismen keinen Einfluss auf die Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen zu haben. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen den hier untersuchten Mutationen und dem von Peltekova (Peltekova 2004) beschriebenen TC-Risikohaplotyp (C1672T *OCTN1*, G207C *OCTN2*) hergestellt werden.

Peltekova und Mitarbeiter haben zwei Polymorphismen der *OCTN*-Gene beschrieben, die sowohl einzeln als auch als Diplotyp direkt mit dem M. Crohn assoziiert waren (Peltekova 2004). Zusätzlich konnten die Autoren zeigen, dass durch die erkannten Mutationen die Funktion der Proteine *in vitro* beeinträchtigt war (s. auch 1.3.3.1). Diese Erkenntnisse ließen die Autoren auf eine tragende Rolle der Polymorphismen in den *OCTN*-Genen schließen. Die Assoziation wurde in zahlreichen Folgestudien bestätigt (Cucchiara 2007, Newman 2005). In einer spanischen Studienpopulation konnten die einzelnen Mutationen selber nicht mit M. Crohn assoziiert werden, der TC-Haplotyp kam jedoch gehäuft bei dieser Erkrankung vor (Martinez 2006). Ähnlich war es in einer neuseeländischen Studie, in der lediglich für den C1672T Polymorphismus eine statistisch signifikante Korrelation zu M. Crohn hergestellt werden konnte, jedoch nicht für die G207C Mutation. Der TC-Haplotyp an sich war jedoch in der M. Crohn Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wieder signifikant gehäuft (Leung 2006).

Trotz gleichen ethnischen Hintergrundes wie in der ursprünglichen Arbeit von Peltekova, konnten manche Arbeitsgruppen eine unabhängige Assoziation des TC-Haplotyp mit M. Crohn in ihren Studien nicht feststellen (Noble 2005, Fisher 2006, Cucchiara 2007). Eine

Korrelation des TC-Haplotyp mit M. Crohn war im Falle einer ungarischen Studie nicht nachweisbar (Bene 2007). Eine japanische Studie konnte den TC-Haplotyp in ihrer Studienpopulation gar nicht erst nachweisen (Yamazaki 2004). Eine große belgischen Studie (769 M. Crohn Patienten vs. 1051 Kontrollen) stellte keine ursächliche Rolle für den TC-Haplotyp fest. Allerdings hatte der TC-Haplotyp Auswirkungen auf die phänotypische Präsentation der Erkrankung (Vermeire 2005).

Überraschend waren jedoch die Ergebnisse einer italienischen Studie, bei der zusätzlich zur Assoziation mit M. Crohn der TC-Risikohaplotyp direkt mit pädiatrischen Colitis ulcerosa Patienten in Verbindung gebracht werden konnte (Cucchiara 2007). Ähnliches wurde in einer anderen italienischen Studie bestätigt (Palmieri 2005). Waller und Mitarbeiter konnten eine vom *NOD2/CARD15*- und *IBD5*-Status unabhängige Assoziation des TC-Haplotyp mit Colitis ulcerosa zeigen (Waller 2005). In einer großen britischen Studie konnte ebenfalls unter pädiatrischen Patienten der homozygote TC-Haplotyp bei Colitis ulcerosa Patienten signifikant gehäuft ( $p=0,02$ ) beobachtet werden (Russell 2006). Diese Beobachtung konnte in einem ungarischen Kollektiv nicht bestätigt werden (Magyari 2007).

All diese Ergebnisse stehen zum Teil im Widerspruch zueinander. Eine kausale Rolle der *OCTN*-Gene kann durch sie weder ausgeschlossen noch bewiesen werden. Der überwiegende Teil der Studien allerdings kann eine Assoziation mit dem TC-Haplotyp jedoch in irgendeiner Weise nachweisen – entweder direkt assoziiert (einzeln oder als diplotyp) oder beispielsweise abhängig vom *IBD5*-Risikohaplotyp.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Zusammensetzungen der Studienpopulationen in Bezug auf Herkunft und Anzahl der untersuchten Individuen liegen. Es ist bereits bekannt, dass beispielsweise die Rolle des *IBD5*-Risikohaplotyp in der asiatischen Bevölkerung eine eher untergeordnete Rolle spielt (Tosa 2006, Yamazaki 2004). Dies gilt wie oben beschrieben auch für die *OCTN*-Gene. Insgesamt ist unklar, ob die zwei *OCTN* Polymorphismen die kausale Variante im Bereich des *IBD5*-Locus darstellen.

Um die kausale Rolle der *OCTN*-Gene weiter zu untersuchen, stehen noch viele Folgearbeiten aus. Interessant wäre eine Assoziation von weiteren Polymorphismen in diesen Genen mit M. Crohn insbesondere in Bevölkerungsgruppen mit anderem ethnischen Hintergrund als den der bisher überwiegend untersuchten Kaukasier (Urban 2005). Es sind bereits mehrere Mutationen mit hohen Frequenzen in der asiatischen und schwarzen Bevölkerung bekannt, mitunter zwei der hier untersuchten Polymorphismen (C917T, IVS6+5G>A) (Übersicht in Urban 2005). Könnte in diesen beiden Bevölkerungsgruppen eine Assoziation der *OCTN*-

Gene mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hergestellt werden, würde dies die Hypothese einer kausalen Rolle der *OCTN*-Gene stärken. Denkbar wären beispielsweise ethnische Unterschiede bezüglich der Mutationen. Dabei wären zwar für alle M. Crohn Patienten dieser Welt ursächliche *OCTN*-Mutationen nachweisbar, jedoch in Abhängigkeit von der Abstammung des Patienten.

Welche einzelne Mutation bzw. welche Kombination von Mutationen in den Genen des *IBD5*-Locus letztendlich für die Assoziation verantwortlich ist, muss noch untersucht werden. Erschwert wird diese Forschung durch das starke Kopplungsungleichgewicht des betreffenden Genabschnitts.

Neben genetischen Assoziationsstudien müssen zusätzlich auf molekularbiologischer Ebene die funktionellen Auswirkungen der Mutationen untersucht werden. Bisher konnte zwar für den von Peltekova entdeckten TC-Haplotyp eine Funktionsänderung der *OCTN*-Proteine nachgewiesen werden, jedoch ist noch völlig unklar, wie genau sich dieser Funktionsverlust möglicherweise auf die Entstehung des M. Crohn auswirkt. Vermutet wird, dass unter Carnitinmangel metabolische Stresszustände zu einer gestörten beta-Oxidation der Fettsäuren führen könnten, mit der Folge einer fehlerhaften Entzündungsreaktion im Darm (Peltekova 2004).

Aufgrund dieser Überlegungen wurde in vorliegender Arbeit versucht, drei weitere Mutationen der *OCTN*-Gene mit kaukasischen M. Crohn Patienten in Verbindung zu bringen. Vorher wurde bereits in einer Arbeit aus der eigenen Forschungsgruppe für die gleiche Studienpopulation die Assoziation des TC-Haplotyp bestätigt (Török 2005).

Da sich jedoch in der hier vorgestellten Studie keine Assoziation der untersuchten Polymorphismen mit M. Crohn zeigte, kann die Vermutung einer kausalen Rolle in vorliegender Studie nicht bestätigt oder gar erhärtet werden.

Von einer ausreichenden Validität ist in vorliegender Arbeit auszugehen, was das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die Studiengröße, die Genotypisierungsmethode und die statistische Auswertung betrifft. Jedoch sollten wie unter 5.1.1 erläutert Ergebnisse der hier durchgeführten Assoziationsstudie in mindestens einer weiteren vergleichbaren Arbeit bestätigt werden, bevor endgültige Schlüsse gezogen werden können.

### 5.2.3 Mögliche Interaktion der untersuchten Polymorphismen mit dem *IBD5*-Risikohaplotyp

Rioux und Mitarbeiter konnten im Jahre 2000 einen auf Chromosom 5q31 gelegenen Abschnitt – den sog. *IBD5*-Locus – direkt mit M. Crohn assoziieren (s. auch 1.3.3). Dieser Abschnitt beinhaltet auch Gene, welche für mehrere Interleukine kodieren, die in der Immunphysiologie des Organismus eine wichtige Rolle spielen (Rioux 2000). Nach genetischer Feinkartierung konnte diese Region auf Chromosom 5 auf einen 250kB messenden Abschnitt eingegrenzt werden, welcher aus Haplotypblöcken mit wenig genetischer Variabilität besteht. Hier wurde ein Risikohaplotyp definiert, welcher mit M. Crohn assoziiert ist. Ferner konnten auf diesem Abschnitt 11 spezifische „haplotype-tagging“ Polymorphismen identifiziert werden (Rioux 2001, Daly 2001). Die Identifizierung der kausalen Variante, welche für die Assoziation mit M. Crohn verantwortlich ist, war bisher aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichtes nicht möglich.

Die in vorliegender Arbeit untersuchten *OCTN*-Polymorphismen wurden auf eine mögliche Interaktion mit dem *IBD5*-Risikohaplotyp untersucht. Als repräsentativer „haplotype-tagging SNP“ des *IBD5*-Locus wurde der IGR2078a\_1-Marker verwendet. Jedes Individuum in der Studienpopulation wurde auch hierfür bereits in Vorgängerarbeiten genotypisiert. Dieser IGR2078a\_1- SNP führt zu einer Basensubstitution G>A, jedoch ohne bisher bekannte funktionelle Auswirkungen.

Für keinen der drei hier untersuchten Polymorphismen konnte eine Interaktion mit dem *IBD5*-Risikohaplotyp festgestellt werden.

Die Mutation *OCTN1* C917T war deutlich unabhängig vom *IBD5*-Haplotyp ( $p=0,949$  für homo- und heterozygote Allelträger bzw.  $p=0,070$  für homozygote Träger). Ähnlich verhielt es sich für den SNP *OCTN2* C1721T ( $p=0,562$  für homo- und heterozygote Allelträger bzw.  $p=0,279$  für homozygote Träger). Beim IVS6+5G>A SNP war ebenfalls keine Assoziation zu beobachten ( $p=0,41$  für Allelträger generell bzw.  $p=1,00$  für homozygote Mutanten).

Peltekova und Mitarbeiter hatten in ihrer kanadischen Studie erstmals *OCTN*-Polymorphismen mit M. Crohn in Verbindung gebracht. In Abwesenheit des IGR2078a\_1-SNP (*IBD5*) war die Frequenz des *OCTN1/2*-TC-Risikohaplotyp immer noch 53% bei M. Crohn Patienten vs. 23% bei den Kontrollen. Allerdings war in Anwesenheit mindestens einer der drei Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen die Assoziation des TC-Haplotyp mit M. Crohn besonders stark (Peltekova 2004). Die wirkliche Unabhängigkeit des TC-Haplotyp vom *IBD5*-Locus ist jedoch umstritten. Der von Peltekova und Mitarbeitern verwendete Marker

IGR2078a\_1 befindet sich auf dem Haplotyp-Block 4 im Gegensatz zu den *OCTN*-Genen, die sich auf dem Haplotypblock 7 befinden. Sinnvoller wäre es gewesen, einen Marker im Block 7 zu verwenden, um dem Kopplungsungleichgewicht der Region gerecht zu werden (Reinhard 2006, Limbergen 2007). Es wurde auch in vorliegender Arbeit als repräsentativer *IBD5*-Marker der ht-SNP IGR2078a\_1 benutzt. Die unterschiedlichen verwendeten *IBD5*-Marker der Folgestudien könnten also die abweichenden Beobachtungen bzgl. *IBD5*-Abhängigkeit erklären.

Der *IBD5*-Locus konnte bereits in der ursprünglichen Arbeit von Rioux und Mitarbeitern mit einem frühen Krankheitsbeginn des M. Crohn in Verbindung gebracht werden (Rioux 2001). Bestätigt wurde diese Annahme von mehreren Folgestudien (Arumuzzi 2003, Giallourakis 2003, McGovern 2003, Mirza 2003, Negoro 2003, Latiano 2006). Nach Veröffentlichung des *OCTN1/2*-TC-Haplotyp durch Peltekova und Mitarbeiter wurde verstärkt auf eine mögliche Unabhängigkeit vom *IBD5*-Haplotyp geachtet. In Folgearbeiten konnte eine vom *IBD5*-Haplotyp unabhängige Assoziation nicht bestätigt werden (Noble 2005, Russel 2006, Cucchiara 2007), bzw. sie beschrieben eine niedrigere Frequenz des TC-Haplotyp in Abwesenheit von *IBD5*-Risikoallelen (Török 2005). Andere Studien beschrieben eine zusätzliche Verstärkung der *OCTN*-Assoziation in Anwesenheit eines *IBD5*-Risikohaplotyp (Palmieri 2006).

Eine weitaus stärkere Assoziation vom *IBD5*-Marker mit M. Crohn im Vergleich zu den *OCTN*-Polymorphismen wurde von Silverberg und Mitarbeitern beobachtet. Dies galt besonders in der nicht-jüdischen Population. In dieser Studie waren besonders die haplotype-tagging SNPs IGR2096a\_1, IGR2198a\_1 und der von Peltekova beschriebene *OCTN1* C1672T mit M. Crohn assoziiert. Unter der Annahme, dass jeweils einer dieser SNPs allein kausal für M. Crohn sei, ergab die statistische Untersuchung keine weitere Assoziation der anderen untersuchten SNPs (IGR2230a\_1, IGR3178a\_1, *OCTN2* G207C) mit M. Crohn. Somit konnten sie drei SNPs bestimmen, die jeweils alleine kausal für den M. Crohn sein könnten. Dies gilt besonders für IGR2096a\_1 (Silverberg 2007).

Bezogen auf die Colitis ulcerosa konnten Giallourakis und Mitarbeiter eine mögliche Assoziation des *IBD5*-Locus mit Colitis ulcerosa feststellen, besonders in Anwesenheit von *NOD2/CARD15*-Mutationen (Giallourakis 2003). Diese Assoziation mit Colitis ulcerosa wurde allerdings in folgenden Studien nicht bestätigt (Arumuzzi 2003, Negoro 2003, Waller 2005). McGovern und Mitarbeiter konnten jedoch diese Ergebnisse reproduzieren und verstärkten damit wiederum die Annahme, dass eine locus-locus Interaktion von *NOD2/CARD15* und *IBD5* bei Colitis ulcerosa möglich ist (McGovern 2003).

Sowohl die genaue kausale Veränderung im *IBD5*-Locus als auch die Rolle die diese bei der Entstehung des M. Crohn spielt, ist noch unklar. Von einer festen Assoziation mit M. Crohn ist durch die zahlreichen bestätigenden Studien auszugehen. Eine Assoziation der hier untersuchten Polymorphismen in den *OCTN*-Genen konnte weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit des *IBD5*-Risikohaplotyp bei M. Crohn beobachtet werden. Manche Studien beschrieben aber eine verstärkende Interaktion des von Peltekova beschriebenen TC-Haplotyp mit gleichzeitig vorhandenen *NOD2/CARD15*-Mutationen. Insgesamt scheint also alles auf ein Zusammenspiel der *OCTN*-Gene bzw. des *NOD2/CARD15*-Gens und *IBD5* untereinander zu deuten. Die neuesten Erkenntnisse über besonders stark mit M. Crohn assoziierte Mutationen (Silverberg 2007) grenzt die möglichen kausalen Mutationen in ihrem Umfang ein, lässt jedoch immer noch keine genauen Aussagen zu.

#### **5.2.4 Mögliche Interaktion zwischen den untersuchten Polymorphismen und Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen bei M. Crohn**

Hugot und Mitarbeiter entdeckten 1996 als erste eine Kopplungsregion für M. Crohn auf Chromosom 16 (sog. *IBD1*). In dem darin liegenden *NOD2/CARD15*-Gen konnten später drei Mutationen (Arg702Trp, Gly908Arg und Leu1007fsinsC) beschrieben werden, welche mit M. Crohn stark assoziiert sind (Hugot 2001, Ogura 2001). Da es sich bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen um multifaktorielle, polygenetische Erkrankungen handelt, erklären diese drei Mutationen alleine nicht die gesamte genetische Suszeptibilität.

In Bezug auf die *NOD2/CARD15*-Mutationen wurden alle M. Crohn Patienten auf das Vorhandensein einer der drei *NOD2/CARD15*-Hauptmutationen überhaupt, bzw. auf sog. „double-dose“-Mutationen hin stratifiziert. „Double-dose“-Träger sind homozygote Träger einer der drei Mutationen, bzw. compound-heterozygote. Es konnten für M. Crohn Patienten keine signifikanten Interaktionen mit den hier untersuchten *OCTN*-Polymorphismen festgestellt werden.

Die bekannten *NOD2/CARD15*-Mutationen scheinen hier also unabhängig von den untersuchten *OCTN*-Polymorphismen zu wirken. Interessanterweise konnten Peltekova und Mitarbeiter für den von Ihnen beschriebenen *OCTN*-TC-Risikohaplotyp eine besonders starke Assoziation mit M. Crohn in Anwesenheit von *NOD2/CARD15*-Mutationen feststellen (Peltekova 2004, Newman 2005, Török 2005), die jedoch in Folgestudien nicht immer bestätigt werden konnte (Cucchiara 2007, Karban 2007). Auch scheint eine Interaktion des *IBD5*-Risikohaplotyp mit *NOD2/CARD15*-Mutationen bisher nicht genügend bewiesen zu

sein (Giallourakis 2003, Latiano 2006). Ausnahme hierfür ist eine Studie von Mirza und Mitarbeitern, die zeigen konnten, dass in ihrer Studienpopulation der *IBD5*-Risikohaplotyp bei M. Crohn Patienten gehäuft bei gleichzeitigem Vorhandensein von mindestens einer der *NOD2/CARD15*-Mutationen vorkam (Mirza 2003).

Weiterhin konnten McGovern und Mitarbeiter speziell für den Arg702Trp Polymorphismus im *NOD2/CARD15*-Gen eine Assoziation mit Colitis ulcerosa zeigen, wenn auch in Anwesenheit des *IBD5*-Risikohaplotyp (McGovern 2003).

Somit kann man davon ausgehen, dass zumindest die hier untersuchten Polymorphismen, anders als im Falle des von Peltekova und Mitarbeitern beschriebenen *OCTN-TC*-Risikohaplotyp, in keinem Zusammenhang mit vorhandenen *NOD2/CARD15*-Mutationen stehen.

### 5.3 Genotyp-Phänotyp-Assoziationen

Der erste bekannte genetische Risikofaktor bei M. Crohn war das Vorhandensein von *NOD2/CARD15*-Mutationen. Bereits frühe Studien konnten diese Mutationen besonders mit einem ilealen Befall in Verbindung bringen (Ahmad 2002, Cuthbert 2002, Lessage 2002), bzw. mit einem frühen Krankheitsbeginn (Bonen 2003).

Auch im Falle des *IBD5*-Locus wurden genotyp-phänotyp-Studien betrieben. Bereits kurz nach dem Bekanntwerden des *IBD5*-Locus konnte für Träger des Risikohaplotyps ein früherer Ausbruch der Erkrankung beobachtet werden (Rioux 2000, Mirza 2003). Eine folgende britische Studie brachte diesen Locus besonders mit perianalem Befall bei M. Crohn in Verbindung (Armuzzi 2003). Eine weitere britische Studie konnte bei *IBD5*-Trägern einen schwereren Verlauf der Erkrankung bezüglich Stenosenbildung, Operationsrate und transmuralen Befalls feststellen (Noble 2005). Eine große deutsche Studie zeigte, dass *IBD5*-Träger ein stark erhöhtes Risiko für einen ilealen und gleichzeitig nicht-ilealen Befall haben – also einen erweiterten Befall. Auch wurden Fistelbildungen und Stenosenbildung bei *IBD5*-Trägern gehäuft nachgewiesen (Brescianini 2006). Diese Erkenntnis konnte von Latiano und Mitarbeitern erweitert werden: die Autoren stellten bei *IBD5*-Trägern bei Colitis ulcerosa einen schwerwiegenderen Befall der Erkrankung fest (Latiano 2006).

Speziell der bekannte *OCTN-TC*-Haplotyp war bei schwerer verlaufenden Erkrankungen gehäuft zu sehen. Dies wurde zusätzlich mit einer geringeren Körpergröße, Gewicht und Body-Mass-Index (BMI) zum Zeitpunkt der Diagnose assoziiert (Russell 2006). Vermeire und Mitarbeiter konnten in der Flämischen Bevölkerung für die *OCTN*-Varianten zwar keine

unabhängige Assoziation mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa an sich feststellen, jedoch bestand ein Zusammenhang mit perianalem und transmuralen Befall der Erkrankung (Vermeire 2005). Cucchiara und Mitarbeiter konnten den TC-Haplotyp mit einem stärkeren transmuralen Befall assoziieren (Cucchiara 2007), während eine weitere Studie für den TC-Haplotyp, allerdings in Abhängigkeit der *NOD2/CARD15*-Mutationen, ein erhöhtes Risiko für ilealen Befall errechnete (Newman 2005). Klinisch erhöhtes Risiko für operative Intervention, Stenosen- und Fistelbildung, transmuralen Befall und perianale Fisteln wurde für den TC-Haplotyp in weiteren Studien festgestellt (Noble 2005, Palmieri 2006). Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte eine starke Assoziation des TC-Haplotyp mit einer Kolonbeteiligung beim M. Crohn zeigen. Für Träger des TC-Haplotyp konnte jedoch keine erhöhte Inzidenz von Fisteln, Stenosen oder eine erhöhte Frequenz von operativen Interventionen gezeigt werden (Török 2005).

Für die in vorliegender Arbeit untersuchten Polymorphismen konnten homozygote Träger der C917T-Mutation im *OCTN1*-Gen nicht mit Stenosenbildung assoziiert werden. Patienten mit Stenosen waren signifikant seltener homozygote Träger des T-Allels als Patienten ohne Stenosen ( $p=0,023$ ). Heterozygote Allelträger hatten kein erhöhtes Risiko für Stenosebildungen.

Der Einfluss der *OCTN*-Gene auf die operative Intervention ergab ebenfalls neue Erkenntnisse. Für den *OCTN1* C917T-Polymorphismus waren die T-Allelträger in der Gruppe der operierten Patienten signifikant häufiger ( $p=0,040$ ). Auch die Frequenz des T-Carrier-Genotyps war unter den operierten Patienten höher ( $p=0,011$ ) (s. auch 4.3).

So scheinen die drei untersuchten Polymorphismen in den *OCTN1/2*-Genen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen an sich nicht direkt assoziiert zu sein, können allerdings eventuell das Erscheinungsbild der Erkrankung beeinflussen. Wichtig ist, dass diese Beobachtungen hier vollkommen unabhängig vom *IBD5*- und *NOD2/CARD15*-Status der Patienten waren. Die hier untersuchten Mutationen scheinen also (zumindest zum Teil im Einklang mit dem TC-Haplotyp) Einfluss auf den Phänotyp und Verlauf des M. Crohn zu nehmen. Auf welcher molekularen Ebene jenes geschieht, muss jedoch noch in weiteren Studien geklärt werden.

#### **5.4 Funktionelle Bewertung der Ergebnisse**

Die Ursache chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist nach wie vor weitgehend unbekannt. Gesichert scheint eine Kombination aus genetischen Faktoren und

Umwelteinflüssen zu sein. Aus funktioneller Sicht konnte bisher nur eine gestörte Toleranz bzw. eine gestörte Immunantwort des mukosalen Immunsystems des Darms auf bakterielle Antigene nachgewiesen werden. Aus genetischer Sicht spielen hier das *NOD2/CARD15*-Gen sowie weitere, in neueren Studien beschriebene Suszeptibilitätsgene wie *IL23R* und *ATG16L1* (s. auch 1.3.1) eine wichtige Rolle.

Der *IBD5*-Locus ist ebenfalls unabhängig mit M. Crohn assoziiert. Immerhin konnte die Reduzierung dieses Risikolocus auf einen 250kb-messenden Abschnitt die potentiell ursächlichen Gene in Ihrer Zahl eingrenzen. Der *IBD5*-Locus beinhaltet fünf Gene - darunter das *IRF1*-Gen, das als Transkriptionsfaktor für proinflammatorische Zytokine fungiert. Bisher ist die kausale Variante im *IBD5*-Locus, beziehungsweise deren mögliche funktionelle Beeinträchtigung der dort gelegenen Gene, nicht eindeutig identifiziert worden. Mutationen in einzelnen Genen der *IBD5*-Region könnten auch Auswirkungen auf die Funktion und Expression der anderen hier befindlichen Gene haben. Möglich ist auch eine Beeinflussung von Genen außerhalb des *IBD5*-Locus.

*IBD5* beinhaltet zusätzlich die *OCTN1/2*-Gene. Doch welche Rolle kommt hier den *OCTN*-Genen zu? Diese organischen Kationentransporter werden in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert, unter anderem auch in Epithelzellen des Darms, Makrophagen und T-Zellen – alles Zellen, die in der Immunantwort des Körpers eine Rolle spielen. Eine mögliche Beteiligung der *OCTN*-Gene an systemisch-entzündlichen Geschehen wie der chronischen Arthritis wurde bereits beschrieben (Tokuhiro 2003, Dieude 2005).

Peltekova und Mitarbeiter konnten dem von ihnen beschriebenen TC-Haplotyp in vitro eine verringerte Funktion beider Proteine nachweisen. Eine defekte Funktion dieser Proteine verringert den intrazellulären Gehalt von Carnitin stark. Carnitin ist wichtig für die beta-Oxidation von Fettsäuren. Im Falle einer Mutation könnte durch folgende Funktionsfehler die „oxygen-burst“-Reaktion bei der Bekämpfung von pathogenen Darmkeimen fehlerhaft erfolgen (Übersicht in Reinhard 2006). Peltekova selber postulierte als möglichen pathogenetischen Faktor für die Entstehung des M. Crohn einen durch *OCTN*-Mutationen bedingten Funktionsverlust dieser Proteine mit folgender erhöhter intrazellulärer Aufnahme von toxischen bakteriologischen Stoffwechselprodukten. (Peltekova 2004).

Die hier beschriebene erhöhte Operationsrate unter *OCTN1* C917T-Allelträgern könnte theoretisch auf eine ursächlich fehlerhafte Funktion der Immunantwort deuten, da starke inflammatorische Prozesse - durch folgende Komplikationen - gehäuft zu operativen Interventionen führen. Da es für die hier untersuchten Polymorphismen jedoch bisher keine

funktionellen in vitro Untersuchungen gibt, lässt sich über deren Einfluss auf die Funktion und Expression der *OCTN*-Gene noch keine Aussage treffen.

## 6. Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind multifaktorielle Erkrankungen. Man geht heute davon aus, dass die Summe aus genetischer Prädisposition und mehreren Umweltfaktoren die Entstehung der Erkrankungen begünstigt. Dabei scheint besonders eine fehlerhafte Reaktion des angeborenen mukosalen Immunsystems gegenüber luminalen bakteriellen Antigenen eine wichtige Rolle zu spielen.

Die erste genetische Assoziation von M. Crohn mit Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen unterstützt diese These. Diese Mutationen führen zu einer verminderten Erkennung bakterieller Bestandteile mit der Folge einer verringerten Elimination von Pathogenen.

Der *IBD5*-Locus auf Chromosom 5q31 wurde durch genetische Kopplungsstudien mit folgender Feinkartierung örtlich eingegrenzt. Dieser Abschnitt ist in mehrere Haplotyp-Blöcke unterteilt. Ein bestimmter Risikohaplotyp ist besonders stark mit M. Crohn assoziiert (Rioux 2001, Daly 2001). Die Assoziation des *IBD5*-Locus mit M. Crohn wurde vielfach bestätigt und phänotypisch besonders mit perianalem und ausgedehntem Befall in Verbindung gebracht. Erste Studien geben allerdings auch Hinweise auf eine mögliche kausale Rolle bei Colitis ulcerosa.

Der *IBD5*-Locus beinhaltet fünf Gene - darunter auch *IRF1*, *PDLIM4* und *P4HA2*. Deren Funktion ist mitunter proinflammatorisch. Als wichtigste Gene sind die organischen Kationentransporter *OCTN1/2* zu sehen. Zwei Polymorphismen in diesen Genen konnten im Jahre 2004 von Peltekova und Mitarbeitern direkt mit dem M. Crohn assoziiert werden. Hierbei handelt es sich um die Polymorphismen *OCTN1* C1672T (L503F) und *OCTN2* G207C. Für diese Mutationen konnte in vitro ein Funktionsverlust beschrieben werden mit möglichen Folgen für den intrazellulären Carnitingehalt und die Immunantwort des Körpers (Peltekova 2004, Reinhard 2006). Die beschriebene Assoziation war besonders stark in Anwesenheit von *NOD2/CARD15*-Mutationen, aber unabhängig vom *IBD5*-Locus. In Folgestudien konnte die Assoziation des TC-Haplotyp mit M. Crohn bestätigt werden, allerdings ist die mögliche Unabhängigkeit vom *IBD5*-Locus umstritten. Erklären könnte dies jedoch der Umstand, dass Peltekova und Mitarbeiter einen *IBD5*-Marker benutzten, der mehrere Haplotypblöcke von den untersuchten *OCTN*-Genen entfernt war.

Welche Rolle jedoch die *OCTN*-Gene im besonderen spielen, ist noch nicht völlig geklärt. Urban und Mitarbeiter konnten weitere Polymorphismen in den *OCTN*-Genen mit einer zum Teil hohen Frequenz unter der schwarzen und asiatischen Bevölkerung nachweisen (Urban 2005). Diese Bevölkerungsgruppen haben eine niedrige Inzidenz von chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen. Eine Assoziation von *OCTN*-Mutationen in diesen Bevölkerungsgruppen würde somit einen starken Hinweis auf eine kausale Rolle geben. Studienergebnisse diesbezüglich stehen jedoch noch aus.

Um die Rolle der *OCTN*-Gene weiter zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit drei der von Urban und Mitarbeitern beschriebenen Polymorphismen in den *OCTN1/2*-Genen, welche auch in der kaukasischen Bevölkerung vorkommen, auf eine mögliche Assoziation mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Es konnte keine der drei Mutationen direkt mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht werden. Allerdings ließ sich für homozygote Träger des *OCTN1* 917T-Allels eine niedrigere Stenoserate nachweisen, und für T-Allelträger eine erhöhte Operationsrate. Letzteres steht für ein erhöhtes entzündliches Geschehen – das möglicherweise durch diese Mutation günstig beeinflusst wird.

In bezug auf genotyp-genotyp Interaktionen konnten keine signifikanten Interaktionen zwischen den hier untersuchten Polymorphismen und dem TC-Haplotyp der *OCTN*-Gene, weiteren Markern im *IBD5*-Locus oder Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen festgestellt werden.

Das starke Kopplungsungleichgewicht macht es bisher unmöglich, eine einzige ursächliche Mutation im *IBD5*-Locus zu identifizieren.

Zukünftige groß angelegte Studien werden die Aufgabe haben, auch andere Polymorphismen in der Region auf eine Assoziation mit M. Crohn und Colitis ulcerosa hin zu untersuchen. Im positiven Falle müssen funktionelle in vitro Versuche die zugrunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene klären. Dies könnte nicht zuletzt auch neue therapeutische Ansätze liefern, um die Entität der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Zukunft besser verstehen und entsprechend behandeln zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP  
The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease  
*Gastroenterology* 2002;122:854-866

Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF  
Clinical Relevance of Advances in Genetics and Pharmacogenetics of IBD  
*Gastroenterology* 2004;126:1533-1549

Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL, de Silva A, Cullen S, van Heel D, Orchard TR, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP  
Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31  
*Gut* 2003;52:1133-1139

Barrie A, Regueiro M  
Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease.  
*Inflamm Bowel Dis.* 2007 Jun 13; (Epub ahead of print)

Beaugerie L, MAssot N, Carbonnel F, Cattan S, Gendre JP, Cosnes J  
Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis.  
*Am J Gastroenterol* 2001 Jul;96(7):2113-2116

Bene J, Komlosi K, Magyari L, Talian G, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B  
Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for *SLC22A4* C1672T and *SLC22A5* G-207C genotypes.  
*Br J Nutr.* 2007;98(2):345-350

Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A  
Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study.  
*Cancer* 2001 Feb 15;91(4):854-862

Binder V  
Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease.  
*Dig Dis* 1998;16:351-355

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

Brescianini S, Trinh T, Stoll M, Schreiber S  
*IBD5* is associated with an extensive complicated Crohn's disease feature: implications from genotype-phenotype analysis.  
*Gut* 2007;56:149-156

Chakravarti A  
To a future of genetic medicine.  
Nature 2001;409:822-823

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

Cho JH  
Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic considerations  
World J Gastroenterol 2008; 14(3): 338-347

Cho JH  
The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease.  
Nature 2008; 8: 458-466

Colhoun HM, McKeigue PM, Smith GD  
Problems of reporting genetic associations with complex outcomes.  
Lancet 2003;361:865-872

Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Staiano AM, D'Inca R, Guariso G, Vieni G, Rutigliano V, Borreli O, Valvano MR, Annese V  
Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel disease.  
World J Gastroenterol 2007;13(8):1221-1229

Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG  
The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease.  
Gastroenterology 2002;122(4):867-874

Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES  
High-resolution haplotype structure in the human genome.  
Nat Genet 2001;29:229-232

D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P  
Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in exclude ileum.  
Gastroenterology 1998 Feb;114(2):262-267

Dieude P, Cornelis F  
Genetic basis of rheumatoid arthritis.  
Joint Bone Spine 2005;72(6):520-526

Dubuquoy L et al  
Impaired expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma in ulcerative colitis.  
Gastroenterology 2003; 124:1265-1276

Dürig M

Colitis Ulcerosa

In: Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B (Hrsg), Chirurgie, 2. korrigierte Auflage, Duale Reihe Thieme Verlag, S.403 (2003)

Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F

Anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses.

Gastroenterology 1991;100:1590-1596

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE

Highdensity genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12

Am. J. Hum. Genet. 2000;66:1857-1862

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly JM, Steinhardt AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH

A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science 2006; 314: 1461-1463

Elliott DE, Urban JR Jr, Argo CK, Weinstock JV

Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease?

FASEB J 2000;14:1848-1855

Elson CO

Experimental models of intestinal inflammation: new insights into mechanisms of mucosal homeostasis. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, eds. Mucosal immunology. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, Calif.: Academic Press, 1999: 1007-1024

Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM

Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease.

Gut 1997;40:619-622

Fedorak RN

Is it time to re-classify Crohn's disease?

Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004;18 Suppl:99-106

Fisher SA, Hampe J, Onnie CM, Daly MJ, Curley C, Purcell S, Sanderson J, Mansfield J, Annesse V, Forbes A, Lewis CM, Schreiber S, Rioux JD, Mathew CG

Direct or indirect association in a complex disease: the role of *SLC22A4* and *SLC22A5* functional variants in Crohn disease.

Hum Mutat. 2006;27(8):778-785

Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR

A simple classification of Crohn's Disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998.

Inflamm Bowel Dis. 2000 Feb;6(1):8-15

Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D  
Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy  
Lancet 1994; 343:766-767

Ghanchi FD, Rembacken BJ  
Inflammatory bowel disease and the eye.  
Surv. Ophthalmol. 2003 Nov-Dec;48(6):663-676

Giallourakis C, Stoll M, Miller K, Hampe J, Lander ES, Daly MJ, Schreiber S, Rioux JD  
*IBD5* is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis.  
Am J Hum Genet 2003;73:205-211

Gratzl M.  
Mukosales Immunsystem  
In: Junqueira, Carneiro, Kelley, Gratzl (Hrsg) Histologie, 5. Aufl, Springer-Verlag, S. 269 (2002)

Hagymasi K, Tulassay Z  
Inflammatory bowel disease and colorectal cancer  
Orv Hetil 2006 Oct 15;147(41):1977-1982

Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S,  
Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p.  
Am J Hum Genet. 1999;65:1647-1655

Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH, Stern J, Lucas M, Autschbach F, Herfarth C, Heuschen G  
Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis  
Gastroenterology 2001 Mar;120(4): 841-847

Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K  
A comprehensive review of genetic association studies.  
Genet Med 2002 Mar-Apr; 4(2): 45-61

Holtmann M, Galle P  
Current concept of pathophysiological understanding and natural course of ulcerative colitis.  
Langenbecks Arch Surg (2004) 389: 341-349

Hugot JP, Lauren-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Groupe d'Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel FJ, Thomas G  
Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on Chromosome 16.  
Nature (1996), 379:821-823

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

Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP  
Crohn's disease: the cold chain hypothesis.  
Lancet 2003 Ec 13;362(9400):2012-5

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G  
Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.  
J Biol Chem. 2003;278(8):5509-5512

Karban A, Itay M, Davidovich O, Leshinsky-Silver E, Kimmel G, Fidder H, Shamir R, Waterman M, Eliakim R, Levine A  
Risk Factors for Perianal Crohn's Disease: The Role of Genotype, Phenotype, and Ethnicity.  
Am J Gastroenterol 2007;102:1702-1708

Latiano A, Palmieri O, Valvano RM, D'Inca R, Vecchi M, Ferraris A, Sturmiolo GC, Spina L, Lombardi G, Dallapiccola B, Andriulli A, Devoto M, Annese V  
Contribution of *IBD5* locus to clinical features of IBD patients  
Am J Gastroenterol 2006;101:318-325  
Lee YM, Fock KM, See SJ, Ng TM, Khor C, Teo EK  
Racial differences in the prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in Singapore.  
J Gastroenterol Hepatol 2000;15:622-625

Leage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP, EPWG-IBD Group, EPIMAD Group, GETAID Group  
CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease.  
Am J Hum Genet. 2002; 70(4):845-857

Lesage S, Souali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tys C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP  
CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease.  
Am J Hum Genet 2002;70:845-857

Leung E, Hong J, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW  
Polymorphisms in the organic cation transporter genes *SLC22A4* and *SLC22A5* and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort.  
Immunol Cell Biol. 2006;84(2):233-236

Limbergen JV, Russell RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, Wilson DC, Satsangi J  
Genetics of the Innate Immune Response in Inflammatory Bowel Disease  
Inflamm Bowel Dis 2007;13(3):338-355

Loftus EV Jr.  
Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences.  
Gastroenterology. 2004 May;126(6):1504-17.

Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN  
Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease.  
Nat Genet 2003 Feb; 33(2):177-182

Lopes San Roman A, Rivero Fernandez M  
Current status of inflammatory bowel disease treatment.  
Rev Clin Esp. 2007 Jun;207(6):298-300

Magyari L, Bene J, Komlosi K, Talian G, Farago B, Csöngéi V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B  
Prevalence of *SLC22A4* 1672T and *SLC22A5* -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients.  
Pathol Oncol Res. 2007;13(1):53-56

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W  
Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease.  
N Engl J Med 2004; 351: 2069-2079

Martinez A, Martin MC, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, de la Concha EG, Urcelay E  
Association of the organic cation transporter OCTN genes with Crohn's disease in the Spanish population.  
Eur J Hum Genet. 2006;14(2):222-226

Mate-Jimenez J, Munoz S, Vicent D, Pajares JM,  
Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988.  
J Clin Gastroenterol 1994;18:27-31

Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM  
Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization.  
Gastroenterology 1992;102:1940-1948

Lahjouji K, Mitchell GA, Qureshi IA  
Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency.  
Mol Genet Metab 2001;73:287-297

Mathew CG, Lewis CM

Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects.  
Human Molecular Genetics, 2004, Vol. 13, Review Issue I

McGovern DTB, van Heel D, Negoro K, Ahmad T, Jewell DP

Further Evidence of *IBD5/CARD15* (NOD2) Epistasis in the Susceptibility to Ulcerative Colitis.

Am J Hum Genet. 2003;73:1465-1466

Metcalf AM

Elective and emergent operative management of ulcerative colitis.

Surg Clin North Am. 2007 Jun;87(3):633-631

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF

A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.

Nucl Acids Res 1988;16(3):1215

Mirza MM, Fisher SA, King K, Cuthbert AP, Hampe J, Sanderson J, Mansfield J, Donaldson P, Macpherson AJ, Forbes A, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG

Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the *CARD15* gene in Crohn disease.

Am J Hum Genet 2003;72:1018-1022

Montgomery SM, Morris DL, Thompson NP, Subhani J, Pounder RE, Wakefield AJ

Prevalence of inflammatory bowel disease in British 26 year olds: national longitudinal birth cohort.

BMJ. 1998 Apr 4;316(7137):1058-9.

Negoro K, McGovern DP, Kinouchi Y, Takahashi S, Lench NJ, Shimosegawa T, Carey A, Cardon LR, Jewell DP, van Heel DA

Analysis of the *IBD5* locus and potential gene-gene interactions in Crohn's disease.+#

Gut 2003;52:541-546

Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber THJ, Drenth JPH, van der Meer JWM

NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease.

Eur J Immunol 2004;34:2052-2059

Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Werts C, Boneca IG, Jehanno M, van der Meer JWM, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Philpott J, Dharancy S, Girardin SE

The Frameshift Mutation in Nod2 Results in Unresponsiveness Not Only to Nod2 – but Also Nod1-activating Peptidoglycan Agonists.

J Biol Chem 2005;280:35859-35867

Newman B, Gu X, Zhang Q, Wintle R, Cescon D, Yazdanpanah M, Liu X, Peltekova V, Van Oene M, Amos CI, Siminovitch K

A risk haplotype in the Solute Carrier Family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's Disease.

Gastroenterology 2005;128:260-269

Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Ho GT, Tenesa A, Smith L, Anderson N, Arnott ID, Satsangi J

The contribution of *OCTN1/2* variants within the *IBD5* locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease.

Gastroenterology 2005; 129: 1854-1864

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH

A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease

Nature (2001);411:603-606

Oostenbrug LE, van Dullemen HM, te Meerman GJ, Jansen PL

IBD and genetics: new developments.

Scand J Gastroenterol Suppl. 2003;(239):63-68

Otto HF

Entzündliche Erkrankungen, Colitis ulcerosa, M. Crohn

In: Böcker, Denk, Heitz (Hrsg), Pathologie, 2. Aufl, Urban & Fischer, S.683-688 (2001)

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V

Familial occurrence of inflammatory bowel disease.

N Engl J Med 1991;324:84-88

Papp M, Norman GL, Altorjay I, Lakatos PL

Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic?

World J Gastroenterol. 2007 Apr 14;13(14):2028-2036

Palmieri O, Latiano A, Valvano R, D'Inca R, Vecchi M, Sturniolo GC, Saibeni S, Peyvandi F, Bossa F, Zagaria C, Andreulli A, Devoto M, Annese V

Variants of *OCTN1-2* cation transporter genes are associated with both Crohn's disease and ulcerative colitis

Aliment Pharmacol Ther 2006;23:497-506

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA

Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease

Nature Genetics 2004;36:471-475

Podolsky DK

Inflammatory Bowel Disease

N Engl J Med, Vol. 347, No.6, August 8, 2002

Rath HC, Schultz M, Freitag R,

Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice.

Infect Immun 2001;69:2277-2285

Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA

Genomewide Search in Canadian Families with Inflammatory Bowel Disease Reveals Two Novel Susceptibility Loci

Am. J. Hum. Genet. 2000;66:1863-1870

Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ

Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease.

Nature Genetics 2001;29:223-228

Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT

Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial.

Lancet 1999;354:635-639

Robertson DJ, Sandler RS

Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature.

Inflamm Bowel Dis. 2001 Feb;7(1):51-57

Rook GA

The hygiene hypothesis and the increasing prevalence of chronic inflammatory bowel disorders.

Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Jul;6; Epub ahead of print

Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JJ.

Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews.

Gastroenterology 1989;96:1016-1020

Rubin DT, Hanauer SB

Smoking and inflammatory bowel disease.

Eur J Gastroenterol Hepatol. 2000 Aug;12(8):855-862

Rubin GP, Hungin AP, Kelly PJ, Ling J

Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population.

Aliment Pharmacol Ther. 2000 Dec;14(12):1553-9.

Russel MG, Dorant E, Brummer RJ, van de Kruijs MA, Muris JW, Bergers JM, Goedhard J, Stockbrügger RW

Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. South Limburg Inflammatory Bowel Disease Study Group.

Gastroenterology 1997 Aug;113(2):377-382

Russell RK, Drummond HE, Nimmo ER, Anderson NH, Noble CL, Wilson DC, Gillett PM, McGrogan P, Hassan K, Weaver LT, Bisset WM, MAhdi G, Satsangi J  
Analysis of the influence of *OCTNI/2* variants within the *IBD5* locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease.  
Gut 2006;55:1114-1123

Saccone SF, Rice JP, Saccone NL  
Power-Based, Phase-Informed Selection of Single Nucleotide Polymorphisms for Disease Association Screens.  
Genetic Epidemiology 2006;30:459-470

Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Colombel JF, Fleming KA, Seibold F, Homburger HA, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJ, Kaul DK, Wallace J, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Targan SR  
Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease.  
Inflamm Bowel Dis 2001;7:192-201

Sartor RB  
Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases.  
Am J Gastroenterol. 1997 Dec;92(12Suppl):5S-11S

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

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

Schreiber S, Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Stoll M, Folsch UR  
Genetik und Umwelt. Ist das Bild klarer geworden?  
Internist 2002;43:1335-1341

Shanahan F  
Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale?  
Inflamm Bowel Dis 2000; 6:107-115  
Shanahan F  
Crohn's Disease  
Lancet 2002; 359:62-69

Silverberg MS  
OCTNs: Will the real *IBD5* gene please stand up?  
World J Gastroenterol 2006 June 21; 12(23): 3678-3681

Silverberg MS, Duerr RH, Brant SR, Bromfield G, Datta LW, JANI N, Kane SV, Rotter JJ, Schumm LP, Steinhart AH, Taylor KD, Yang H, Cho JH, Rioux JD, Daly MJ  
Refined genomic localization and ethnic differences observed for the *IBD5* association with Crohn's disease.

Eur J Hum Genet 2007; 15(3): 328-335

Sonntag B, Stolze B, Heinecke A, Luegering A, Heidemann J, Lebedz P, Rijcken E, Kiesel L, Domschke W, Kucharzik T, Maaser C.

Preterm birth but not mode of delivery is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease later in life.

Inflamm Bowel Dis 2007 Jun 13 (Epub ahead of print)

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJP, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S

Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease.

Nature Genetics 2004;36:476-480

Subhani J, Montgomery SM, Ounder RE, Wakefield AJ

Concordance rates of twins and siblings in inflammatory bowel disease.

Gut 1998;42:A40

Tirpitz v. C, Reinshagen M, Adler G

Chronisch-Entzündliche Darmerkrankungen

In: Classen, Diehl, Kochsiek (Hrsg), Innere Medizin, 5. Aufl, Urban & Fischer, S.1214-1223 (2004)

Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ

Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study.

BMJ 1996;312:95-96

Török HP, Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Müller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brünner G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkühn T, Folwaczny C

Polymorphisms in the *DLG5* and *OCTN* cation transporter genes in Crohn's disease.

Gut 2005;54:1421-1427

Tokuhiro, S. et al.

An intronic SNP in a *RUNX1* binding site of *SLC22A4*, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis

Nat Genet 2003;35:341-348

Tosa M, Negoro K, Kinouchi Y, Abe H, Nomura E, Takagi S, Aihara H, Oomori S, Sugimura M, Takahashi K, Hiwatashi N, Takahashi S, Shimosegawa T

Lack of association between *IBD5* and Crohn's disease in Japanese patients demonstrates population-specific differences in inflammatory bowel disease.

Scand J Gastroenterol 2006;41:48-53

Tsalenko A, Ben-Dor A, Cox N, Yakhini Z

Methods for analysis and visualization of SNP genotype data for complex diseases.

Pac Symp Biocomput. 2003; 548-561

- Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B  
Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of nonzygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking.  
*Gut* 1988;29:990-996
- Urban TJ, Giacomini KM, Risch N  
Haplotype structure and ethnic-specific allele frequencies at the OCTN Locus: Implications for the genetics of Crohn's disease.  
*Inflamm Bowel Dis* 2005;11:78-79
- Vermeire S, Pierik M, Hlavaty T, Claessens G, Van Schuerbeeck N, Joossens S, Ferrante M, Henckaerts L, Bueno de Mesquita M, Vlietinck R, Rutgeerts P  
Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's Disease but not with susceptibility to IBD.  
*Gastroenterology* 2005;129:1845-1853
- Vucelic B, Korac B, Sentic M, Milicic D, Hadzic N, Juresa V, Bozikov J, Rotkvic I, Buljevac M, Kovacevic I  
Epidemiology of Crohn's disease in Zagreb, Yugoslavia: a ten-year prospective study.  
*Intl J Epidemiol* 1991;20:216-220
- Vucelic B, Korac B, Sentic M, Milicic D, Hadzic N, Juresa V, Bozikov J, Rotkvic I, Buljevac M, Kovacevic I  
Ulcerative colitis in Zagreb, Yugoslavia: incidence and prevalence 1980-1989  
*Intl J Epidemiol* 1991;20:1043-1047
- Waller S, Tremelling M, Bredin F, Godfrey L, Howson J, Parkes M  
Evidence for association of OCTN genes and *IBD5* with ulcerative colitis.  
*Gut* 2006;55:809-814
- Yabuuchi H, Tamai I, Nezu JI, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, SAI Y, Tsuji A  
Novel Membrane Transporter *OCTN1* mediates multispecific bidirectional, and pH-Dependent transport of organic cations.  
*JPET* 1999;289:768-773
- Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y  
Association analysis of *SLC22A4*, *SLC22A5* and *DLG5* in Japanese patients with Crohn Disease.  
*J Hum Genet* 2004;49:664-668
- Yang H, Taylor DK, Rotter JI  
Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology.  
*Mol Genet Metab* 2001;74:1-21
- Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI.  
Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews.  
*Gut* 1993;34:517-524

Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG

Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning .

World J Gastroenterol 2003;9:1646-1656

## **Lebenslauf**

Klaus Ott

geb. am 05 November 1981

### **Schulbildung**

1987-1989 Grundschule Kirchheim II, Kirchheim bei München  
1989-1991 Deutsch-Amerikanische Schule, Menlo Park, Kalifornien, USA  
1991-1992 Lincoln Elementary School, Cupertino, Kalifornien, USA  
1992-1995 Kennedy Junior High School, Cupertino, Kalifornien USA  
1995-1996 Ernst-Mach-Gymnasium, München  
1996-2000 Gymnasium Kirchheim bei München  
2000 Abitur

### **Wehrdienst**

2000-2001 Luftwaffensanitätsbereitschaft  
Flugabwehrraketengruppe 33 Erding

### **Studium**

2001-2007 Studium der Humanmedizin  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
2002 Ärztliche Vorprüfung  
2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2004 United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step I  
2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2007 United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step II

### **Auslandsaufenthalte**

2004 Abteilung für Interventionelle Radiologie  
Georgetown University Hospital, Washington DC, USA  
2005 Abteilung für klinische Radiologie  
University of California, San Francisco (UCSF), USA

### **Beruflicher Werdegang**

Seit 12/2007 Assistenzarzt, Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Klinikum Augsburg

### **Fremdsprachen**

Englisch, Französisch, Spanisch

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Folwaczny für die Gelegenheit bedanken, in dieser Forschungsgruppe zu promovieren.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. med. Helga-Paula Török. Sie hat mich schnell und gründlich mit der Thematik dieser Arbeit vertraut gemacht. Ihre Begeisterung für die Forschung war immer wieder ein großer Motivationsschub für mich. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Trotz ihrer durch den Beruf sehr eingeschränkten Freizeit war sie immer für Ratschläge und Korrekturen zur Stelle – vielen herzlichen Dank!

Vielen Dank auch an Herrn Laurentien Tonenchi für die tolle Einarbeitung in die Laborarbeit und die vielen lustigen Stunden während der Forschungsarbeit.

Meinen Eltern wie auch meinen Geschwistern und Henry danke ich für die ausgiebige Unterstützung während meines Studiums. Dieser familiäre Rückhalt gab mir die Kraft, diese Promotion durchzuführen. Danke auch für sämtliche Korrekturlesungen!

Meinem Opa, Herrn Dr. med. Walter Ott, danke ich für die „genetische Komponente“ des Mediziners in mir. Seine vorbildliche ärztliche Tätigkeit wird stets ein Vorbild für mich sein.

Besonders danke ich auch meiner Freundin, Martina Schiffner. Sie gab mir nicht nur fachlichen Beistand, sondern war auch meine bessere Hälfte in den letzten Jahren.

Meinen Studienkollegen Herrn Dr. med. Jan Häckert, Herrn Martin Müller und Herrn Kenneth Everett Mah, MD, danke ich für die tatkräftige Unterstützung während des Studiums und der Promotion – und einfach für die tolle jahrelange Freundschaft.