

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

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Untersuchungen zur Rolle von Polymorphismen im
PPARG-Gen bei chronisch entzündlichen
Darmerkrankungen**

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

**vorgelegt von Christian Markus
aus Günzburg**

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Brand

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hermann S. Fießl
Priv.-Doz. Dr. Burkhard Rolf**

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

Meiner Familie und meiner Freundin Anna gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Glas J, Seiderer J, **Markus C**, Pfennig S, Wetzke M, Paschos E, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Diegelmann J, Roeske D, Brand S.

Role of PPARG gene variants in inflammatory bowel disease.

Inflamm Bowel Dis. 2010 Aug 18. [Epub ahead of print]

J. Diegelmann, J. Glas, J. Seiderer, **C. Markus**, S. Pfennig, C. Tillack, M. Jürgens, A. Konrad, M. Wetzke, E. Paschos, H. Török, T. Griga, W. Klein, J.T. Epplen, U. Schiemann, T. Mussack, P. Lohse, B. Göke, M. Folwaczny, T. Ochsenkühn, B. Müller-Myhsok, S. Brand.

Ethnic Differences in the genetic susceptibility to Crohn's Disease: Functional *PPARG* gene variants are not associated with susceptibility to inflammatory bowel disease in the German population.

16th United European Gastroenterology Week, Vienna (Austria), October 18-22, 2008. *Gut* 2008; 57(Suppl.): P1202

Glas J, **Markus C**, Török HP, Tonenchi L, Wetzke M, Brand S, Lohse P, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwacny C, Folwaczny M, Mussack T.

Keine Assoziation von Polymorphismen im *PPARG* Gen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

61. Tagung der Deutschen Gesellschaften für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Hannover, 13.-16. September 2006. *Z Gastroenterol* 2006; 44(8): P082.

Glas J, Torok HP, Tonenchi L, **Markus C**, Wetzke M, Brand S, Lohse P, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Mussack T, Ochsenkuehn T, Folwaczny M, Folwaczny C.

No Association of Polymorphisms in the *PPARG* Gene Encoding for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (Ppar γ) with Inflammatory Bowel Disease.

Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week, Los Angeles, USA, May 20-25, 2006. *Gastroenterology* 2006. 130(4), Supplement 2: A590

1. Einleitung	1
1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Morbus Crohn – Krankheitsbild, Diagnose und Therapie	2
1.1.3. Colitis ulcerosa – Krankheitsbild, Diagnose und Therapie	4
1.1.4. Die Vienna- und Montreal-Klassifikation	7
1.2. Pathogenese	8
1.2.1. Aktueller Forschungsstand	8
1.2.2. Exogene Umweltfaktoren	8
1.2.3. Darmflora	10
1.2.4. Mukosales Immunsystem	11
1.2.5. Genetik	14
1.2.5.1. Epidemiologie	14
1.2.5.2. Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen	15
1.3. PPARs	18
1.3.1. Familie der nukleären Rezeptoren	18
1.3.2. Struktur der PPARs	18
1.3.3. Transkription der für die PPARs kodierenden Gene	19
1.3.4. PPAR- γ	20
1.3.4.1. Regulation der PPAR- γ -Expression	22
1.3.4.2. Funktionen von PPAR- γ	24
1.3.4.3. Bedeutung von PPAR- γ für chronisch entzündliche Darmerkrankungen	26
1.3.4.4. Vorbefunde zu Polymorphismen im <i>PPARG</i> -Gen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	29
1.4. Zielsetzung der Arbeit	30
2. Material	32
2.1. Studienpopulation	32
2.1.1. Patientenkollektiv	32
2.1.2. Kontrollkollektiv	32
2.2. Kits und Chemikalien	33
2.2.1. Materialien für die DNA-Isolierung	33

2.2.2. Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte	33
2.2.3. Materialien für den Restriktionsverdau	34
2.2.4. Materialien für die Agarosegelelektrophorese	34
2.3. Primer für die Sequenzierung und Klonierung	34
2.3.1. Primer für <i>PPARG</i> SNP1 (rs2067819)	35
2.3.2. Primer für <i>PPARG</i> SNP2 (rs3892175)	35
2.3.3. Primer für <i>PPARG</i> SNP3 (rs3856806)	35
2.4. Geräte	35
3. Methoden	37
3.1. Allgemeine Vorgehensweise	37
3.2. Molekularbiologische Methoden	37
3.2.1. Isolierung genomischer DNA	37
3.2.1.1. Isolierung der DNA aus Buffycoat mittels QIAamp® DNA Blood Mini Kit	37
3.2.2. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	38
3.2.3. Die Polymerasekettenreaktion	39
3.2.4. Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus–Analyse	41
3.2.5. Agarosegelelektrophorese	43
3.2.6. Reinigung der PCR-Produkte	43
3.3. Typisierung der Polymorphismen	44
3.3.1. Nachweis von Mutationen im <i>PPARG</i> -Gen	44
3.3.1.1. Polymorphismus SNP 1=rs2067819	44
3.3.1.2. Polymorphismus SNP 2=rs3892175	45
3.3.1.3. Polymorphismus SNP 3=rs3856806	45
3.4. Statistische Auswertung	46
3.4.1. Voraussetzungen	46
3.4.2. Chi-Quadrat (χ^2)-Test und exakter Test nach Fisher	46
3.4.3. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	48
3.4.4. Allelfrequenzen	49
3.4.5. Haplotypfrequenzen und Kopplungsungleichgewichte	49
3.4.5.1. Drei-Punkt-Haplotypenfrequenzberechnung und Kopplungsungleichgewichte	49

4. Ergebnisse	51
4.1. Allgemeine Vorbemerkungen	51
4.2. Demographische Eigenschaften der Studienpopulation	51
4.3. Polymorphismen im <i>PPARG</i> -Gen	52
4.3.1. SNP1=rs2067819 im <i>PPARG</i> -Gen	52
4.3.2. SNP2=rs3892175 im <i>PPARG</i> -Gen	53
4.3.3. SNP3=rs3856806 im <i>PPARG</i> -Gen	55
4.4. Haplotyp-Analyse zwischen den SNPs rs2067819, rs3892175 und rs3856806	58
4.5. Genotyp-Phänotyp-Analyse	58
4.5.1. Ileale Beteiligung	58
4.6. Analyse bezüglich einer Epistasis zwischen Mutationen im <i>PPARG</i> -Gen und <i>ATG16L1</i>	59
5. Diskussion	61
5.1. Pathogenese	61
5.2. Studiendesign	61
5.3. Validität der verwendeten Genotypisierungsmethoden	62
5.4. Bewertung der Ergebnisse aus genetischer Sicht	64
5.4.1. Analyse einer Assoziation der untersuchten Polymorphismen bezüglich einer Prädisposition für Morbus Crohn	64
5.4.2. Vergleich der eigenen Daten mit den Daten anderer Studien	64
5.4.3. Analyse bezüglich einer Prädisposition für Colitis ulcerosa	67
5.4.4. Geno-Phänotyp-Analyse	67
5.4.5. Analyse im Hinblick auf eine Epistasis von <i>PPARG</i> mit <i>ATG16L1</i>	67
5.4.6. Genomweite Kopplungsanalysen	68
5.5. Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf eine funktionelle Rolle von PPAR- γ bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	69
5.6. Schlussfolgerung	70
6. Zusammenfassung	71
7. Abkürzungen und Begriffe	73
8. Tabellen und Abbildungsverzeichnis	76
8.1. Tabellenverzeichnis	76
8.2. Abbildungsverzeichnis	78

9. Literatur	80
10. Danksagung	96

1. Einleitung

1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1. Epidemiologie

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gehören zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die beide durch ein dysreguliertes mukosales Immunsystem gekennzeichnet sind. Eine Balance verschiedener Mechanismen hält die intestinale Mukosa im Gleichgewicht zwischen Immuntoleranz und Entzündung. Wenn diese Balance gestört wird, kann es zu einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung kommen. Die höchsten Inzidenzen und Prävalenzen werden in Nordeuropa [1-3], England [4] und Nordamerika [5, 6] beschrieben. Regionen mit niedrigeren Inzidenzen und Prävalenzen wie Zentral- und Südeuropa, Asien, Afrika und Lateinamerika holen jedoch auf [7-9]. In Nordamerika liegt die Inzidenz für die Colitis ulcerosa bei 2,3 bis 14,3/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr, für Morbus Crohn bei 3,1 bis 14,3/100.000 Erkrankungen; die Prävalenz liegt bei 37 bis 246/100.000 für die Colitis ulcerosa und bei 26 bis 199 für den Morbus Crohn. Das bedeutet, dass in Nordamerika 7.000 bis 46.000 Menschen jährlich neu an Colitis ulcerosa erkranken und 780.000 insgesamt an Colitis ulcerosa leiden. An Morbus Crohn erkranken jährlich 10.000 bis 47.000 Menschen neu, bis zu 630.000 leiden insgesamt daran [5, 6]. In Europa bewegt sich die Inzidenz für die Colitis ulcerosa zwischen 1,5 und 20,3/100.000, für den Morbus Crohn bei 0,7 und 9,8/100.000. Die Prävalenz liegt bei 243/100.000 für die Colitis ulcerosa und bei 144 für den Morbus Crohn [1, 2]. Aus den vorliegenden Daten aus Amerika, Kanada und Europa lässt sich ein Nord-Süd-Gefälle erkennen [10]. Während in den Regionen mit hohen Inzidenzen und Prävalenzen sich diese langsam stabilisieren, steigen sie in Regionen mit bisher niedrigen Inzidenzen und Prävalenzen wie zum Beispiel Südkorea und Griechenland mit zunehmender Industrialisierung und Verwestlichung des Lebensstils, der Ernährung und der Umweltfaktoren stetig an [11, 12]. Hinsichtlich der Geschlechterverteilung leiden mehr Frauen als Männer an Morbus Crohn, bei Colitis ulcerosa ist es umgekehrt [5]. Beide Krankheitsbilder manifestieren sich meistens im späten Jugend- bzw. frühen Erwachsenenalter, können jedoch in jeder Altersstufe auftreten. In Nordamerika liegt das durchschnittliche Alter für den Morbus Crohn bei

Diagnosestellung bei 33,4 bis 45 Jahren, die Colitis ulcerosa wird im Schnitt 5 bis 10 Jahre später diagnostiziert [13, 14].

1.1.2. Morbus Crohn – Krankheitsbild, Diagnose und Therapie

Der Morbus Crohn ist eine diskontinuierliche, segmental auftretende transmurale Entzündung der intestinalen Mukosa, welche im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten kann; meistens ist jedoch der ileozökale Übergang mit terminalem Ileum und Zökum befallen. Zwei Drittel der Patienten weisen einen Dünndarmbefall auf und ebenfalls zwei Drittel einen Befall des Dickdarms. Das Rektum ist im Gegensatz zur Colitis ulcerosa oft ausgespart. Bei mildem Verlauf erkennt man Aphten und kleine oberflächliche Exulzerationen, die bei höherer Krankheitsaktivität sich zu landkartenförmigen oder unregelmäßig länglich geformten Exulzerationen ausweiten. Diese können longitudinal und transversal fusionieren und ergeben so mit den dazwischenliegenden gesunden Schleimhautarealen das typische Bild eines Pflastersteinreliefs. Außerdem findet man kleinste hämorrhagische Läsionen. Histologisch sieht man in der Frühphase der Erkrankung aphtoide Ulzerationen und fokale Kryptenabszesse. In allen Wandschichten des Darmes und zusätzlich in Lymphknoten, Mesenterium, Peritoneum, Leber und Pankreas können Makrophagenanhäufungen auftreten, die nicht-verkäsende Granulome bilden. Im Krankheitsverlauf bildet sich entweder ein fibrostenotisches beziehungsweise fistulierendes oder ein inflammatorisches Krankheitsmuster aus. Es können entzündliche Konglomerattumoren auftreten, typischerweise im rechten Unterbauch, die aus verbackenen Darmschlingen, induriertem Mesenterium und geschwollenen Lymphknoten bestehen. Das kann zu intermittierendem Darmverschluss und im weiteren Verlauf zu Fibrosierung der Darmwand und dauerhaften Stenosen und Strikturen führen. Als weitere Komplikation kann die Entzündung der Darmwand zu Verdünnung mit Mikroperforationen führen, aus denen Fisteln entstehen können. Diese können in anderen Darmabschnitten, an der Hautoberfläche, in die Harnblase oder frei im Mesenterium enden. Klinisch leiden die Patienten an rezidivierenden oder chronischen Abdominalschmerzen und Durchfällen, die jedoch im Gegensatz zur Colitis ulcerosa seltener Blut enthalten. Die Schmerzen treten kolikartig auf und bessern sich nach Defäkation. Bei Befall des terminalen Ileums kann der Schmerz eine Appendizitis vortäuschen. Fieber und eine (ausgeprägte) Leukozytose sind eher

selten und oft ein Hinweis auf einen Abszess, bei akuter Erkrankung sind die Patienten meist subfebril und weisen eine leichte Leukozytose auf.

Bei ausgeprägtem Befall des Ileums mit Verlust eines großen Teils seiner Resorptionsfläche kann es zu einem Malabsorptionssyndrom mit Gewichtsverlust kommen, dabei finden sich Hypoalbuminämie, Kalziummangel, Hypomagnesiämie, Gerinnungsstörungen und Vitamin-B12-Mangel. Bei früher Krankheitsmanifestation im Kindesalter kann es dadurch zu Wachstumsstörungen kommen.

Der Morbus Crohn verläuft schubweise mit einer Rezidivhäufigkeit von 30% nach einem Jahr und 40% nach zwei Jahren. Von einem chronisch-aktiven Verlauf spricht man bei einer Persistenz der Krankheitssymptome über mehr als sechs Monate.

Zur Primär- und zur Verlaufsdagnostik werden Bestimmungen von C-reaktivem Protein, Thrombozyten, Hämoglobin und Hämatokrit sowie der Leukozyten vorgenommen. Zusätzlich sollte in der Primärdiagnostik sowie bei auftretenden Rezidiven immer eine Stuhluntersuchung auf infektiöse Durchfallerreger inklusive *Clostridium difficile*-Toxin erfolgen. Hilfreich zur Abgrenzung nicht entzündlicher Ursachen der gastrointestinalen Beschwerden kann die quantitative Bestimmung von Calprotectin im Stuhl sein. Ein transabdomineller Ultraschall sollte immer in der Akutdiagnostik und zum Nachweis von Abszessen, zur Feststellung einer Fistel oder einer Stenose durchgeführt werden. Unbedingter Bestandteil der Initialdiagnostik ist die Ileokoloskopie mit Stufenbiopsien und anschließender histologischer Untersuchung der Mukosabiopsien. Dazu sind Biopsien aus mindestens fünf verschiedenen anatomischen Segmenten des gesamten Kolons einschließlich des Rektums, Biopsien aus dem terminalen Ileum und dem oberen Magen-Darm-Trakt notwendig. Bei Patienten mit Hinweisen auf einen Morbus Crohn in der Ileoskopie wird in jedem Fall eine weiterführende Diagnostik empfohlen, um die Lokalisation und die Ausbreitung im übrigen Gastrointestinaltrakt zu bestimmen. Das kann durch verschiedene bildgebende Techniken wie konventionelles oder Magnetresonanz-Enteroklysma, fraktionierte Magen-Darm-Passage, eine Computertomographie, eine Magnetresonanztomographie, Dünndarm-Endoskopie, Kapselendoskopie oder den hochauflösenden Ultraschall geschehen. Der generelle Einsatz von Aktivitäts- oder endoskopischen Indizes wie zum Beispiel der Vienna-Klassifikation ist in der Routine durch die Leitlinien noch nicht empfohlen (Leitlinie "*Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn*" 2008 der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)) [15].

Die Therapie richtet sich nach der Krankheitsaktivität. Bei leichten Beschwerden kann eine symptomatische Therapie mittels Analgetika und Antidiarrhoika genügen. Im aktiven Schub wird bei leichter Entzündungsaktivität mit Ileozökalbefall Budenosid angewandt. Bei Ileozökalbefall und mäßiger Entzündungsaktivität sollte vorzugsweise mit Budenosid oder systemisch wirkenden Glukokortikoiden behandelt werden, bei infektiösen Komplikationen eventuell ergänzt durch Antibiotika. Bei hoher Entzündungsaktivität und Ileozökalbefall sollte initial mit systemisch wirkenden Glukokortikoiden, bei inkomplettem Ansprechen auf Glukokortikoide mit Azathioprin beziehungsweise 6-Mercaptopurin oder alternativ Methotrexat als Immunsuppressiva behandelt werden. Bei Nichtansprechen auf Glukokortikoide und Immunsuppressiva sollte nach Ausschluss chirurgischer Therapieoptionen und von Kontraindikationen eine Therapie mit Antikörpern gegen Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) erfolgen. Patienten mit Crohn-Kolitis sollten bei leichter bis mäßiger Aktivität entweder mit Sulfasalazin oder systemisch wirksamen Glukokortikoiden behandelt werden, bei distalem Befall begleitend mit Suppositorien, Klysmen oder Schäumen (Steroide). Bei Patienten mit Crohn-Kolitis und hoher Krankheitsaktivität gelten dieselben Therapieprinzipien wie für Patienten mit Ileozökalbefall. Die Indikationen für eine chirurgische Intervention stellen ein Ileus, Perforationen oder eine Peritonitis dar. Ebenso liegt eine Operationsindikation bei einem fulminanten Schub mit einer konservativ nicht zu beherrschenden Blutung, sowie bei Nichtansprechen auf intensivierte immunsuppressive Therapie und bei Auftreten einer hochgradigen (=high-grade) intraepithelialen Neoplasie (IEN) vor. Auch ein funktionelles Kurzdarmsyndrom und enterokutane, enteroperitoneale oder enterovesikale Fisteln sowie relevante Stenosen sind eindeutige OP-Indikationen (Leitlinie "*Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn*" 2008 der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)) [15, 16].

1.1.3. Colitis ulcerosa – Krankheitsbild, Diagnose und Therapie

Die Colitis ulcerosa ist eine mukosale Erkrankung, die meist distal im Rektum beginnt und sich nach proximal im Kolon ausbreitet. Der Befall ist kontinuierlich vom Rektum aus nach proximal. Der Befall des gesamten Kolons tritt bei der Colitis ulcerosa in etwa 12–37% der Fälle auf, meistens sind nur das Rektosigmoid oder das linksseitige Kolon befallen. Bei etwa 50% ist nur das Rektosigmoid befallen, etwa

25% weisen eine linksseitige Colitis auf und etwa 25% eine Pancolitis auf. In 10 bis 20% der Fälle einer Pancolitis ulcerosa ist der am meisten distal gelegene Anteil des terminalen Ileum befallen, dies wird Backwash-Ileitis bezeichnet [17]. Die Darmschleimhaut ist bei der Colitis ulcerosa im Gegensatz zum Morbus Crohn kontinuierlich befallen. Sie ist im akuten Stadium der Entzündung bei mildem Verlauf leicht gerötet und an der Oberfläche leicht granuliert. Bei einem schweren Verlauf ist die Schleimhaut entzündlich gerötet, ödematos und blutet bei Kontakt. Eine normale Gefäßzeichnung ist nicht mehr erkennbar. Es bilden sich kleine Schleimhautulcerationen mit Fibrinbelägen, die bei chronischem Verlauf rezidivieren und dadurch zur Schleimhautzerstörung führen. Dabei kommt es zu einem Verlust des normalen Faltenreliefs und zur Atrophie der Schleimhaut. Die restlichen intakten Schleimhautinseln imponieren dabei als Pseudopolypen. Histologisch gesehen bleibt die Entzündung auf die Mucosa und die oberflächliche Submucosa beschränkt. Im frischen Stadium finden sich Granulozyteninfiltrate in den Krypten, die über eine Kryptitis zu Kriptenabszessen führen. Im chronischen Stadium überwiegen Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen. Es kommt zu einer Schleimhautatrophie und einer fibromuskulären Hyperplasie der Muscularis mucosae. Als Komplikationen können DALMs (dysplasia associated lesion or mass) und Epitheldysplasien entstehen, die Vorläufer einer karzinomatösen Entartung sind. Klinisch imponiert das Krankheitsbild durch Durchfälle, rektalen Blut- und Schleimabgang, Tenesmen und diffuse oder krampfartige abdominelle Schmerzen. Die Patienten berichten von einer erhöhten Stuhlfrequenz, vermehrtem Stuhldrang, nächtlicher Defäkation und dem Gefühl der unvollständigen Stuhlentleerung. Zusätzliche Symptome sind Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Fieber und Gewichtsverlust. Der Verlauf ist zu 85% chronisch-rezidivierend mit rezidivierenden Exazerbationen und zwischenzeitlicher kompletter Remission, zu 10% chronisch-kontinuierlich ohne komplette Remission und zu 5% akut fulminant mit plötzlichem Beginn mit Tenesmen, blutige Diarrhöen, septischen Temperaturen und reduziertem Allgemeinzustand. Eine Sonderform des fulminanten Schubs stellt das toxische Megakolon dar [15].

Diagnostisch empfehlen die aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) vom Jahre 2004 neben einer anamnestischen Erhebung und einer klinischen Untersuchung die Bestimmung von C-reaktivem Protein oder alternativ der Blutsenkung und ein Blutbild, zusätzlich

sollten noch die Gamma-Glutamyl-Transferase und die alkalische Phosphatase bestimmt werden. Bakteriologische Stuhluntersuchungen sind in der Initialdiagnostik und beim fulminanten Schub obligat, auch zum Ausschluss einer *Clostridium difficile*- und einer *Cytomegalie*-Infektion, bei klinischem Verdacht erweitert durch ergänzende mikrobiologische Untersuchungen in Serum, Stuhl und Biopsiematerial zum Ausschluss einer Infektion durch Amöben und Parasiten. Ebenfalls zur Initialdiagnostik gehört eine komplette Ileokoloskopie mit Biopsien aus dem terminalen Ileum, dem Rektum und jedem Kolonsegment aus makroskopisch betroffenen und nicht betroffenen Abschnitten. Nach langjährigem Verlauf sollten Stufenbiopsien zur Karzinomprävention entnommen werden. Eine hochauflösende abdominelle Sonografie sollte bei der Initialdiagnostik, in der Verlaufsdiagnostik sowie bei Verdacht auf Komplikationen erfolgen. Als weitere bildgebende Verfahren kommen Kolon-Doppelkontrastuntersuchung als Alternative zur Ileokoloskopie, die MR-/CT-Kolonographie bei speziellen Situationen wie etwa bei Stenosen oder ein MR-Enteroklysma/CT-Sellink/konventionelles Enteroklysma zur differentialdiagnostischen Abgrenzung zum Morbus Crohn in Frage [15, 18].

Die Therapie richtet sich wie beim Morbus Crohn nach der Krankheitsaktivität. Die aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) empfehlen im akuten Schub einer distalen Colitis topische Aminosalizylate, bei Versagen ergänzt durch topische Steroide. Bei einem schweren Schub sollten orale Steroide in Kombination mit lokaler Anwendung von Mesalazin gegeben werden. Bei einer ausgedehnten Colitis werden bei einem Schub leichter oder mittlerer Aktivität orale Aminosalizylate empfohlen. Bei Versagen dieser Therapie sowie bei einem schweren oder sogar fulminanten Schub sollten zusätzlich systemische Steroide eingesetzt werden. Im fulminanten Schub ist bei Versagen anderer Therapien auch Infliximab möglich [19], in der Akuttherapie kann auch Cyclosporin eingesetzt werden; ein Medikament der 2. Wahl stellt Tacrolimus dar. Zur Remissionserhaltung sind Aminosalizylate die erste Wahl, dabei ist eine Kombination mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin zu vermeiden. Im chronisch-aktiven Verlauf sollen topische Steroide bei distalem Befall angewandt werden, alternativ kommen Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Methotrexat in Frage [20-23]. Indikationen für eine chirurgische Intervention sind ein medikamentös therapierefraktärer Schub, ein toxisches Megakolon, eine anhaltende therapierefraktäre Blutung, eine gedeckte oder freie Perforation, ein kolorektales

Karzinom oder eine hochgradige intraepitheliale Neoplasie dar. Durch eine totale Proktokolektomie wird das Substrat der Erkrankung beseitigt und bezüglich der intestinalen Manifestation eine Heilung erreicht [24].

1.1.4. Die Vienna- und Montreal-Klassifikation

Zur Klassifikation der Krankheitsaktivität eignen sich die Vienna- und die Montreal-Klassifikation. Die Vienna-Klassifikation [25] klassifiziert die Aktivität eines Morbus Crohn bezüglich der Merkmale „Alter bei Diagnosestellung“ [unter 40 Jahre (A1), 40 Jahre oder älter (A2)], „Lokalisation“ [terminales Ileum (L1), Kolon (L2), Ileokolon (L3) und oberer-GI-Trakt (L4)] und „Krankheits-Verhalten“ [ohne Strikturen oder Penetration (B1), mit Strikturen (B2), penetrierend (B3)]. Daraus ergeben sich 24 Untergruppen.

Die Montreal-Klassifikation [26, 27] schließt neben dem Morbus Crohn auch die Krankheitsentität Colitis ulcerosa ein. Das Merkmal „Alter“ der Vienna-Klassifikation wird um die Gruppe der Patienten erweitert, bei denen die Krankheit unter 17 Jahren auftritt [unter 17 Jahren (A1), 17 – 40 Jahre A2), älter als 40 Jahre (A3)]. Die L4-Kategorie stellt in der Montreal-Klassifikation einen Modifikator dar, mit dem die Kategorien L1-3 bei einem zusätzlichem Befall des oberen Gastrointestinaltrakts ergänzt werden können. Zusätzlich werden den Kategorien B1-3 ein p vorangestellt, wenn begleitend ein perianaler Befall vorliegt. Die Colitis ulcerosa kategorisiert die Montreal-Klassifikation anhand der Merkmale „Ausdehnung“ [ulzerative Proktitis distal des rektosigmoidalen Übergangs (E1), linksseitige Colitis ulcerosa distal der linken Flexur (E2), Ausdehnung auch proximal der linken Flexur (E3)] und „Krankheits-Schwere“ [asymptomatisch bei vollständiger klinischer Remission (S0), milde Colitis ulcerosa mit höchstens vier Stühlen pro Tag und Abwesenheit von erhöhten Entzündungsmarkern und systemischer Beteiligung (S1), moderate UC mit mehr als vier Stühlen aber nur leichten Zeichen einer systemischen Toxizität (S2), schwere UC mit sechs oder mehr blutigen Stühlen mit einer Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$, Temperatur (T) $\geq 38,5^\circ\text{C}$, Hb $\leq 10,5 \text{ g}/100 \text{ ml}$ und einer Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) $\geq 30 \text{ mm}/\text{h}$ (S3)].

1.2. Pathogenese

1.2.1. Aktueller Forschungsstand

Bis heute ist die Pathogenese des Morbus Crohn beziehungsweise der Colitis ulcerosa nicht vollständig geklärt. Es werden genetische Faktoren sowie verschiedene Umweltfaktoren diskutiert. Nach dem aktuellen Forschungsstand geht man davon aus, dass die dynamische Balance der normalen intestinalen bakteriellen Flora und der Immunantwort der Mucosa eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt [28].

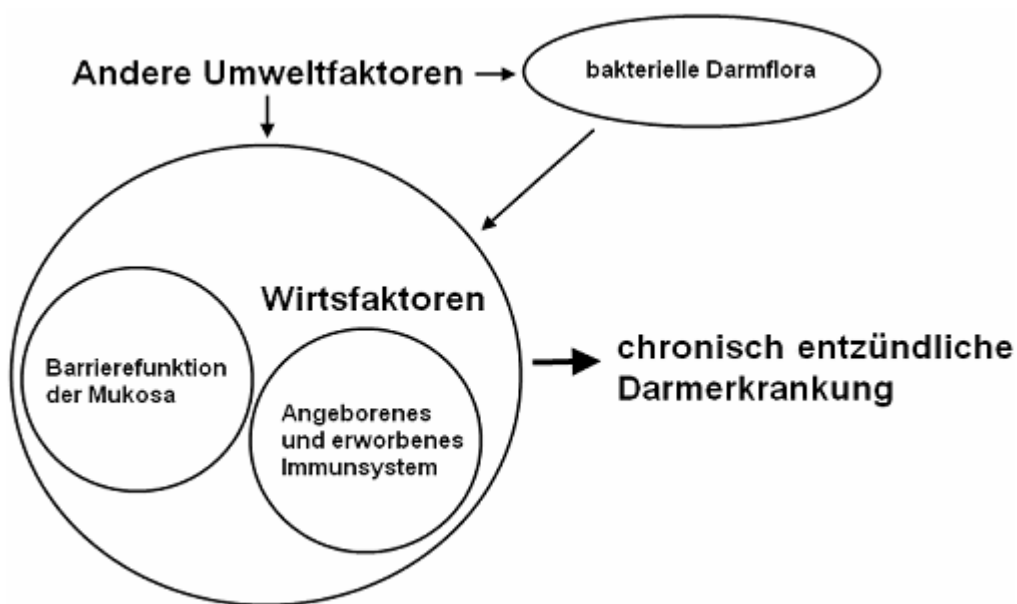


Abbildung 1.1 Modell zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED): CED resultiert aus einer Veränderung der Interaktion zwischen bakterieller Darmflora und Mukosa [28]

1.2.2. Exogene Umweltfaktoren

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind vor allem Krankheitsentitäten in westlichen Industrieländern in Europa und Nordamerika [29]. Die höhere Inzidenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in industrialisierten Ländern und der deutliche Anstieg der Erkrankungsfälle in Ländern mit zunehmender Industrialisierung lassen vermuten, dass Umweltfaktoren in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen. Epidemiologische Studien zeigen darüber hinaus, dass Bevölkerungsgruppen, die von einer Region mit

niedriger Inzidenz und Prävalenz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen in eine Region mit hoher Inzidenz und Prävalenz übersiedeln, sich im Laufe der Zeit dem Risiko dieser Region anpassen [30]. Verschiedenste Umweltfaktoren wurden untersucht; von diesen erwiesen sich einige als assoziiert mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, jedoch wurde kein eindeutiger kausaler Zusammenhang gefunden [31].

Als gesicherte assoziierte Faktoren gelten das Rauchen und die Appendektomie. Rauchen ist mit einem um mehr als zweifach erhöhtem Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken, verbunden. Raucher zeigen in Studien einen vermehrten ilealen Befall und vermehrt Fisteln und Stenosen. Eine Appendektomie erhöht ebenfalls das Risiko für die Entwicklung eines Morbus Crohn [29].

Im Gegensatz dazu zeigt Rauchen einen protektiven Effekt gegenüber einer Erkrankung an Colitis ulcerosa. Ähnliche Zusammenhänge sind auch für die primär sklerosierende Cholangitis und die Pouchitis beschrieben. Auch der klinische Verlauf der Colitis ulcerosa wird durch das Rauchen beeinflusst. Ex-Raucher weisen eine um 50% höhere Hospitalisierungsrate gegenüber Rauchern oder Patienten auf, die nie geraucht hatten. Eine hochdosierte Nikotingabe erwies sich als günstig für Patienten mit milder bis moderater Colitis ulcerosa [31]. Fall-Kontroll-Studien zeigen auch, dass eine Appendektomie das Risiko an einer Colitis ulcerosa zu erkranken um 69% senkt, auch der klinische Verlauf wird positiv beeinflusst. Colitis ulcerosa manifestiert sich bei appendektomierten Patienten später und zeigt einen milderen Verlauf [29].

Verschiedene sozioökonomische Faktoren scheinen ebenfalls eine Rolle zu spielen. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen zeigen ähnlich wie Asthma, Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis eine inverse Beziehung zum Hygienestandard, ein niedriger Hygienestandard scheint vor der Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu schützen. Es wird angenommen, dass die verbesserte Hygiene die intestinale Flora verändert und dadurch die Exposition von bestimmten kritischen Bakterien gegenüber dem intestinalen Immunsystem vermindert ist [30]. Weiterhin weisen städtische Regionen ein höheres Risiko als ländliche Gegenden auf und ebenso zeigt sich in sozioökonomisch höheren Schichten ein höheres Risiko als in sozioökonomisch niedrigeren Schichten, an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu erkranken [32].

1.2.3. Darmflora

Der Gastrointestinaltrakt beherbergt eine komplexe und dynamische mikrobielle Flora. Im Kolon befinden sich insgesamt bis zu 10^{14} Bakterien und steuern bis zu 60% der Stuhlmasse bei. Über 400 bis 500 verschiedene Bakterienspezies sind vertreten, welche bei jedem Menschen hinsichtlich ihrer Zahl und Artenzusammensetzung verschieden sind. Diese individuelle Mikroflora des Gastrointestinaltrakts entwickelt sich beim Menschen nach der Geburt und ist abhängig von Umweltfaktoren, wie dem Geburtsmodus, den Hygienestandards, der Nahrungszusammensetzung und medikamentösen Behandlungen; und sie verändert sich auch im Laufe des Lebens [33].

Eine Reihe von experimentellen und klinischen Daten weist darauf hin, dass die die Darmschleimhaut besiedelnden Bakterien eine Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen. Diese Studien nehmen an, dass in bestimmten Individuen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sich als Ergebnis eines Toleranzverlustes gegenüber der normalen intestinalen Darmflora entwickelt. Die dadurch sich entwickelnde Immunantwort auf apathogene Darmbakterien führt daraufhin zu einer chronischen Entzündung. Das Kolon ist der Bereich des Gastrointestinaltraktes mit der höchsten Bakteriendichte und auch gleichzeitig der Bereich, der am häufigsten von einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung betroffen ist. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine bakterielle Flora Voraussetzung für die Entstehung einer Entzündung ist und diese bei keimfreien Tieren ausbleibt. Eine Besiedlung der zuvor keimfreien Tiere mit einer normalen Darmflora führt zu erneuter Entzündung [34]. Neuere Studien zeigten, dass in der Darmflora von Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollindividuen häufiger bestimmte *Escherichia coli*-Stämme, so genannte AIECs (adherent-invasive *E. coli*), vorkommen, denen es möglich ist, sich an das Epithel anzuheften und teilweise in das Epithel einzuwandern [35]. Außerdem zeigte sich, dass eine Verringerung der Bakteriendichte durch Antibiotika zu einer Verbesserung einer Colitis führt [31]. Außerdem führte die Gabe von Antibiotika in bestimmten Patientengruppen zu einer Besserung der klinischen Symptome bei Morbus Crohn [36]. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch gezielte Veränderung der Darmflora durch Probiotika, meist nichtpathogene milchsäureproduzierende Bakterien, eine Besserung der Symptomatik im Tiermodell und beim Menschen erreicht werden

kann; dabei wirken Probiotika vor allem bei Colitis ulcerosa, dagegen kaum beim Morbus Crohn [31].

1.2.4. Mukosales Immunsystem

Die Darmmukosa kommt mit einer Vielzahl von bakteriellen Antigenen wie Zellwandkomponenten bestehend aus Lipopolysacchariden und Peptidoglykanen sowie zahlreichen Antigenen aus der Nahrung in Kontakt und erfüllt somit die Funktion einer Barriere gegenüber dem luminalen Darminhalt. Zur Aufrechterhaltung dieser Barrierefunktion dienen vor allem die Tight Junctions. Diese bestehen aus verschiedenen Membranproteinen wie den Claudinen und den Occludinen, mit deren Hilfe sie den Zellzwischenraum verschließen und eine parazelluläre Diffusionsbarriere schaffen, die den Fluss von Molekülen über das Epithel kontrolliert [37]. Reguliert werden sie dynamisch durch verschiedene Zytokine wie Tumornekrose-Faktor α , Interleukin-17, Interferon- γ und Chemokinen. Die Rezeptoren und Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems sind über das Epithel in ständigem Kontakt mit der luminalen Darmflora [34]. So interagieren das angeborene und das erworbene Immunsystem ständig mit der anwesenden mikrobiellen Flora. Wichtig dabei ist, dass eine adäquate Antwort des Immunsystems stattfindet. Harmlose symbiotische Bakterien müssen toleriert, Pathogene dagegen erkannt werden und das Immunsystem muss entsprechend darauf reagieren. Störungen dieser Mechanismen können zu einer veränderten Immunantwort und zu einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung führen (siehe Abbildung 1.2).

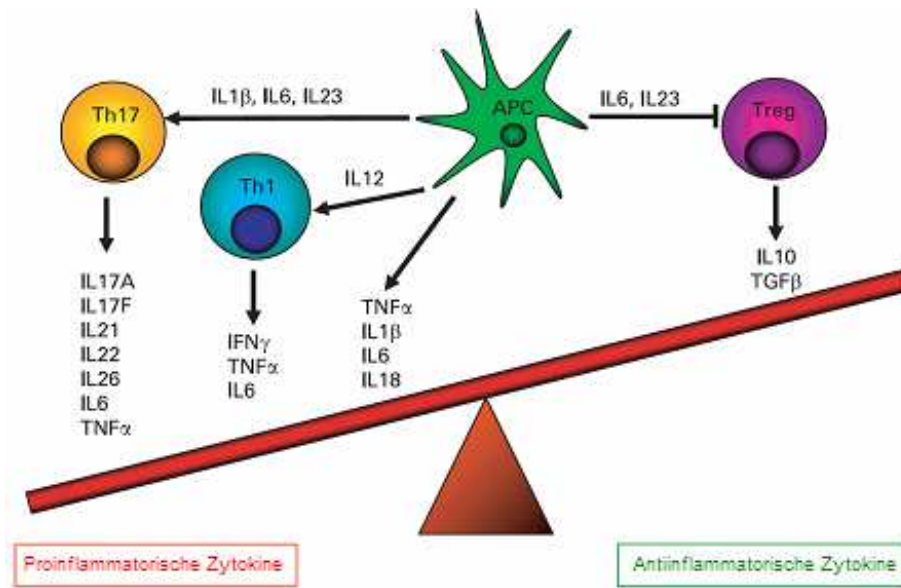


Abbildung 1.2 Ungleichgewicht zwischen anti- und proinflammatorischen Zytokinen beim Morbus Crohn [38]

Mäuse, die aufgrund eines Funktionsverlustes im N-Cadherin-Gen eine defekte Zelladhäsion der Epithelzellen aufweisen, entwickeln eine schwere Entzündung [39]. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigte sich eine Verminderung der Expression der Membranproteine E-Cadherin und β -Catenin [40]. Das angeborene Immunsystem der Mukosa übt seine Funktion durch eine Reihe verschiedener Zellen - Antigen-präsentierende Zellen (APC), Makrophagen und natürliche Killerzellen - und Rezeptoren - PRRs (Pattern recognition Receptors) - aus [28, 41, 42]. Ein wichtiger Vertreter der PRRs ist die Toll-Like-Rezeptor-Familie, die so genannte Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) von Krankheitserregern erkennen. 13 Mitglieder sind bis jetzt beim Säugern beschrieben, welche jeweils verschiedene Bestandteile wie Lipopolysaccharide, Lipoproteine, Peptidoglykane oder Flagellin erkennen [33]. Sie sind transmembranäre Rezeptoren, die bei Kontakt mit ihren jeweiligen Liganden intrazelluläre Signalwege wie den NF- κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer` of activated B-cells)- und MAPK (mitogen activated protein kinase)-Signalweg aktivieren, die ihrerseits im Zellkern eine Transkription von proinflammatorischen Genen aktivieren können [33]. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigt sich eine erhöhte Expression von TLR4 [43]. Neben diesen transmembranösen sind auch intrazelluläre Rezeptoren zur Erkennung von Bakterienbestandteilen bekannt. Zu diesen gehört NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2), das in Monozyten,

Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie auch in intestinalen Paneth- und Epithelzellen vorkommt und Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B als Antwort auf die Erkennung von bakteriellen Antigenen ausübt [44]. Mutationen in den Genen dieser Rezeptoren können dabei zu veränderten Antworten führen. Als erstes Suszeptibilitätsgen für den Morbus Crohn wurde das für den oben beschriebenen Rezeptor NOD2 kodierende Gen, welches auf Chromosom 16 lokalisiert ist, beschrieben. Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen weisen zwischen 17% und 40% der Patienten mit Morbus Crohn auf [45]. Es wird angenommen, dass die Mutationen in diesem Gen die Erkennung von bakteriellen Komponenten sowie die Antwort darauf verändern [46]. Neben den oben beschriebenen Komponenten des angeborenen Immunsystems gibt es noch eine Reihe weiterer Faktoren, bei denen ein Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen angenommen wird [42].

Obwohl die Reaktion des angeborenen Immunsystems eine Voraussetzung für die exzessive Aktivierung des erworbenen Immunsystems zu sein scheint, ist vor allem das Letztere für die Gewebeschäden verantwortlich. Dazu gehören mukosale B-Lymphozyten, verschiedene T-Lymphozyten-Populationen, hauptsächlich T_H1 -, T_H17 - und T_H2 -Zellen sowie regulatorische T/B-Zellen [28]. Beim Morbus Crohn findet vor allem eine T_H1 -Zell-Antwort statt, die durch IL-12 vermittelt wird und sich durch eine Produktion von IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF auszeichnet. Colitis ulcerosa ist typischerweise mit einer T_H2 -Zell-Antwort assoziiert, für die unter anderem eine Produktion von IL-4, IL-5, IL-13 charakteristisch ist [30, 41]. Neuere Studien zeigen jedoch mehr komplexe und signifikante Überschneidungen zwischen den beiden Krankheitsbildern [28]. Auch eine weitere Untergruppe der CD4 T-Zellpopulation, die T_H17 -Zellen, scheint an der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt zu sein. Diese Zellen produzieren die Effektor-Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und IL-26 und werden durch IL-23 reguliert, dessen Rezeptor ein Heterodimer aus den Untereinheiten IL-12RB1 und IL-23R ist [28, 38, 47]. Das Gen *IL23R*, das für die Rezeptoreuntereinheit IL-23R kodiert, wurde kürzlich als Suszeptibilitätsgen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen identifiziert [48]. Neben einer übermäßigen Aktivierung von T_H1 - und T_H2 -Zellen kann eine unphysiologische Entzündungskaskade auch durch eine Verminderung von Untergruppen der T-Suppressorzellen, den T_H3 - oder den T_{reg} -Zellen (regulatorische T-Zellen) ausgelöst werden. Diese produzieren antiinflammatorische Zytokine wie IL-

10 und TGF- β , welche auf die proinflammatorischen Zytokine der Effektorzellen einwirken können [30, 49].

1.2.5. Genetik

Epidemiologische Studien, Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien deuten darauf hin, dass genetische Faktoren eine bedeutende Rolle bei der Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen spielen.

1.2.5.1. Epidemiologie

In epidemiologische Studien zeigen sich Unterschiede in der Krankheitsinzidenz und -prävalenz in verschiedenen ethnischen Gruppen, eine Häufung in betroffenen Familien und erhöhte Konkordanzraten unter mono- und dizygoten Zwillingen. In den USA zeigen Nicht-Kaukasier eine niedrigere Prävalenz als Kaukasier. Bei Kaukasier beträgt die Prävalenz für chronisch entzündliche Darmerkrankung 43,6/100.000, bei Afroamerikanern 29,8/100.000, bei Hispaniern 4,1/100.000 und bei Asiaten 5,6/100.000 [50]. Die größte Prävalenz weisen in den USA jüdische Bevölkerungsgruppen auf; im Vergleich zu nicht-jüdischen Kaukasier haben diese eine zwei- bis vierfach erhöhte Inzidenz und eine zwei- bis neunfach erhöhte Prävalenz [51]. Neben der geografischen und ethnischen Verteilung zeigt sich auch in betroffenen Familien eine Häufung. In verschiedenen Studien weisen 5-10% der Patienten eine positive Familienanamnese auf [52]. Für Verwandte ersten Grades liegt das relative Risiko bei 10 für eine Erkrankung an Colitis ulcerosa und bei 14 für eine Erkrankung an Morbus Crohn [53]. In Familien mit mehreren Erkrankten weisen 75% die gleiche Krankheitsentität auf, in 25% treten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nebeneinander auf [32, 54]. Ein sehr hohes Risiko tragen die Ashkenazi-Juden; bei ihnen beträgt das Risiko für die Verwandten ersten Grades eines Patienten für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa 7,8% beziehungsweise 4,5%. Im Vergleich beträgt das Risiko für Verwandte bei nicht-jüdischen Kaukasier 5,2% für den Morbus Crohn beziehungsweise 1,6% für die Colitis ulcerosa [55]. In Zwillingsstudien zeigten monozygote Zwillinge eine Konkordanz für den Morbus Crohn von 42 bis 58%, bei dizygoten Zwillingen unterscheidet sich diese nicht von den bei Geschwistern beobachteten Werten. Bei Colitis ulcerosa liegt die

Konkordanz für monozygote Zwillinge bei 6 bis 17%, für dizygote Zwillinge bei 0 bis 5% [32, 56].

1.2.5.2. Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die oben beschriebene Häufung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in betroffenen Familien lässt den Schluss zu, dass Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen existieren und diese über Kopplungsanalysen identifiziert werden können. Ziel der Kopplungsanalyse ist die genetische Kartierung, das heißt die Identifizierung chromosomaler Regionen, in denen sich krankheitsverursachende Gene befinden. Dabei werden Chromosomenregionen gesucht, in denen untersuchte genetische Marker in Familien statistisch signifikant häufiger bei Merkmalsträgern auftreten und sich somit in einem Kopplungsungleichgewicht mit einem oder mehreren möglichen krankheitsrelevanten Genen befinden. Hierbei wird zugrunde gelegt, dass die Allele zweier auf einem Chromosom befindlicher Loci während der Meiose aufgrund ihrer physikalischen Nähe zueinander nicht unabhängig voneinander vererbt werden. Somit wird bei diesen Analysen das Kopplungsungleichgewicht über die gemeinsame Vererbung eines krankheitsassoziierten Gens mit einem polymorphen genetischen Marker überprüft. Verwendet dabei werden molekulare Marker wie etwa Mikrosatelliten und SNPs [57]. Tritt dabei ein bestimmtes Allel unter den Merkmalsträgern häufiger oder seltener auf als nach den Mendelschen Regeln erwartet, liegt ein Kopplungsungleichgewicht vor [58, 59]. Die identifizierten Kopplungsregionen sind meist mehrere Megabasen groß und müssen zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene mittels weiterer polymorpher Marker feinkartiert werden. Die bei Kopplungsanalysen untersuchten Personen sind entweder Trios, das heißt Erkrankte jeweils mit deren Eltern, oder erkrankte Geschwisterpaare. Im Falle von Trios wird untersucht, welche chromosomalen Regionen bevorzugt an die Erkrankten vererbt wurden, bei den erkrankten Geschwisterpaaren wird nach übereinstimmenden Chromosomenbereichen gesucht [55]. Identifizierte Suszeptibilitätsgene werden dann in weiteren Assoziationsstudien getestet.

In den letzten Jahren konnten einige Gene erfolgreich identifiziert werden, die zur Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen beitragen. Den initialen Erfolg hatten zwei Arbeitsgruppen mit der Identifikation von *NOD2/CARD15* als

Morbus Crohn-Suszeptibilitätsgen, das in der Kopplungsregion IBD1 lokalisiert ist. Seitdem wurden mehrere zusätzliche Prädispositionsloci gefunden und einige davon bereits durch Replikationsstudien bestätigt [28]. Nachfolgende Tabelle fasst bisher bekannte Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen zusammen:

Gen oder Locus	Genort	Funktion oder Gene in der Region	Assoziation	beteiligte Allele	Quelle
<i>NOD2</i>	16q12	intracellular sensor of peptidoglycan	MC	Arg702Trp, Gly908Arg, Leu1007fsinsC	[60, 61]
<i>IL23R</i>	1p31	IL-23 receptor	MC und CU	Arg381Gln, additional undefined alleles	[62, 63]
<i>ATG16L1</i>	2q37	Autophagy gene	MC	Ala197Thr	[64, 65]
<i>intergenic region</i>	5p13	? <i>PTGER4</i> ; <i>CARD6</i>	nur für Morbus Crohn beschrieben	-	[66]
<i>IBD5</i>	5q31	? <i>SLC22A4</i> , ? <i>SLC22A5</i> , ? <i>IRF1</i>	MC und CU	-	[67-69]
<i>MHC region</i>	6p21	Major histocompatibility complex	MC und CU	-	[70]
<i>PTPN2</i>	18p11	T-cell protein tyrosine phosphatase	nur für MC beschrieben	-	[71, 72]
<i>IL12B</i>	5q33	Interleukin-12/23 p40 subunit	nur für MC beschrieben	-	[71, 72]
<i>NKX2-3 region</i>	10q24	Gut immune development	nur für MC beschrieben	-	[71, 72]
<i>Intergenic region</i>	10q21	? <i>ZNF365</i> ; ? <i>EGR2</i>	nur für MC beschrieben	-	[65]
<i>Gene-rich region</i>	3p21	Many	nur für MC beschrieben	-	[71, 72]
<i>IRGM gene region</i>	5q33	Autophagy gene	nur für MC beschrieben	-	[71, 72]

Tabelle 1.1 Bestätigte Assoziationen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [47]

Eine neuere Studie von Barrett et al. identifizierte neben den bereits bekannten Genregionen (siehe Tabelle 1.1) weitere Suszeptibilitätsloci (siehe Tabelle 1.2):

SNP	Genort	Gene in der Region
rs2476601	1p13	<i>PTPN22</i>
rs2274910	1q23	<i>ITLN1</i>
rs9286879	1q24	-
rs11584383	1q32	-
rs10045431	5q33	<i>IL12B</i>
rs6908425	6p22	<i>CDKAL1</i>
rs7746082	6q21	-
rs2301436	6q27	<i>CCR6</i>
rs1456893	7p12	-
rs1551398	8q24	-
rs10758669	9p24	<i>JAK2</i>
rs17582416	10p11	-
rs7927894	11q13	<i>C11orf30</i>
rs11175593	12q12	<i>LRRK2,MUC19</i>
rs3764147	13q14	-
rs2872507	17q21	<i>ORMDL3</i>
rs744166	17q21	<i>STAT3</i>
rs1736135	21q21	-
rs762421	21q22	<i>ICOSLG</i>

Tabelle 1.2 Signifikante (Bonferroni $P < 0,05$) replizierte Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn [73]

Verschiedene Kopplungsanalysen postulieren einen Suszeptibilitätsloкус auf Chromosomenabschnitt 3p21-26, in dem unter anderem auf Abschnitt 3p25.2 das *PPARG*-Gen liegt [74-77]. Dessen Analogon PPAR- γ bei Mäusen identifizierten Sugawara et al. anhand der SAMP1/YitFc-Maus als neuen Suszeptibilitätsloкус für den Morbus Crohn. Die darauf folgende Testung von drei Polymorphismen innerhalb des menschlichen *PPARG*-Gens in einer Stichprobe von 134 Morbus Crohn-Patienten zeigte für zwei Polymorphismen eine starke Assoziation mit Morbus Crohn und identifizierte das *PPARG*-Gen als weiteres mögliches Suszeptibilitätsgen [78].

1.3. PPARs

1.3.1. Familie der nukleären Rezeptoren

PPARs (Peroxisome proliferator activated receptors) sind Transkriptionsfaktoren, die zur Familie der nukleären Rezeptoren (NHR; Nuclear Hormone Receptor) gehören. Zu dieser Familie der nukleären Rezeptoren zählen 48 Rezeptoren, beispielsweise der LXR (Oxysterol Liver X Receptor), VDR (Vitamin D Receptor), FXR (Bile Acid and Farnesol X Receptor) und TR (Thyroid Receptor) [79]. Diese werden durch verschiedenste endogene und exogene Liganden aktiviert und initiieren dadurch die Transkription einer Reihe von Genen. PPARs wurden 1992 im *Xenopus* entdeckt und nach seiner Fähigkeit benannt, die Proliferation von Peroxisomen auszulösen [80, 81]. Es wurden bisher drei PPARs identifiziert, PPAR- α (NR1C1), PPAR- δ/β (NR1C2) und PPAR- γ (NR1C3). Sie werden von verschiedenen Genen kodiert und stimmen zu 60-80% in ihrer Liganden- und DNA-Bindungsdomäne überein [82].

1.3.2. Struktur der PPARs

Alle drei PPAR-Isoformen besitzen ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften. Es wurden vier funktionelle Domänen identifiziert, A/B, C, D und E (siehe Abbildung 1.3). Der N-terminale A/B-Abschnitt besitzt den AF-1-Abschnitt (ligand-independent activation function 1), der für die Phosphorylierung von PPAR zuständig ist. Der C-Abschnitt ist die DNA-Bindungs-Domäne, die für die Bindung von PPAR an die für PPAR-spezifische Bindungsregion, das so genannte PPRE (Peroxisome proliferator response element), in der Promotorregion des Zielgens sorgt. Der D-Abschnitt ist eine Docking-Domäne für Kofaktoren. Der E-Abschnitt ist eine Liganden-Bindungs-Domäne (LBD). Er vermittelt die Ligandenspezifität und die Aktivierung der PPAR-Bindung an das PPRE und enthält zudem den AF-2-Abschnitt (ligand-dependent activation function 2), der für die Rekrutierung von Kofaktoren zuständig ist, welche am Transkriptionsprozess beteiligt sind [83].

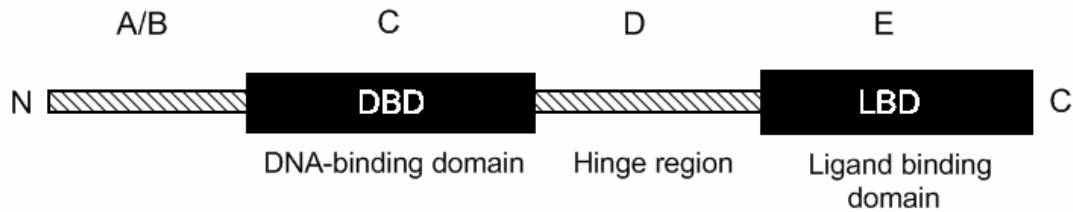


Abbildung 1.3 Schema der Struktur der PPAR-Familie [83]

1.3.3. Transkription der für die PPARs kodierenden Gene

Zur Aktivierung muss sich der PPAR im Zellkern über seine Liganden-Bindungs-Domäne mit RXR α (retinoid x receptor α), einem weiteren nukleären Rezeptor, zu einem Heterodimer zusammenlagern. Diese Heterodimerisierung ist Voraussetzung für die Bindung an das PPRE, für welche zusätzlich die Rekrutierung weiterer Kofaktoren notwendig ist [84]. Die PPRES bestehen aus DR-1-Elementen (Direct Repeat), welche aus zwei Hexanukleotidmotiven der Basensequenz AGGTCA, getrennt durch ein einzelnes Nukleotid, entsprechen.



Abbildung 1.4 zeigt die Hexanukleotidmotive AGGTCA der PPRES-Elemente, die durch ein Basenpaar getrennt sind [85]

Verschiedene Proteine fungieren als Koaktivatoren oder Korepressoren, welche den Transkriptionsprozess regulieren. Wenn kein Ligand gebunden ist, sind an das Heterodimer PPAR/ RXR α verschiedene Korepressoren wie NCoR (nuclear receptor co-repressor) oder SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor) gebunden, welche Histondeazetylaseaktivität besitzen und dadurch den Transkriptionsprozess inhibieren. Koaktivatoren wie SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) und PBP (PPAR binding protein) besitzen dagegen Histonzetylaseaktivität und vermitteln dadurch die über eine Reihe weiterer Reaktionen wie der Bindung verschiedener Liganden ablaufende Initiation der Transkription [86].

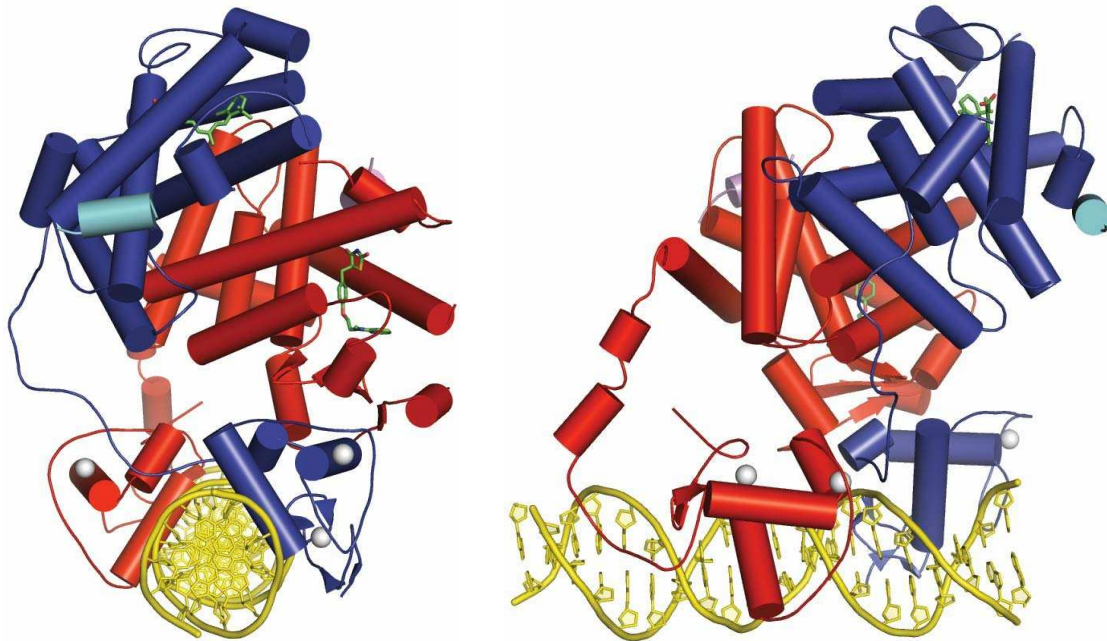


Abbildung 1.5 Dreidimensionale Bilder in zwei Ebenen eines PPAR- γ -RXR α -Komplexes mit Bindung an ein PPRE. PPAR- γ ist gelb, RXR α blau dargestellt. Die Liganden Rosiglitazone und 9-Cis-Retinoinsäure sind in grün, Zn(II)-Ionen weiß und der Coaktivator LXXLL-Peptid in hellblau und lila dargestellt [85]

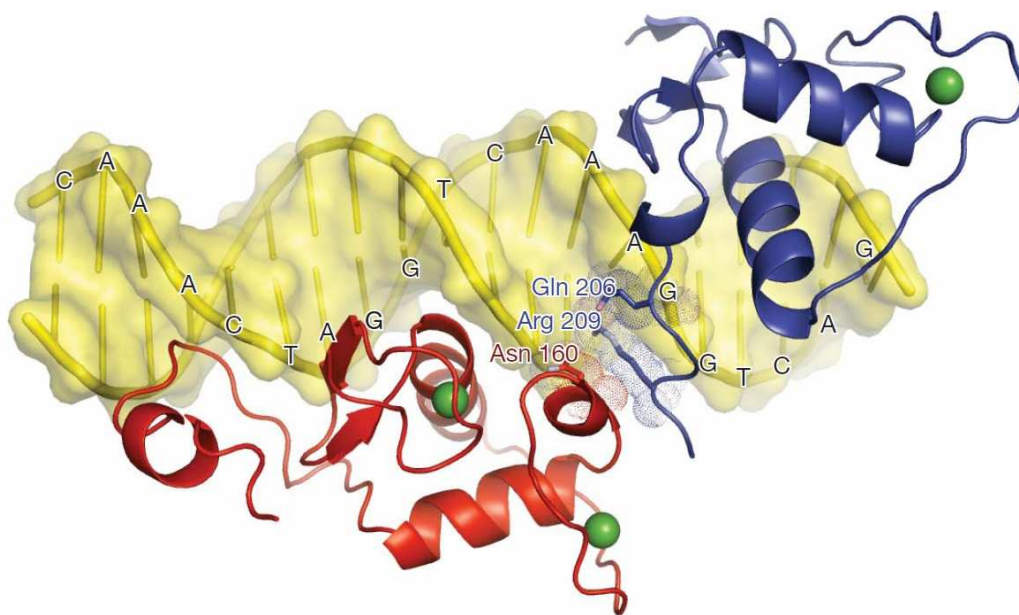


Abbildung 1.6 zeigt die DNA-Bindungs-Domänen (DBDs) sowie deren C-terminalen Verlängerung von PPAR- γ (rot) und RXR α (blau) [85]

1.3.4. PPAR- γ

PPAR- γ wird in vielen verschiedenen Zellarten des Menschen exprimiert (siehe Abbildung 1.4). Die höchsten Konzentrationen der PPAR- γ -mRNA-Expression wurden in Fettgewebe und Kolonepithel gefunden, in Niere, Leber und Dünndarm mittlere Konzentrationen und sehr niedrige Konzentrationen in Muskelgewebe und

Plazenta [87]. In verschiedenen myeloischen Zelllinien, Makrophagen und dendritischen Zellen findet ebenfalls eine Expression statt [79].

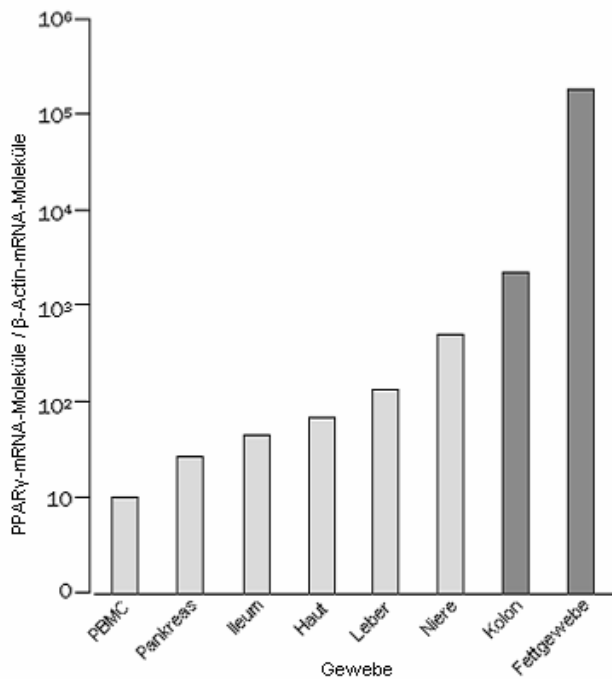


Abbildung 1.7 PPAR- γ -mRNA-Expression in verschiedenen Geweben. Die Expression wurde relativ zur β -Actin-Expression normalisiert [88]. Abkürzungen: PBMC, peripheral-blood mononuclear cells = Lymphozyten und Monozyten

Das *PPARG*-Gen umfasst die Exons A1, A2 und B, welche für untranslatierte Sequenzen kodieren sowie die proteinkodierenden Exons 1-6 (siehe Abbildung 1.8).

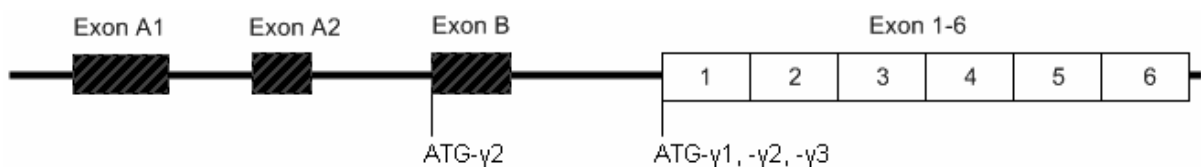


Abbildung 1.8 Genomische Organisation des humanen *PPARG*-Gens [82]

Der Gebrauch verschiedener Promotoren und alternatives Splicing lässt vier verschiedene mRNA-Isoformen entstehen: PPAR- γ 1, PPAR- γ 3 und PPAR- γ 4, welche für die gleiche Proteinsequenz kodieren, sowie PPAR- γ 2, dessen Proteinsequenz am amino-terminalen Ende zusätzlich 28 Aminosäuren enthält (siehe Abbildung 1.9). PPAR- γ 2 und PPAR- γ 3 kommen vor allem in Adipozyten vor, PPAR- γ 1 dagegen ubiquitär. Über die Expression von PPAR- γ 4 ist bis jetzt noch nichts

bekannt [82]. Abbildung 1.10 zeigt die dreidimensionale Struktur eines PPAR- γ -Proteins.

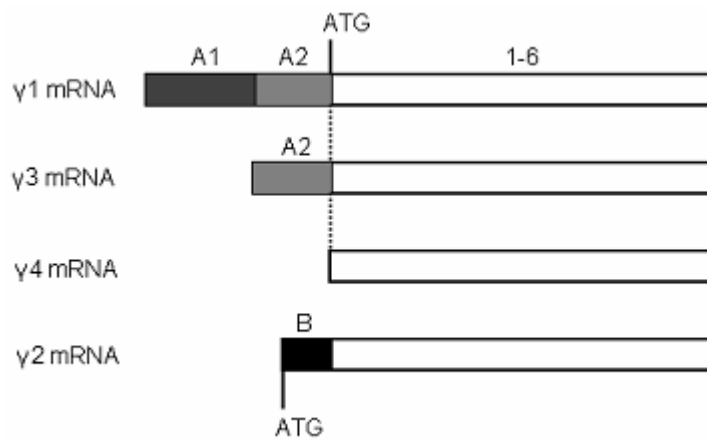


Abbildung 1.9 Die vier verschiedenen PPAR- γ -mRNA-Isoformen [82]

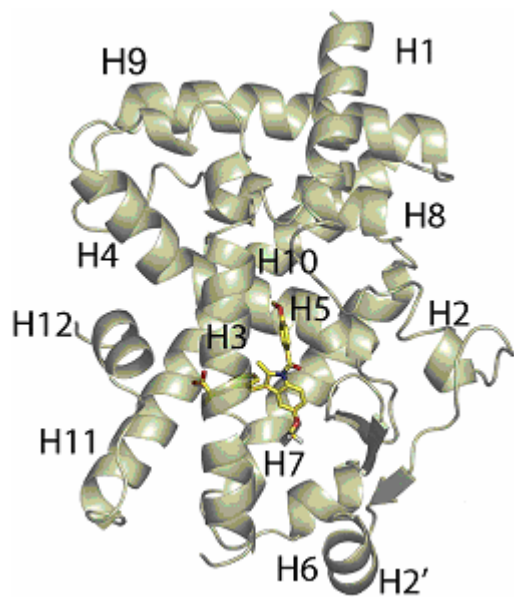


Abbildung 1.10 Dreidimensionales Bild der Struktur eines PPAR- γ -Proteins (graugrün) mit gebundenem MRL-20 (gelb) [89]

1.3.4.1. Regulation der PPAR- γ -Expression

Eine Reihe von natürlichen und künstlichen Liganden steuern die Expression von PPAR- γ . Die Bindungstasche von PPAR- γ ist mit 1500Å im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren relativ groß [79], so dass eine Bindung vieler verschiedener Liganden ermöglicht wird [90]. *In vivo* werden PPAR- γ -mRNA-Expression und –

Proteinexpression durch eine hypokalorische Diät, Fasten und bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 1 herunterreguliert und bei Adipositas und bei einer hohen Zufuhr von Fettsäuren hochreguliert. Natürliche Liganden sind ungesättigte Fettsäuren (α -Linolensäure, Eicosapentensäure und Docosahexensäure), Prostaglandinderivate (vor allem 15d-PGJ2 (15-deoxy- Δ -Prostaglandin-J2)) und Komponenten von oxidierten low-density-Lipoproteinen (LDL) wie die Metaboliten der Linolsäure 13-HODE (13-Hydroxyoctadecadienoic Säure) und 15-HODE (15-Hydroxyoctadecadienoic Säure) [87, 88, 90-92].

Thiazolidinedione sind potente synthetische PPAR- γ -Agonisten, die bereits eingesetzt werden, um den Blutzuckerspiegel bei Diabetes Typ-2 zu senken; Vertreter dieser Wirkstoffgruppe sind Troglitazone, Rosiglitazone und Pioglitazone (siehe Abbildung 1.11).

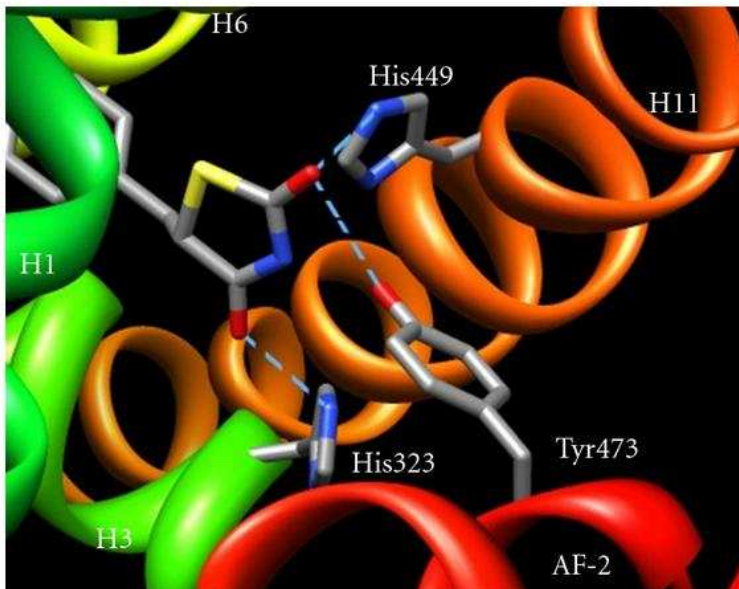


Abbildung 1.11 zeigt Rosiglitazone an die Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) von PPAR- γ gebunden. Helices sind mit H gekennzeichnet, gefolgt von einer Nummer. „Key residues“ von PPAR- γ , die bei der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind, sind gekennzeichnet. Die blauen gestrichelten Linien repräsentieren die Bindungsinteraktionen zwischen den Wasserstoffatomen von PPAR- γ und den Sauerstoffatomen des Ligands. [93]

PPAR- γ wird auch durch verschiedene nichtsteroidale Antiphlogistika aktiviert, wie zum Beispiel Indomethazin, Ibuprofen, Fenoprofen und Fluoromethyloxycarbonyl. 5-Aminosalicylsäure (5-ASA), welches schon lange in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verwendet wird, scheint ebenfalls antiinflammatorisch über PPAR- γ zu wirken [94]. Zusätzlich gibt es eine Reihe

weiterer PPAR- γ -Modulatoren, die als selektive PPAR Modulatoren (SPPARMs) bezeichnet werden [95].

Verschiedene Arbeiten diskutieren die Mitbeteiligung der intestinalen Mikroflora bei der Regulation der PPAR- γ -Expression. Es wurde gezeigt, dass das Kolon von Mäusen mit maustypischer oder menschlicher Flora im Vergleich zu solchen mit keimfreien Gastrointestinaltrakt eine höhere Expression von PPAR- γ -RNA und PPAR- γ -Proteinen aufweist [96]. Weitere Studien mit der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 und Magenkarzinomzelllinie Kato-III zeigen einen zwei- bis vierfachen Anstieg durch Lipopolysaccharide [96] und *Helicobacter pylori* [97]. Diese erhöhte Expression wird dabei durch TLR4- und I κ B β -abhängige Prozesse gesteuert [91, 96].

1.3.4.2. Funktionen von PPAR- γ

PPAR- γ ist ein essentieller nukleärer Rezeptor und kontrolliert die Expression einer großen Zahl von regulatorischen Genen des Insulin- und des Lipidstoffwechsels, wie auch der Inflammation und Zellproliferation [90, 98].

Während der Fettzellendifferenzierung steuert PPAR- γ die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten [99]; außerdem ist PPAR- γ an der Regulation des extrazellulären und intrazellulären Fettmetabolismus beteiligt. Die Gabe von Thiazolidinedionen wie etwa Rosiglitazone senkt die Plasmakonzentration an Triglyzeriden und freien Fettsäuren durch eine Beschleunigung des Katabolismus durch Induktion der Lipoproteinlipase in Adipozyten [82]. In Adipozyten wird der Einbau von Membranproteinen, die für den Transport von Fettsäuren über die Zellmembran zuständig sind, durch PPAR- γ -Aktivatoren vermittelt. Für die Behandlung von Diabetes mellitus sind bereits Medikamente, die so genannten Thiazolidinedione, zugelassen, welche als spezifische Liganden auf PPAR- γ wirken und dadurch erhöhte Spiegel von Glucose, Insulin und Triglyzeriden senken [82].

Zusätzlich wird PPAR- γ auch in verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert, wie beispielsweise Monozyten/Makrophagen sowie in dendritischen Zellen, Lymphozyten, Epithelzellen und Muskelzellen, Endothelzellen [90, 100]. PPAR- γ wirkt dabei auf zahlreiche Kinasen, Mediatoren und Transkriptionsfaktoren (siehe Tabelle 1.3).

Effekte von PPAR- γ und seiner Liganden auf die Produktion von:		
Zelltypen	Antiinflammatorischen Markern	Proinflammatorischen Markern
Makrophagen	\uparrow IL-1Ra	\downarrow IL-6, \downarrow IL-1 β , \downarrow IL-1, \downarrow IL-8, \downarrow IL-12, \downarrow TNF- α , \downarrow iNOS, \downarrow COX-2, \downarrow MMP-9, \downarrow CCR2, \downarrow SR-A
Th1-Zellen		\downarrow IL-2, \downarrow INF- γ , \downarrow TNF- α , \downarrow IL-12
Th2-Zellen	\uparrow IL-10, \uparrow IL-4, \uparrow GATA-3	

Tabelle 1.3 Effekte von PPAR- γ und seiner Liganden auf inflammatorische Zellen [79]. Abkürzungen: \downarrow , Inhibierung; \uparrow , Stimulation; IL, Interleukin; TNF- α , Tumornekrosefaktor- α ; iNOS, induzierbare NO-Synthase; COX-2, Cyclooxygenase-2; MMP-9, Matrixmetalloproteinase 9; CCR2, Chemokin-(C-C motif)-Rezeptor 2; SR-A, Scavenger-Rezeptor-A; GATA-3, Zinkfinger-Transkriptionsfaktor GATA - 3

PPAR- γ -Liganden zeigen antiinflammatorische Effekte in Modellen für Krankheitsbilder wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Atherosklerose, gewichtsinduzierte Insulinresistenz, Psoriasis, Arthritis, allergische Enzephalomyelitis, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer [100]. Initial wurde ein Antagonismus von PPAR- γ und dem proinflammatorischen Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) beschrieben [82, 101]. Weiterhin beeinflusst PPAR- γ die Expression von NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), der Protoonkogen-Proteine c-Jun und c-Fos und NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) [92]. Ricote et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass PPAR- γ in aktivierten Makrophagen hochreguliert ist und PPAR- γ -Liganden die Induktion der Gentranskription von iNOS (inducible nitric oxide synthase), MMP-9 (Matrixmetalloproteinase 9=Gelatinase-B) und Scavenger-Rezeptor A hemmen. Es zeigte sich, dass PPAR- γ die Transkriptionsaktivität der betreffenden Gene durch Interaktion mit Transkriptionsaktivatoren wie AP-1 (activator protein 1), NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und STAT1 (signal Transducer and activator of transcription-1) beeinflusst [102]. Darüber hinaus regulieren PPAR- γ -Agonisten die Proliferation von T-Lymphozyten; nach einer T-Zell-Aktivierung können PPAR- γ -Liganden IL-2 (Interleukin-2) und IFN- γ (Interferon- γ) blockieren. In dendritischen Zellen inhibieren PPAR- γ -Liganden die Produktion von IP-10 (interferon-gamma-inducible protein-10), CCL5 (CC chemokine ligand 5=RANTES), MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α) und IL-12 (Interleukin-12). Die Inhibierung proinflammatorischer Signalwege findet dabei durch verschiedene molekulare Mechanismen statt; so kann PPAR- γ einen Transkriptionsfaktor entweder direkt binden, die Aktivität von Kinasen regulieren oder

mit Coregulatoren interagieren. Dies alles deutet darauf hin, dass eine Aktivierung von PPAR- γ einen großen Einfluss auf die lokale Immunantwort hat, das scheint auch die Progression der Inflammation bei chronisch entzündlichen Erkrankungen zu betreffen [100]. Daher wird bei verschiedenen Krankheitsbildern wie Hyperlipidämie, Atherosklerose, inflammatorische Arthritis, Psoriasis, Leberfibrose, Autoimmunenzephalitis, Multipler Sklerose wie auch bei der Entstehung verschiedener Tumoren eine Mitbeteiligung von PPAR- γ angenommen [79, 90, 91, 103].

Besonders die Rolle von PPAR- γ bei Diabetes mellitus wurde bereits sehr intensiv erforscht [104]. Wie bereits weiter oben erwähnt erhöhen die PPAR- γ -Agonisten Thiazolidinedione den Glukose-Metabolismus und vermindern die hepatische Glukoseexkretion [105]. Auch im Skelettmuskel erhöht PPAR- γ die Glukoseaufnahme und senkt so den Blutzuckerspiegel [106]. Es wird angenommen, dass PPAR- γ durch eine Erhöhung und Veränderung der Adipozytokin-Expression (wie zum Beispiel von Adiponektin) die Insulinsensitivität erhöht [107]. Darüber hinaus fördert eine PPAR- γ -Aktivierung die Aufnahme von Fettsäuren in Adipozyten und schützt dadurch Insulin-sensitives Gewebe vor lipotoxischen Schäden [108].

1.3.4.3. Bedeutung von PPAR- γ für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

An verschiedenen Mausmodellen wurde die Rolle von PPAR- γ an der Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung bereits untersucht [109]. Einen Hinweis, dass PPAR- γ bei der Regulation einer intestinalen Entzündung eine Rolle spielen könnte, lieferte die Reduktion der Schwere der Colitis durch die Gabe von synthetischen PPAR- γ -Agonisten wie Rosaglitazon und Troglitazon bei Mäusen mit durch Dextransodiumsulfat (DSS) ausgelöster experimenteller Colitis [110]. Vergleichbares zeigte sich in einem anderen Mausmodell mit einer durch TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) ausgelösten experimentellen Colitis. Diese Studien zeigen, dass Thiazolidinedione präventiv oder während des Experiments verabreicht einen therapeutischen Effekt in Form einer Reduktion des Schweregrades der makroskopischen und histologischen Läsionen und eine Reduktion der Konzentration proinflammatorischer Marker wie NF- κ B sowie der Mortalität bewirken.

PPAR- γ ^{+/-}-C57BL/6-Mäuse, in denen durch DSS-Gabe eine experimentelle Colitis ausgelöst wurde, entwickeln im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von gesunden C57BL/6-Mäusen eine schwerere Colitis [111]. Außerdem zeigte sich in diesen Modellen ein therapeutischer Effekt durch die Gabe von PPAR- γ -Agonisten wie Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon analog zur Studie von Su [92]. Ebenso zeigten Mäuse mit einer gezielten Ausschaltung von PPAR- γ in Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Suszeptibilität für eine Colitis; dies deutet auf eine antiinflammatorische Rolle für PPAR- γ in Makrophagen hin [110]. In der Studie von Saubermann et al. konnte an einem C57BL/6-Mausmodell einer durch DSS induzierten Colitis demonstriert werden, dass es durch PPAR- γ -Agonisten zu einer Verschiebung von einer Th1-Antwort zu einer Th2-Antwort kommt, dabei kommt es zu einem Anstieg von IL-10 und IL-4 sowie einem Abfall von IFN- γ und TNF- α [111]. Einen Überblick über die bis zum jetzigen Zeitpunkt veröffentlichten Studien, die sich mit den prophylaktischen oder therapeutischen Effekten von PPAR- γ im Tiermodell beschäftigen, gibt folgende Tabelle:

Modell	Modulator	Effekte	Referenz
Akute Colitis			
DSS	Troglitazon	Entzündungsreduktion in Kolonepithelzellen durch Inhibierung von NF- κ B	[92]
	Rosiglitazon	Verschiebung der Th-1- zu einer Th2-Antwort	[111]
	Pioglitazon	Reduktion der Th1-Antwort durch Reduktion von CXCL10	[112, 113]
	CLA	Verbesserung einer Kolitis durch Reduktion inflammatorischer Zytokine und Induktion antiinflammatorischer Zytokine	[114]
TNBS	Troglitazon Rosiglitazon	Makroskopische und mikroskopische Reduktion der Kolitis	[115]
	Pioglitazon	Reduktion der Th1-induzierten Inflammation durch Reduktion von CXCL10	[113]
	FMOC-L-leu	FMOC-L-leu ist Modulator der PPAR- γ -Expression	[116]
	5-ASA	5-ASA wirkt antiinflammatorisch durch PPAR- γ	[94]
Ischämie/ Reperfusion	Rosiglitazon 15-d-PGJ2	Schutz des betroffenen Gewebes durch PPAR- γ -Liganden	[117] [118]
	NS-398	Verminderung der COX-2-Expression und dadurch Schutz des betroffenen Gewebes	[119]
	Glutamin	Schutz des betroffenen	[120]

		Gewebes durch luminale Verabreichung von Glutamin	
Bakterieninduzierte Colitis	CLA	Reduktion der Entwicklung von inflammatorischen Läsionen und Wachstumsretardierung	[121]
Chronische Colitis			
DSS	Troglitazon	PPAR- γ -Liganden können frühe Stadien der Tumorgenese im Kolon mit oder ohne Kolitis verhindern	[122]
TNBS	Rosiglitazon	Protektive Effekte bei chronischer experimenteller Colitis	[123]
CD4+CD45RBhigh	CLA	CLA mindert die Schwere der Colitis durch einen PPAR- γ -abhängigen Mechanismus	[114]
IL-10 KO	Rosiglitazon	Rosiglitazon erhöht die PPAR- γ -Expression, verlangsamt das Auftreten der spontanen Colitis und verzögert die Kryptenhyperplasie	[124]
SAMP1/YitFc	Rosiglitazon	Reduktion der Entwicklung von inflammatorischen Läsionen	[78]
Knockout Mausmodelle			
PPAR- γ +/-		Knockout-Mäuse entwickelten ein schwereres Krankheitsbild als die Wildtyp-Mäuse	[111, 115, 117]
Ad PPAR- γ		Gentherapie mittels Viren als Vektor führte zu einer Erhöhung der PPAR- γ -Protein-Expression und dadurch zu einer Verminderung der Gewebsentzündung	[125]
SAMP1/YitFc		SAMP1/YitFc-Mäuse mit fehlerhafter PPAR- γ -Protein-Expression entwickelten eine schwerere Entzündung als gesunde Kontroll-Mäuse	[78]
PPAR- $\gamma^{fl/fl}Cre^+$		Knockout-Mäuse zeigten im Gegensatz zu gesunden Kontroll-Mäusen kein Ansprechen auf die Therapie mit CLA	[114]
PPAR- $\gamma^{\Delta EpC}$	DSS	Knockout-Mäuse zeigten eine erhöhte Suszeptibilität für eine DSS-induzierte Colitis	[103]

Tabelle 1.4 Antiinflammatorische Effekte von PPAR- γ in Tiermodellen [98]. Abkürzungen: 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; 15-d-PGJ2, 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2; CLA, conjugated linoleic acid; DSS, dextran sodium sulphate; FMOC-L-leu, fluorenylmethyloxycarbonyl-L-leucine; IL-10 KO, interleukin10 knockout mice; PPAR- $\gamma^{fl/fl}Cre^+$, PPAR- γ conditional knockout mice; TNBS, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; CXCL10, Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; COX-2, Cyclooxygenase-2

Bei Colitis ulcerosa-Patienten fand man eine um 60% reduzierte Expression von PPAR- γ -mRNA und PPAR- γ -Protein im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und zu Morbus Crohn-Patienten. Dies betraf nur die Epithelzellen sowohl der entzündeten wie auch der nicht entzündeten Kolonabschnitte. Andere Zelltypen wie zum Beispiel periphere mononukleäre Zellen wiesen bei den Patienten wie bei den Kontrollen vergleichbare Expressionen auf [96]. In einer Studie von Lewis et. al. wurde 15 Patienten mit milder bis moderat aktiver Colitis ulcerosa über zwölf Wochen der PPAR- γ -Ligand Rosiglitazon verabreicht. Bei vier dieser Patienten kam es zu einer klinischen Remission, von denen drei auch eine endoskopisch nachweisbare Remission zeigten, vier weitere Patienten zeigten klinisch zumindest eine Verbesserung. Die spontane Remissionsrate unter Placebo-Gabe lag zum Vergleich bei 10% [126]. Eine aktuelle Studie zeigt, dass PPAR- γ bei der Steuerung der epithelialen Expression der β -Defensine mDefB10 bei der Maus und DEFB1 beim Menschen beteiligt ist. *Pargy*-mutierte Mäuse weisen eine erniedrigte mDefB10-Expression und eine fehlerhafte Abwehr von bestimmten Bakterien inklusive *Candida albicans*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* auf. Weiterhin zeigen Morbus Crohn-Patienten mit Kolonbeteiligung eine signifikant erniedrigte DEFB1-Expression [127].

1.3.4.4. Vorbefunde zu Polymorphismen im *PPARG*-Gen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Sugawara und seine Mitarbeiter führten eine genomweite Kopplungsanalyse bei der SAMP1/YitFc-Maus durch, die spontan eine Ileitis entwickelt, die zahlreiche Charakteristiken des Morbus Crohn beim Menschen aufweist. Diese Analyse identifizierte einen Suszeptibilitätslocus in einem Bereich auf Chromosom 6, in dessen Bereich das *Pparg*-Gen liegt. Um eine Beziehung zwischen *PPARG*-Allelen und Morbus Crohn beim Menschen zu testen, identifizierten sie die drei Einzelnukleotidpolymorphismen im *PPARG*-Gen SNP1=rs2067819=G12350898A, SNP2=rs3892175=G12359887A und SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His, bei denen das Minor-Allel in mindestens 10% der 125 untersuchten gesunden Probanden vorkommt (siehe Abbildung 1.12) [78]. SNP1 und SNP2 befinden sich im Intron zwischen Exon A2 und dem kodierenden Exon 1, SNP3 befindet sich im Bereich des Exons 6. Die Allelfrequenzen von SNP1 und SNP2 unterschieden sich

dabei in einer daraufhin untersuchten Kohorte von 134 Patienten mit Morbus Crohn signifikant von der der Kontrollgruppe ($p=3,76 \times 10^{-6}$ für SNP1, $p=1,11 \times 10^{-3}$ für SNP2). SNP3 zeigte nur eine tendenzielle, nicht signifikante Assoziation mit Morbus Crohn ($p=0,053$).

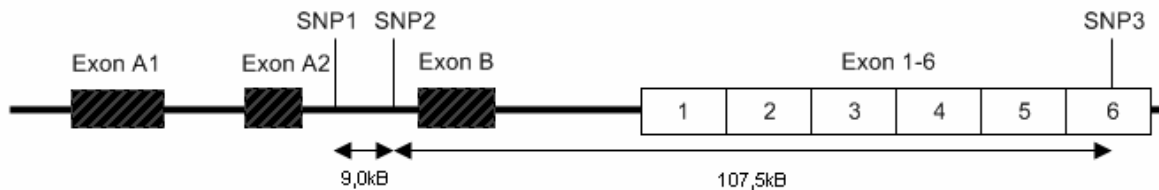


Abbildung 1.12 Lokalisation von SNP1-3 im *PPARG*-Gen [78]

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich aus der Sicht möglicher genetischer Assoziationen Hinweise für eine Rolle von Polymorphismen im *PPARG*-Gen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ergeben.

Folgende Polymorphismen wurden im Sinne einer Replikationsstudie der vorgeschriebenen Assoziationen durch Sugawara et al. ausgewählt:

1. SNP1=rs2067819=G12350898A
2. SNP2=rs3892175=G12359887A
3. SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His

Folgende Ziele wurden dabei verfolgt:

1. Als erstes Ziel sollten die Genotyp- und Allelfrequenzen dieser Polymorphismen in einer Gruppe von Patienten mit Morbus Crohn und einer Gruppe von Patienten mit Colitis ulcerosa ermittelt werden. Diese Allelfrequenzen sollten mit der einer Gruppe aus gesunden, unverwandten Kontrollpersonen verglichen werden um festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied besteht und somit eine Auswirkung auf die Krankheitssuszeptibilität mit einem der beiden Krankheitsbilder vorliegt.
2. Weiterhin sollte untersucht werden, ob bestimmte Haplotypen Assoziationen mit einem der Krankheitsbilder zeigen. Dazu sollten Haplotypen bestehend aus den drei Polymorphismen SNP1, SNP2 und SNP3 in den beiden

Patientengruppen und der Kontrollpopulation berechnet und auf eine signifikante Assoziation mit einem der beiden Krankheitsbilder getestet werden.

3. Neuere Studien zeigen in *ATG16L1*-defizienten Paneth-Zellen eine vermehrte Expression von am PPAR-Signalweg beteiligten Genen [128] sowie eine Autophagie-Induktion durch PPAR- γ [129], daher sollten die drei SNPs im *PPARG*-Gen auf Epistasie mit dem bereits etablierten Suszeptibilitätsgen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen *ATG16L1* untersucht werden.
4. Außerdem sollte für die drei SNPs im *PPARG*-Gen eine Genotyp-Phänotyp-Analyse bezüglich einer ilealen Beteiligung vorgenommen werden.

2. Material

2.1. Studienpopulation

2.1.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 616 Patienten mit Morbus Crohn und 365 Patienten mit Colitis ulcerosa. Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie war eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien gesicherte Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung mit einer eindeutigen Zuordnung entweder zum Krankheitsbild des Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa. Die Patientenproben stammen aus der Medizinischen Klinik beziehungsweise der Medizinischen Poliklinik – Standort Innenstadt und aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Standort Großhadern, Klinikum der Universität München, sowie dem Klinikum der Universität Bochum. Alle Patienten wurden über Inhalt und Ziele der Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Teilnahme an der Studie. Als Material zur DNA-Isolierung wurde venös entnommenes Vollblut verwendet.

2.1.2. Kontrollkollektiv

Als Kontrollkollektiv dienten 1280 gesunde, unverwandte Blutspender. Diese wurden von Blutspendediensten in der Stadt München und Essen zur Verfügung gestellt. Die Basisdaten der Kontrollgruppe und der Patientengruppen sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet.

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Kontrollgruppe
Anzahl	616	365	1280
Altersdurchschnitt ± Standardabweichung (Jahre)	39,8 ± 13,0	41,3 ± 13,8	45,8 ± 10,7
Altersverteilung (Jahre)	15 - 76	7 - 81	18 - 71
Geschlechtsverhältnis			
männlich %	47,7	51,6	62,9
weiblich %	52,3	48,4	37,1

Tabelle 2.1 Basisdaten der Studienpopulation

2.2. Kits und Chemikalien

2.2.1. Materialien für die DNA-Isolierung

Folgende Materialien wurden für die DNA-Isolierung verwendet:

Ethanol absolut	100%	Merck
Isopropylalkohol (2-Propanol)	100%	Merck
Proteinase K	20 mg/ml	Qiagen
QIAamp® DNA Blood Mini Kit		Qiagen
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 400 mM NaCl 1 mM EDTA	Apotheke des Klinikums der LMU München
Kernlysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8 400 mM NaCl 10 mM EDTA	Apotheke des Klinikums der LMU München
gesättigte Natriumchloridlösung	5 M NaCl	Apotheke des Klinikums der LMU München
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	20 %	Apotheke des Klinikums der LMU München
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 1 mM EDTA	Apotheke des Klinikums der LMU München

Tabelle 2.2 Materialien für die DNA-Isolierung

2.2.2. Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte

Folgende Materialien wurden für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte verwendet:

Aqua ad injectabile		Braun
Deoxynukleotid-Mix (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	10 mM	Sigma
HotStarTaq™ DNA-Polymerase	5 U/μl	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit		Qiagen

Tabelle 2.3 Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte

2.2.3. Materialien für den Restriktionsverdau

Folgende Restriktionsenzyme wurden für den Restriktionsverdau verwendet:

HpyCH4IV	10 U/μl	New England BioLabs
HhaI	20 U/μl	New England BioLabs

Tabelle 2.4 Verwendete Restriktionsenzyme für den Restriktionsverdau

Nachfolgende Tabelle zeigt die für den Restriktionsverdau verwendeten Restriktionspuffer:

NEBuffer 1	10 mM Bis-Tris-Propan-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol	New England BioLabs
NEBuffer 4	20 mM Tris-Acetat 50 mM Kaliumacetat 10 mM Magnesiumacetat 1 mM Dithiothreitol	New England BioLabs

Tabelle 2.5 Verwendete Restriktionspuffer für den Restriktionsverdau

2.2.4. Materialien für die Agarosegelelektrophorese

Folgende Materialien wurden für die Agarosegelelektrophorese verwendet:

100 bp DNA Molekulargrößenstandard	100-1000 bp	Cambrex
Agarose, Typ I-A		Sigma
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Sigma
10 × TBE:	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH	Apotheke des Klinikums der LMU München
DNA-Auftragspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8 2 mM EDTA 20 % Ficoll 400 0,25 % Orange G	Apotheke des Klinikums der LMU München

Tabelle 2.6 Materialien für die Agarosegelelektrophorese

2.3. Primer für die Sequenzierung und Klonierung

Alle Primer wurden anhand der im Abschnitt 3 angegeben Nukleotidsequenz ausgesucht. Die Qualität der Primer und deren Kompatibilität wurden mit Hilfe des

Programms Fast-PCR© (1999-2003) überprüft. Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB-MOLBIOL, Berlin, synthetisiert.

2.3.1. Primer für *PPARG* SNP1 (rs2067819)

Nachfolgende Tabelle zeigt die Nucleotidsequenz der verwendeten Primer für *PPARG* SNP1:

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
PPARG1-1-5'	CAGTTACCGTATATACATCACTTGGC
PPARG1-1-3'	CCTCTCTTGGCAATTTATCTGAAG

Tabelle 2.7 Primer für *PPARG* SNP1 (rs2067819)

2.3.2. Primer für *PPARG* SNP2 (rs3892175)

Nachfolgende Tabelle zeigt die Nucleotidsequenz der verwendeten Primer für *PPARG* SNP2:

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
PPARG1-2-5'	GATACACAATATGCGTTTTCCAGACCAC
PPARG1-2-3'	TCAAGGATAATCTATGAACTTGAAGCTTAGTACT

Tabelle 2.8 Primer für *PPARG* SNP2 (rs3892175)

2.3.3. Primer für *PPARG* SNP3 (rs3856806)

Nachfolgende Tabelle zeigt die Nucleotidsequenz der verwendeten Primer für *PPARG* SNP3:

Name	Sequenz (5'→3'-Richtung)
PPARG1-3-5'	CCCATTGAAGACATTCAAGACAACCTGC
PPARG1-3-3'	GCTCAGGACTCTCTGCTAGTACAAGTCC

Tabelle 2.9 Primer für *PPARG* SNP3 (rs3856806)

2.4. Geräte

Brutschränke	Memmert und Techne
Elektrophoresekammer	Sub-cell® GT, BioRad
Mikrowellenofen	Bosch

Mikrozentrifuge	Modelle SD und AL, Roth
Video-Geldokumentationssystem	Infinity 3000, Vilber Lourmat
Rotator	Bachofer
Spannungsquelle	Power Pac 300, BioRad
Spectrophotometer	GeneQuant pro, Amersham Pharmacia
Thermocycler	PTC 220 Dyad, MJ Research
Tischzentrifuge	Universal 30RF, Hettich
Vortex-Schüttler	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge	Rotixa/P, Hettich

Tabelle 2.10 Verwendete Geräte für die DNA-Isolierung, die Polymerasekettenreaktion, den Restriktionsverdau und die Agarosegelelektrophorese

3. Methoden

3.1. Allgemeine Vorgehensweise

Die Studienpopulation wurde auf der Ebene der genomischen DNA für die drei SNPs SNP1=rs2067819=G12350898A, SNP2=rs3892175=G12359887A und SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His im *PPARG*-Gen genotypisiert. Dazu wurden entsprechenden Bereiche der aus Leukozyten isolierten genomischen DNA, die den jeweiligen Polymorphismus beinhalten, zuerst mittels PCR vervielfacht. Diese Amplifikate wurde dann mit einem jeweils passenden Restriktionsenzym, welches nur eine der beiden Allelvarianten des Polymorphismus schneidet, verdaut. Mithilfe der Agarosegelelektrophorese kann das so verdaute Amplifikat sichtbar gemacht werden und anhand des entstandenen Bandenmusters der Genotyp der jeweiligen Probe bestimmt werden. Die Tests zur Genotypisierung der *PPARG*-SNPs auf Basis der Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP)–Analyse wurden im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelt und etabliert. Zur Validierung der Ergebnisse dieser Methoden wurden Stichproben für alle möglichen Genotypen mittels DNA-Sequenzierung durch ein kommerzielles Sequenzierunternehmen (Seqiserre, Vaterstetten) bestätigt.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung der genomischen DNA aus den Blutproben wurde mit einem kommerziellem Kit (QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen) durchgeführt. Den Patienten wurde unter Verwendung von 9 ml EDTA-Röhrchen (S-Monovette® 9 ml EDTA, Sarstedt) venös Vollblut abgenommen, am selben Tag bei 2000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert (Rotixa/P, Hettich) und anschließend das überstehende Plasma abpipettiert.

3.2.1.1. Isolierung der DNA aus Buffycoat mittels QIAamp® DNA Blood Mini Kit

Nach der Zentrifugation und der Abnahme des Plasmas wurden 200 µl der leukozytenreichen obersten Schicht des Sediments, der so genannte Buffycoat, in ein Reaktionsgefäß, das bereits 20 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) enthält,

überführt und 200 µl Lysepuffer AL dazugegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend auf dem Vortex-Schüttler gemischt und danach 10 Minuten im Wasserbad bei 56°C inkubiert. Dann wurden 200 µl 96%iges Ethanol hinzugegeben und auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Das entstandene Lysat wurde auf die dafür vorgesehene Säule übertragen und eine Minute lang bei 13000 Upm zentrifugiert. Die DNA bindet dabei an die Silica-Gel-Matrix der Säule. Die Säule wurde nun in zwei Zentrifugationsschritten mit Hilfe zweier unterschiedlicher Waschpuffer AW1 und AW2 gewaschen. Dazu wurde in einem ersten Schritt 500 µl AW2-Buffer auf die Säule gegeben und für eine Minute bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und in einem zweiten Schritt 500 µl AW2-Buffer auf die Säule gegeben. Dies wurde für 3 Minuten mit 13000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Um den ethanolhaltigen AW2-Buffer vollständig zu entfernen, wurde das Röhrchen für eine weitere Minute bei 13000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Die gereinigte DNA wurde nun durch Zugabe von Elutionspuffer (Buffer AE) von der Spinsäule eluiert. Dazu wurde die Säule zunächst in ein sauberes 1,5 ml-Gefäß überführt und 500 µl AE-Buffer direkt auf die Membran gegeben. Das Gefäß mit der Säule wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 13000 Upm zentrifugiert. Um die Konzentration weiter zu erhöhen, wurde das Eluat ein weiteres Mal auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die so erhaltene gereinigte DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, bei der diese ein Absorptionsmaximum aufweisen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz lässt sich dann aus dem gemessenen Extinktionswert die Konzentration berechnen:

$$c = \frac{E_{260} \cdot f}{\epsilon \cdot d}$$

Abbildung 3.1 Formel zur Berechnung der Konzentration der Nukleinsäuren

c	=	Konzentration (ng / μ l)
E_{260 nm}	=	gemessener Extinktionswert bei 260 nm
f	=	Verdünnungsfaktor
d	=	Schichtdicke (meist 1 cm)
ϵ	=	Extinktionskoeffizient: ds DNA: $50^{-1} \mu$ l / ng RNA: $40^{-1} \mu$ l / ng Oligonukleotide: $30^{-1} \mu$ l / ng

Tabelle 3.1 Begriffserklärung der in der Formel (siehe Abbildung 3.1) enthaltenen Abkürzungen

Für die Messungen wurden Verdünnungen von 1:20 bis 1:200 verwendet, so dass die Messwerte für die Extinktion zwischen 0,1 und 1 lagen, da nur in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration besteht. Für die PCR wurden die DNA-Konzentrationen mit Hilfe von TE-Buffer auf 100 ng/ μ l eingestellt.

3.2.3. Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht es, schnell und selektiv eine bestimmte Zielsequenz einer komplexen genomischen DNA exponentiell zu amplifizieren. Diese Methode besitzt eine hohe Sensitivität, da wenige Kopien der Zielsequenz als Vorlage ausreichen. Zusätzlich weist sie eine hohe Spezifität auf, da eine selektive Amplifizierung einer einzelnen Sequenz unter Millionen verschiedener Sequenzen möglich ist. Die Polymerasekettenreaktion läuft in drei Teilschritten ab, die zyklisch aufeinander folgend immer wieder durchlaufen werden:

1. Denaturierung:	Bei 94°C wird der DNA-Doppelstrang („double stranded (ds)-DNA“) in zwei Einzelstränge („single stranded (ss)-DNA“) denaturiert.
2. Primeranlagerung („Primer Annealing“):	Damit nur die erwünschte DNA-Teilsequenz vervielfältigt wird, müssen sich zwei etwa 18-35 Basen lange zu je einem der beiden Stränge des DNA-Doppelstrangs komplementäre und mit ihren 3'-Enden zueinander ausgerichtete Oligonukleotide als so genannte Primer an die zuvor denaturierte DNA binden.
3. Extension:	Nach Bindung der Primer kann eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C den zwischen den Primern gelegenen Abschnitt amplifizieren.

Tabelle 3.2 Darstellung der drei Teilschritte der Polymerasekettenreaktion

Im nächsten Zyklus dienen diese neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize für die weitere DNA-Synthese. Diese drei Teilschritte bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung („Primer-Annealing“) und Extension werden so oft wiederholt, bis die Zielsequenz zum Nachweis ausreichend vervielfältigt ist. Die Reaktionsfolge setzt sich im Einzelnen wie folgt zusammen:

Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1. Anfangsdenaturierung	95°C	15 min	1
2. Denaturierung	94°C	30 sec	35
3. Primer-Annealing	primerabhängig	30 sec	
4. Extension	72°C	von der Länge des Amplifikats abhängig	
5. Endextension	72°C	10 min	1

Tabelle 3.3 Darstellung der Reaktionsfolge der Polymerasekettenreaktion

Die erwartete Anlagerungstemperatur der Primer („Primer-Annealing“) wurde anhand der Schmelztemperaturen (T_m) der beiden Oligonukleotide berechnet (in der Regel 5°C unter der Schmelztemperatur). Die optimale Annealing-Temperatur wurde anschließend durch Austestung mindestens dreier verschiedener Temperaturen zwischen 55°C und 65°C ermittelt. Die Zeit für die Extension (4.) ist von der Länge des Amplifikats abhängig, sollte mindestens jedoch 30 Sekunden betragen. Während der Endextension (5.) sollen alle noch nicht komplett amplifizierten PCR-Produkte vervollständigt werden. Ein 10 µl-PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

	Konzentration (Stammlösung)	Endkonzentration	Volumen
PCR-Puffer	10x	1 x (=1,5 mM MgCl ₂)	1 µl
dNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
3'-Primer	100 µM	0,25 µM	0,025 µl
5'-Primer	100 µM	0,25 µM	0,025 µl
DNA-Polymerase	5 U/µl	0,025 U/µl	0,05 µl
MgCl ₂	25 mM	primerabhängig	primerabhängig
H ₂ O			ad 9,5 µl
Σ			9,5 µl
DNA	100 ng/µl		0,5 µl
Endvolumen			10 µl

Tabelle 3.4 Verwendete Materialien für den PCR-Ansatz

Die passende $MgCl_2$ -Konzentration, die in der Regel zwischen 1,5 mM und 5 mM liegt, wurde durch Austesten ermittelt. Folgende Tabelle gibt die jeweilige $MgCl_2$ -Konzentration, Annealing-Temperatur und Produktlänge des Amplifikats der untersuchten Zielsequenzen wieder:

<i>PPARG</i> SNP	$MgCl_2$ -Konzentration	Primer-Annealing-Temperatur T°C	Produktlänge (bp)
SNP1=rs2067819	3 mM	65°C	274 bp
SNP2=rs3892175	3 mM	65°C	358 bp
SNP3=rs3856806	1,5 mM	65°C	237 bp

Tabelle 3.5 $MgCl_2$ -Konzentration, Annealing-Temperatur und Produktlänge des Amplifikats der jeweiligen untersuchten Zielsequenz

Für die PCR wurde eine Heißstart-DNA-Polymerase (HotStarTaq™ DNA-Polymerase, Qiagen) benutzt, welche hitzelabile Schutzgruppen trägt und erst durch eine Inkubation bei 95°C für 15 Minuten aktiviert wird.

Durch diese Amplifikation wurden Nukleotidsequenzen mit einer Länge von 274 bis 358 kb erzeugt, welche die jeweiligen polymorphen Nukleotidsequenzen enthalten. Die dafür benötigten Primer wurden anhand der im National Center for Biotechnology Informations (NCBI) veröffentlichten Gensequenzen (siehe 3.3) ausgewählt.

3.2.4. Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus–Analyse

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische Motive innerhalb einer DNA-Sequenz erkennen und spalten. Sie dienen den betreffenden Bakterien als Schutz gegenüber für sie schädliche Faktoren wie beispielsweise anderen Bakterien oder Viren. Es gibt Typ-I, Typ-II und Typ-III-Restriktionsendonukleasen, von denen vor allem die Typ-II-Restriktionsendonukleasen verwendet werden. Diese erkennen meist Palindrome und schneiden an genau definierten Positionen innerhalb oder neben der Erkennungssequenz. An dieser Stelle kommt es zur Hydrolyse der Phosphodiesterbindung der DNA und zur Entstehung von spezifischen Restriktionsfragmenten. Bereits ein einzelner Basenaustausch kann durch Veränderung der Basensequenz zum Entstehen oder Verlust einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen führen. Liegt nun ein

Polymorphismus innerhalb einer Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym vor, kann dieser zu einem veränderten spezifischen Restriktionsfragmentmuster führen und durch Verdau eines PCR-Amplifikats nachgewiesen werden, welche Variante in diesem vorliegt. Dieser Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus lässt sich zum Nachweis von Einzelnukleotidaustauschen verwenden.

Die PCR-Produkte werden für den Verdau mit einem bestimmten Puffer, dem Restriktionsenzym und bei manchen Enzymen zusätzlich mit bovinen Serumalbumin (BSA) wie folgt gemischt:

	Konzentration	Volumen
Restriktionsenzym	10000-20000 U/ml	0,5 µl
Restriktionspuffer	10 x	1,25 µl
BSA	100 x	0-0,125 µl
H ₂ O		0,625-0,75 µl
∑		2,5 µl
PCR-Produkt		10 µl
Endsumme		12,5 µl

Tabelle 3.6 Verwendete Materialien für den Restriktionsverdau mit Konzentrations- und Volumenangabe

Nachfolgende Tabelle listet die verwendeten Restriktionsenzyme und die Restriktionsbedingungen auf:

PPARG-Polymorphismus	Enzym	Endkonzentration des Enzyms	Restriktionspuffer	BSA
SNP1=rs2067819=G12350898A	HpyCH4IV	5 U/µl	NE Buffer 1	nein
SNP2=rs3892175=G12359887A	HhaI	10 U/µl	NE Buffer 4	ja
SNP3=rs3856806=C12467406T	HpyCH4IV	5 U/µl	NE Buffer 1	nein

Tabelle 3.7 Verwendete Restriktionsenzyme mit jeweiliger Restriktionsbedingung

Diese Ansätze wurden bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die daraus entstandenen Restriktionsfragmente wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert.

3.2.5. Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, doppelsträngige DNA nach ihrer Größe zu trennen und durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard die Größe zu ermitteln und die Konzentration abzuschätzen. Zur Gellösung und zum Laufpuffer wird der Farbstoff Ethidiumbromid gegeben, der in die DNA interkaliert, so dass die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar werden. Die verwendete Agarosekonzentration lag bei 3%. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 250 ml 1 x TBE-Puffer (siehe Punkt 2.2.4.) durch Kochen in einem Mikrowellenofen vollständig gelöst. Dann wurden 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) zugegeben, gemischt und die Gellösung in einen Gelträger gegossen. Danach wurden 4 Gelkämme (mit jeweils 20 Zähnen) eingesetzt und nach dem Erstarren wieder gezogen. Der Gelträger wurde anschließend in eine mit Laufpuffer (1 x TBE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid) gefüllte Gelkammer gestellt. Die PCR-Amplifikate wurden mit $\frac{1}{4}$ Volumen Auftragspuffer gemischt und aufgetragen (Ladevolumen ca. 15 µl). Als Größenstandard wurde zusätzlich am linken Rand jeder Reihe 15 µl einer 100 µl bp-Leiter (4 µl Leiter + 8 µl H₂O + 10 µl Orange G) als Größenstandard aufgetragen. Für den Lauf wurden 120 Volt über eineinhalb Stunden angelegt und das Gel danach unter UV-Licht fotografiert.

3.2.6. Reinigung der PCR-Produkte

Für alle drei Polymorphismen wurden Stichproben aller möglichen Genotypen zur Sequenzierung an ein kommerzielles Spezialunternehmen (Seqiserre, Vaterstetten) verschickt. Die dafür hergestellten PCR-Produkte wurden mittels eines kommerziellen Kits (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und weiteren Bestandteilen aus der PCR gereinigt. Dazu wurden zu 100 µl PCR-Produkt 500 µl Bindungspuffer Pb gegeben. Diese Mischung wurde auf die Säule aufgetragen und bei 13000 Upm für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend 750 µl Waschpuffer PE aufgetragen. Danach wurde ein weiteres Mal für eine Minute bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und zur vollständigen Entfernung des restlichen Puffers PE ein zweites Mal für 13000 Upm für eine weitere Minute zentrifugiert. Wiederum wurde der Durchfluss verworfen und die Säule in ein sauberes 2 ml-Gefäß gestellt. Um die DNA von der Säule zu eluieren, wurden 30 µl

Elutionspuffer EB direkt auf die Membran gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Röhrchen in der Säule für eine Minute bei 13000 U_{pm} zentrifugiert. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden dann zur Sequenzierung verwendet.

3.3. Typisierung der Polymorphismen

3.3.1. Nachweis von Mutationen im *PPARG*-Gen

Im *PPARG*-Gen wurden die drei Einzelnukleotidpolymorphismen *SNP1=rs2067819*, *SNP2=rs3892175* und *SNP3=rs3856806* untersucht, die von Sugawara und Mitarbeitern beschrieben wurden [78].

3.3.1.1. Polymorphismus *SNP 1=rs2067819*

Um diesen SNP nachzuweisen, wurde ein 274 bp langes PCR-Produkt hergestellt (siehe Abbildung 3.2). Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym lautet **acGt**, und wird nur geschnitten, wenn das G-Allel vorliegt, dagegen nicht, wenn das A-Allel vorliegt. Somit kann das G-Allel vom A-Allel nach der Restriktion (siehe Punkt 3.2.4.) durch eine Auftrennung im Agarosegel (siehe Punkt 3.2.5.) anhand des Bandenmusters unterschieden und der Genotyp ermittelt werden.

```

aaccacacaaaaaaactattcttctgtagtttctccagttttgttcacatgtgtatgcttattattactgacagttaccgtatat
acatcacttggccctcagcctctttcactgtaggtcctataaattttcatttctacctggcttcagagtttccataatggcaa
      A (SNP1=rs2067819)
cataatcttagtgatagcacGtaaattactaagccagtttttaggaggcttctggtgttattattattgcataattatgtttattct
tataccattacataccatgaatatctttatgtaaattccactcaattaaaaaaaatattttcttcagataaattgccaagag
aggaatttctttgttaaagtgtttgag

```

Abbildung 3.2 Genotypisierung des *SNP1=rs2067819* im *PPARG*-Gen (GenBank accession number NT_022517). Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung und Sequenzierung sind in Orange und unterstrichen dargestellt. Die polymorphen Basen sind fett-grau, die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym umrahmt.

3.3.1.2. Polymorphismus SNP 2=rs3892175

Für den Nachweis dieses SNP wurde ein 358 bp langes PCR-Amplifikat hergestellt und anschließend mit dem Restriktionsenzym Hha I verdaut, dessen Erkennungssequenz gcGc lautet, so dass es beim Vorliegen des A-Allels nicht, jedoch im Falle des G-Allels geschnitten wurde. Der Genotyp wurde durch das Bandenmuster im Agarosegel ermittelt (siehe Punkt 3.3.1.1.).

```
gtttattgcacttatagttagaattattctgccaaagatgagctgagaaatggaggaaatggattaaattacagcagtcc
agtgatacacaatatgcgtttccagaccactgaaacagcaagccaactttaactttaatacttcatacagtggaagaa
ttacagctgtaataaaatcaacagatacatctctggtaatgttctcaaatgagaaaattgactgcaagaacattgtcca
aatacatgttttatatattttatgctactttccagaatattaacagtttacatagcGcgttttgggaagtcactcattgtttcat
A (SNP2=rs3892175)
ctttctgattaagaaatagggccaaagtgtacattgcactagtagtagacttttaagatgtctttgtctcttttcagtacta
agctcaagttcatagattatccttgactttcctttccctaggtagagatttagagtattgtttatgtgagatatataaaaa
aaaaggagattttaacaaatgactgtttgattcttgggtagaaactaatactgatcaagaccaaccaagtattcagaca
agatcgggcggttccagggtg
```

Abbildung 3.3 Genotypisierung des SNP2=rs3892175 im *PPARG*-Gen (GenBank accession number NT_022517). Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung und Sequenzierung sind in Orange und unterstrichen dargestellt. Die polymorphen Basen sind fett-grau, die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym umrahmt.

3.3.1.3. Polymorphismus SNP 3=rs3856806

Um diesen SNP nachzuweisen, wurde ein 237 bp langes PCR-Amplifikat hergestellt. Dieses wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym HypCH4IV verdaut, dessen Erkennungssequenz gCgt lautet, so dass es beim Vorliegen des C-Allels nicht, jedoch im Falle des T-Allels geschnitten wurde. Der Genotyp wurde wie unter Punkt 3.3.1.1. beschrieben durch das Bandenmuster im Agarosegel ermittelt.

```
ccaaaaatacagatgagttgcttggtagagctgcctaggcctccaaggcggggcccagaggatttttgactgaacc
cctgtgtgtttccatagtgtcttcccagaccgcccaggtttgctgaatgtgaagcccattgaagacattcaagacaac
ctgcttacaagccctggagctccagctgaagctgaaccaccctgagtcctcacagctgtttgccaagctgctccagaaa
T (SNP3=rs3856806)
atgacagacctcagacagattgtcacggaacgCgtgcagctactgcaggtgatcaagaagacgggagacagacat
```

gagtcttcacccgctcctgcaggagatctacaaggacttgtagcagagagctctgagccactgccaacatttcct
tctccagttgcactattctgagggaaaatctgacacctaagaaattactgtgaaaaagcatttataaaaagaaaaggtt
tagaatatgatctattttatgcatattgtttataaagacacattacaattacttttaataataaaaattacatattatgaaatt
gctgatagtattt

Abbildung 3.4 Genotypisierung des SNP3=rs3856806 im *PPARG*-Gen (GenBank accession number NT_022517). Die Primersequenzen für die RFLP-Typisierung und Sequenzierung sind in Orange und unterstrichen dargestellt. Die polymorphen Basen sind fett-grau, die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym umrahmt.

3.4. Statistische Auswertung

Diese Studie ist eine Populationsstudie. Sie untersucht den möglichen Zusammenhang zwischen einem Krankheitsbild und dem Auftreten bestimmter Faktoren wie bestimmte DNA-Polymorphismen. Dazu wurden zwei Patientengruppen, je eine mit Morbus Crohn und eine mit Colitis ulcerosa, sowie eine gesunde Kontrollgruppe hinsichtlich der DNA-Polymorphismen untersucht. Aus diesen Ergebnissen wird die Signifikanz der ermittelten Assoziationsstärke berechnet.

3.4.1. Voraussetzungen

Für die statistische Auswertung ist eine ausreichende hohe Zahl an Testpersonen Voraussetzung. Die Zahl der Kontrollindividuen sollte in etwa ein- bis zweimal so groß wie die Patientengruppe sein. Verwandte Personen müssen zur Untersuchung von genetischen Assoziationen ausgeschlossen sein.

3.4.2. Chi-Quadrat (χ^2)-Test und exakter Test nach Fisher

Der Chi-Quadrat (χ^2)-Test oder der exakte Test nach Fisher dient dazu, die Häufigkeit eines Merkmals in zwei statistisch unabhängigen Gruppen zu vergleichen und zugleich die Frage nach der Signifikanz des Testes zu beantworten. Für diese Studie wurden die Allel-, Genotyp- und Haplotypenfrequenz der jeweiligen Patientengruppe mit der der Kontrollgruppe verglichen. Zur Auswertung wurde folgende Vierfeldertafel zusammengestellt:

	Positiv	Negativ	Summe
Patienten	a	b	a+b
Kontrollen	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	N=a+b+c+d

Tabelle 3.8 Darstellung der Vierfeldertafel zur Berechnung des Signifikanzwertes

Der Chi-Quadrat (χ^2)-Test besitzt für eine 2x2 Tabelle einen Freiheitsgrad (df). Die Fallzahlen sollten über fünf, die zu erwartenden Häufigkeiten mindestens 5 und keine der beobachteten Häufigkeiten 0 betragen. Die Prüfgröße wird nach folgender Formel errechnet (Korrektur nach Yates):

$$\chi^2 = \frac{(a \cdot d - b \cdot c - \frac{N}{2})^2 \cdot N}{(a+b) \cdot (c+d) \cdot (a+c) \cdot (b+d)}$$

Abbildung 3.5 Formel zur Berechnung der Prüfgröße mittels Chi-Quadrat (χ^2)-Test

Der exakte Test nach Fisher besitzt das gleiche Anwendungsgebiet wie der Chi-Quadrat (χ^2)-Test, liefert jedoch im Gegensatz zu diesem auch bei einer geringeren Fallzahl zuverlässige Ergebnisse. Die Prüfgröße wird mit folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{N!a!b!c!d!}$$

Abbildung 3.6 Formel zur Berechnung der Prüfgröße mittels exaktem Test nach Fisher

Die beiden Tests werden zur Feststellung eines signifikanten Unterschiedes zwischen den zu erwartenden und den tatsächlichen Werten benutzt. Man setzt dabei voraus, dass keinerlei Assoziationen zwischen zwei untersuchten Merkmalen bestehen. Die Signifikanz lässt sich in drei Niveaus ausdrücken:

1. Signifikanzniveau (5%-Stufe, $p \leq 0,05$)	$3,84 \leq \chi^2 \leq 6,64$	signifikant
2. Signifikanzniveau (1%-Stufe, $p \leq 0,01$)	$6,64 \leq \chi^2 \leq 10,83$	hochsignifikant
3. Signifikanzniveau (0,1%-Stufe, $p \leq 0,001$)	$10,83 \leq \chi^2$	höchstsignifikant

Tabelle 3.9 Darstellung der drei Signifikanzniveaus

3.4.3. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die ermittelte Genotypenfrequenz wurde mit den zu erwarteten Frequenzen bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts verglichen. Dazu bildet man folgende Tabelle, das so genannte Punnet-Quadrat:

		Allel	
		A (p)	B (q)
Allel	A (p)	AA (p^2)	AB (pq)
	B (q)	AB (pq)	BB (q^2)

Tabelle 3.10 Darstellung des Punnet-Quadrats zur Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

p ist hier die relative Häufigkeit des Auftretens des Allels A, q die Allelfrequenz von B. Außerdem gilt:

$$p + q = 1$$

Daraus lassen sich dann die zu erwartenden Frequenzen der einzelnen Genotypen in einer Idealpopulation mit folgenden Formeln berechnen:

$$f(AA) = p^2$$

$$f(AB) = 2 pq$$

$$f(BB) = q^2$$

wobei f(AA) der zu erwartenden Frequenz für den Genotyp AA, f(AB) der zu erwartenden Frequenz für den Genotyp AB und f(BB) der zu erwartenden Frequenz für den Genotyp BB entspricht. Die Signifikanz lässt sich mit folgender Formel berechnen:

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

Abbildung 3.7 Formel zur Berechnung der Signifikanz

Das Signifikanzniveau wird in den unter Punkt 3.4.3. genannten drei Stufen ausgedrückt.

3.4.4. Allelfrequenzen

Die Gen- oder Allelfrequenzen berechnen sich nach folgender Formel:

$$f_{\text{Allel}} = \frac{n}{N}$$

Abbildung 3.8 Formel zur Berechnung der Gen- oder Allelfrequenzen

wobei n = Anzahl eines Allels

N = Anzahl aller Allele

Dabei wird vorausgesetzt, dass alle Allele bekannt sind und Individuen mit nur einem Allel homozygot für dieses Allel sind. Da die verwendeten Marker kodominant vererbt werden, gilt außerdem:

$$N_{\text{Allele}} = 2 N_{\text{Individuen}}$$

3.4.5. Haplotypfrequenzen und Kopplungsungleichgewichte

Die Haplotypfrequenzen und die Stärke des Kopplungsungleichgewichts zwischen zwei oder drei Allelen wurden nach den Formeln von Bauer und Danilovs [130] berechnet. Man benutzt für die Haplotypenberechnung die bereits zuvor berechneten Gen- oder Allelfrequenzen.

3.4.5.1. Drei-Punkt-Haplotypenfrequenzberechnung und Kopplungsungleichgewichte

Das absolute Delta (Δ_{ABC}) für Drei-Punkt-Haplotypen, also die Assoziationsstärke von drei verschiedenen Merkmalen, berechnet sich wie folgt:

$$\Delta(i,j,k) = p(i,j,k) - p(i) \cdot p(j) \cdot p(k) - p(i) \cdot \Delta(j,k) - p(j) \cdot \Delta(i,k) - p(k) \cdot \Delta(i,j)$$

Entsprechend errechnet sich das relative Delta (Δ_{rel}):

$$\Delta_{rel} = \frac{\Delta(i,j,k)}{\Delta_{max}(i,j,k)}$$

mit: $\Delta_{max}(i,j,k) = p(i) \cdot (1 - p(j) \cdot p(k)) - p(i) \cdot \Delta(j,k) - p(j) \cdot \Delta(i,k) - p(k) \cdot \Delta(i,j)$

für positive Assoziationen

oder: $\Delta_{max}(i,j,k) = - p(i) \cdot p(j) \cdot p(k) - p(i) \cdot \Delta(j,k) - p(j) \cdot \Delta(i,k) - p(k) \cdot \Delta(i,j)$

für negative Assoziationen

$p(i)$ soll wieder die kleinste der Allelfrequenzen sein.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeine Vorbemerkungen

In der vorliegenden Studie wurden drei verschiedene Polymorphismen des *PPARG*-Gens untersucht. Alle drei Polymorphismen sind Einzelnukleotidpolymorphismen, welche im Gen in zwei verschiedenen Nukleotidvarianten vorkommen können. Durch die Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse konnte jedem Individuum einer der drei möglichen Genotypen zugeordnet werden. Die Verteilungen der Genotypen in der Patienten- und Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts überprüft und zeigten keine Abweichung von der zu erwartenden Verteilung (siehe 3.4.3). Da sich alle drei Gruppen der Studienpopulation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden, mussten keine Fehler bei der Auswahl der Studienpopulationen oder bei der Typisierung angenommen werden. Die Allel- und Genotypenfrequenzen der Patienten mit Morbus Crohn beziehungsweise Colitis ulcerosa wurden mit denen der gesunden Individuen in der Kontrollgruppe verglichen. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat (χ^2)-Tests oder dem exakten Test nach Fisher vorgenommen.

4.2. Demographische Eigenschaften der Studienpopulation

Folgende Tabelle verdeutlicht die demographischen Eigenschaften der Studienpopulation:

	Morbus Crohn n=616	Colitis ulcerosa n=365	Kontrollen n=1280
Geschlecht			
männlich (%)	47.7	51.6	62.9
weiblich (%)	52.3	48.4	37.1
Alter (Jahre)			
Mittelwert \pm SD	39.8 \pm 13.0	41.3 \pm 13.8	45.8 \pm 10.7
Spannweite	15-76	7-85	18-71
Body Mass Index			
Mittelwert \pm SD	23.0 \pm 3.9	23.9 \pm 4.4	
Spannweite	16-40	16-41	
Alter bei Diagnose (Jahre)			
Mittelwert \pm SD	27.7 \pm 11.5	31.9 \pm 12.8	
Spannweite	7-71	9-68	
Krankheitsdauer (Jahre)			
Mittelwert \pm SD	12.6 \pm 8.4	11.6 \pm 7.3	
Spannweite	2-44	3-35	
Positive Familienanamnese bezüglich chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (%)	15.9	22.1	

Tabelle 4.1 Demographische Eigenschaften der Studienpopulation

4.3. Polymorphismen im *PPARG*-Gen

4.3.1. SNP1=rs2067819 im *PPARG*-Gen

Zur Typisierung dieses Polymorphismus wurde ein 274 bp langes PCR-Produkt hergestellt und danach mit Hilfe des Enzyms HpyCH4IV verdaut (siehe 3.3.1.1.). Im Falle des G-Allels wird das Produkt in ein 155 bp und ein 119 bp langes Fragment geschnitten. Im Falle des A-Allels bleibt das 274 bp lange Produkt ungeschnitten. Im Agarosegel zeigte sich folgendes Bandenmuster je nach Genotyp des Individuums:

Genotyp	Bandenmuster
GG	2 Fragmente 155 und 119 bp
AA	1 Fragment 274 bp
GA	3 Fragmente 119, 155 und 274 bp

Tabelle 4.2 Bandenmuster des jeweiligen Genotyps für SNP1=rs2067819 im *PPARG*-Gen

Nachfolgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer Gelelektrophorese mit den beschriebenen Bandenmustern:

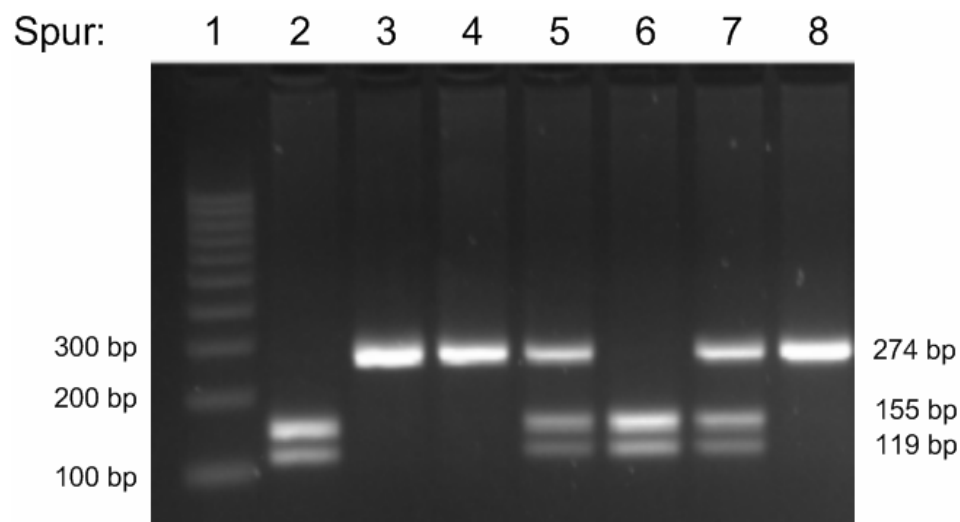


Abbildung 4.1 Nachweis des SNP1=rs2067819 im *PPARG*-Gen:

Spur 1: 100 bp-Leiter

Spur 2 und 6: Homozygote Träger des G-Allels

Spur 3, 4 und 8: Homozygote Träger des A-Allels

Spur 5 und 7: Heterozygote Genotypen (GA)

Für die Allel- und Genotypverteilung innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs ergab sich folgendes Bild (siehe Tabelle 4.3):

SNP1	Diagnose					
	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa		Kontrollen	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
GG	366	59,1	212	57,6	601	58,4
GA	218	35,2	138	37,5	366	35,6
AA	35	5,7	18	4,9	62	6,0
G	950	76,7	562	76,4	1568	76,2
A	288	23,3	174	23,6	490	23,8

Tabelle 4.3 Allel- und Genotypverteilung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie der Kontrollgruppe für den Polymorphismus SNP1=rs2067819

Die Signifikanzwerte wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat (χ^2)-Test berechnet (siehe 3.4.2). Vergleicht man die Genotyp- und Allelfrequenz der an Morbus Crohn erkrankten Individuen mit denen der Kontrollgruppe, zeigen sich die Unterschiede als nicht signifikant (p-Wert-Genotypverteilung=0,933 bzw. p-Wert-Allelverteilung=0,838). Auch der Vergleich der Frequenzen der an Colitis ulcerosa erkrankten Individuen mit der Kontrollgruppe zeigt keine signifikanten Unterschiede (p-Wert-Genotypverteilung=0,632 bzw. p-Wert-Allelverteilung=1,000).

4.3.2. SNP2=rs3892175 im *PPARG*-Gen

Für den Nachweis dieses Polymorphismus wurde ein 358 bp langes PCR-Amplifikat hergestellt und anschließend mit dem Restriktionsenzym Hha I verdaut (siehe 3.3.1.2.). Im Falle des G-Allels wird das PCR-Produkt in ein 217 bp und ein 141 bp langes Fragment geschnitten. Liegt das A-Allel vor, bleibt das 358 bp lange PCR-Amplifikat ungeschnitten. Im Agarosegel zeigen sich folgende Bandenmuster je nach Genotyp:

Genotyp	Bandenmuster
GG	2 Fragmente 217 und 141 bp
AA	1 Fragment 358 bp

Genotyp	Bandenmuster
GA	3 Fragmente 217, 141 und 358 bp

Tabelle 4.4 Bandenmuster des jeweiligen Genotyps für SNP2=rs3892175 im *PPARG*-Gen

Nachfolgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer Gelelektrophorese mit den beschriebenen Bandenmustern:

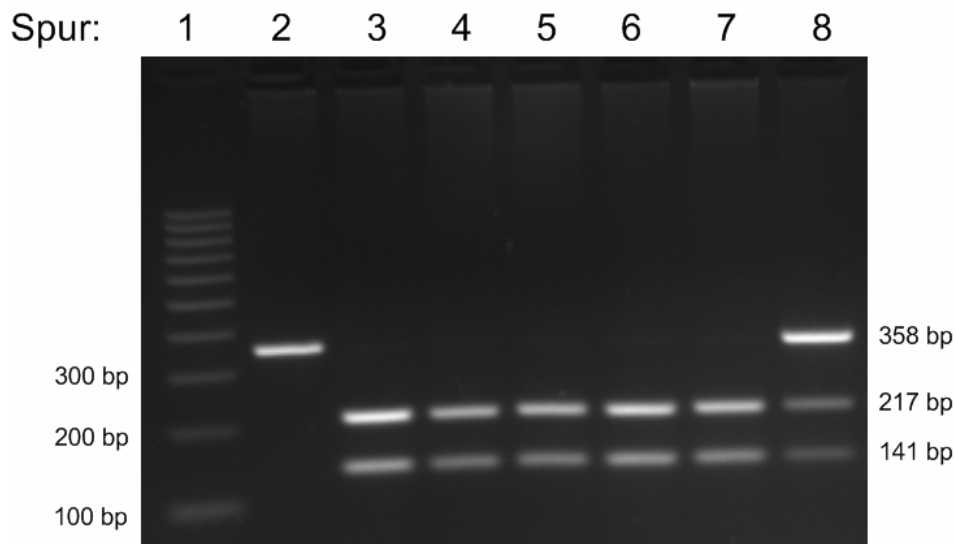


Abbildung 4.2 Nachweis des SNP2=rs3892175 im *PPARG*-Gen:

Spur 1: 100 bp-Leiter

Spur 3, 4, 5, 6 und 7: Homozygote Träger des G-Allels

Spur 2: Homozygoter Träger des A-Allels

Spur 8: Heterozygote Genotypen (GA)

Für die Allel- und Genotypverteilung innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs ergab sich folgendes Bild (siehe Tabelle 4.3):

SNP2	Diagnose					
	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa		Kontrollen	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
GG	496	81,2	293	80,9	822	80,0
GA	107	17,5	68	18,8	194	18,9
AA	8	1,3	1	0,3	12	1,2
G	1099	89,9	654	90,3	1838	89,8
A	123	10,1	70	9,7	208	10,2

Abbildung 4.3 Allel- und Genotypverteilung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie der Kontrollgruppe für SNP2=rs3892175

Der Vergleich der Genotyp- und Allelfrequenzen der an Morbus Crohn erkrankten Individuen mit denen der Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied (p-Wert-Genotypverteilung=0,771 bzw. p-Wert-Allelverteilung=0,689). Auch der Vergleich der an Colitis ulcerosa erkrankten Patienten mit den gesunden Individuen der Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede (p-Wert-Genotypverteilung=0,316 bzw. p-Wert-Allelverteilung=0,532).

4.3.3. SNP3=rs3856806 im *PPARG*-Gen

Um diesen Polymorphismus nachzuweisen, wurde ein 237 bp langes PCR-Amplifikat hergestellt. Dieses wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym HypCH4IV verdaut (siehe 3.3.1.3.). Im Falle des C-Allels wird das PCR-Produkt in ein 134 bp und in ein 103 bp langes Fragment geschnitten. Liegt das T-Allel vor, schneidet das Enzym das 237 bp lange PCR-Amplifikat nicht. Im Agarosegel zeigen sich folgende Bandenmuster:

Genotyp	Bandenmuster
CC	2 Fragmente 134 und 103 bp
TT	1 Fragment 237 bp
CT	3 Fragmente 134, 103 und 237 bp

Tabelle 4.5 Bandenmuster des jeweiligen Genotyps für SNP3=rs3856806 im *PPARG*-Gen

Nachfolgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Gelelektrophorese mit den beschriebenen Bandenmustern:

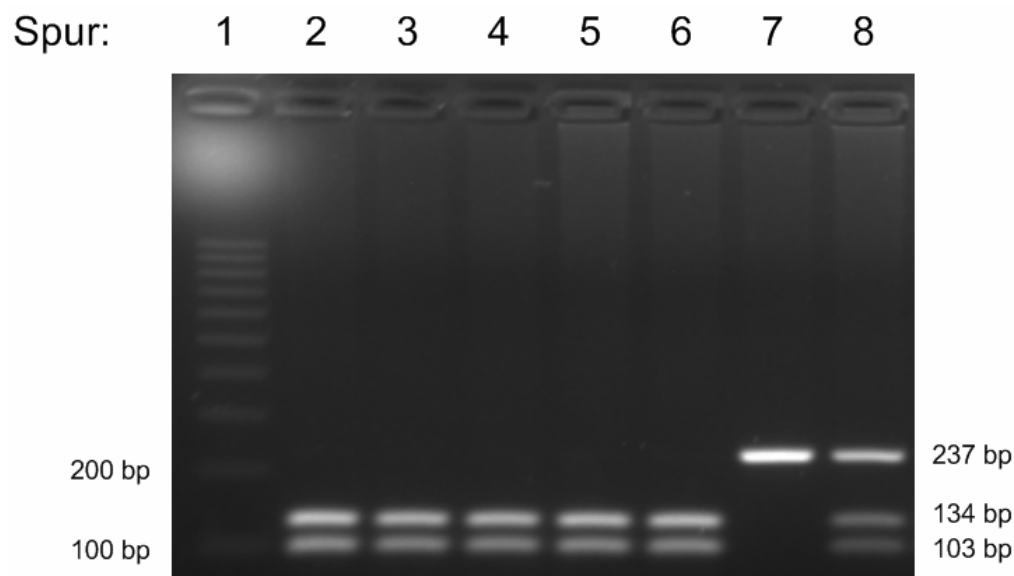


Abbildung 4.4 Nachweis des SNP 3=rs3856806 im *PPARG*-Gen:

Spur 1: 100 bp-Leiter

Spur 2, 3, 4, 5 und 6: Homozygote Träger des C-Allels

Spur 7: Homozygote Träger des T-Allels

Spur 8: Heterozygote Genotypen (CT)

Für die Allel- und Genotypenverteilung innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs ergibt sich folgendes Bild (siehe Tabelle 4.6):

SNP3	Diagnose					
	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa		Kontrollen	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
CC	472	76,3	273	75,0	750	73,3
CT	136	22,0	82	22,5	250	24,4
TT	11	1,8	9	2,5	23	2,2
C	1080	87,2	628	86,3	1750	85,5
T	158	12,8	100	13,7	296	14,5

Tabelle 4.6 Allel- und Genotypenverteilung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie der Kontrollgruppe für SNP 3=rs3856806

Der Vergleich der Genotypen- und Allelfrequenzen der an Morbus Crohn erkrankten Individuen mit denen der Kontrollgruppe zeigte keinem signifikanten Unterschied (p -

Wert-Genotypverteilung=0,395 bzw. p-Wert-Allelverteilung=0,176). Auch der Vergleich der an Colitis ulcerosa erkrankten Patienten mit den gesunden Individuen der Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede (p-Wert-Genotypverteilung=0,751 bzw. p-Wert-Allelverteilung=0,630).

Folgende Tabelle fasst die vorangegangenen Ergebnisse bezüglich der Allelfrequenzen noch einmal zusammen:

SNP	Allel	Morbus Crohn n=616			Colitis ulcerosa n=365			Kontrollen n=1280
		MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	
SNP1= rs206781 9	A	0.234	8.38×10^{-1}	0.98 [0.83- 1.16]	0.237	1.00	1.00 [0.82- 1.22]	0.237
SNP2= rs389217 5	A	0.100	6.89×10^{-1}	0.95 [0.75- 1.20]	0.096	5.32×10^{-1}	0.90 [0.68- 1.20]	0.105
SNP3= rs385680 6	T	0.128	1.76×10^{-1}	0.87 [0.71- 1.07]	0.137	6.30×10^{-1}	0.94 [0.73- 1.20]	0.145

Tabelle 4.7 Allelfrequenzen, p-Werte und Odds Ratio für die drei getesteten Polymorphismen im *PPARG*-Gen. Abkürzungen: MAF, minor allele frequencies; OR, odds ratio; CI, confidence interval

4.4. Haplotyp-Analyse zwischen den SNPs rs2067819, rs3892175 und rs3856806

Eine Haplotyp-Analyse der drei untersuchten SNPs rs2067819, rs3892175 und rs3856806 wurde durchgeführt (siehe 3.4.5.2). Wie der Vergleich der Allelfrequenzen zeigte auch der Vergleich der Haplotyp-Frequenzen keinen signifikanten Unterschied der Verteilung zwischen den Morbus Crohn- bzw. den Colitis ulcerosa-Patienten und der Kontrollgruppe. Folgende Tabelle zeigt die Haplotyp-Frequenzen, p-Werte und Odds Ratio (OD) mit 95%-Konfidenzintervall (CI) für die Patienten mit Morbus-Crohn und Colitis ulcerosa:

Haplotyp	Morbus Crohn n=1257			Colitis ulcerosa n=651			Kontrollen n=1624
	Frequenz	p-Wert	OR [95 % CI]	Frequenz	p-Wert	OR [95 % CI]	
GGC	0.71	0.80	1.02 [0.87-1.19]	0.70	0.87	0.98 [0.72-1.33]	0.71
GGT	0.04	0.37	0.85 [0.58-1.22]	0.07	0.42	1.27 [0.71-2.28]	0.05
GAC	<0.01	NA	NA	0.01	NA	NA	<0.01
GAT	<0.01	NA	NA	<0.01	NA	NA	<0.01
AGC	0.06	0.17	1.27 [0.90-1.78]	0.05	0.62	1.18 [0.61-2.27]	0.04
AGT	0.09	0.57	0.93 [0.71-1.21]	0.08	0.63	0.88 [0.53-1.47]	0.09
AAC	0.10	0.88	0.98 [0.76-1.26]	0.09	0.63	0.89 [0.54-1.45]	0.10
AAT	<0.01	NA	NA	<0.01	NA	NA	<0.01

Tabelle 4.8 Frequenzen der Haplotypen bestehend aus den SNPs rs2067819, rs3892175 und rs3856806 bei Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen.

4.5. Genotyp-Phänotyp-Analyse

4.5.1. Ileale Beteiligung

Die Ergebnisse von Sugawara et al. stammen größtenteils aus Studien an der SAMP1/YitFc-Maus, welche vor allem einen ilealen Befall zeigt [78, 131]. Daher wurden die drei getesteten Polymorphismen auf eine Assoziation bezüglich eines ilealen Befalls bei den untersuchten 615 Morbus Crohn Patienten hin untersucht. Dies geschah auf Basis der Montreal Klassifikation für chronisch entzündliche

Darmerkrankungen [27]. Keine der untersuchten Polymorphismen zeigte eine signifikante Assoziation (siehe Tabelle 4.9).

Anatomische Lokalisation	rs2067819 n=615	rs3892175 n=607	rs3856806 n=615
L1	p=0.547 OR 1.24 CI (1.69-2.22)	p=0.090 OR 1.85 CI (0.96-3.55)	p=1.000 OR 0.97 CI (0.50-1.90)
L2	p=1.000 OR 0.98 CI (0.56-1.74)	p=0.463 OR 0.72 CI (0.32-1.58)	p=0.514 OR 0.78 CI (0.39-1.53)
L3	p=0.912 OR 0.96 CI (0.62-1.47)	p=0.404 OR 0.78 CI (0.46-1.33)	p=0.614 OR 1.16 CI (0.70-1.92)
L4	p=1.000 OR 0.84 CI (0.20-3.58)	p=0.650 OR 1.44 CI (0.28-7.26)	p=0.686 OR 0.41 CI (0.05-3.40)
Ileale Beteiligung	p=1.000 OR 1.04 CI (0.61-1.78)	p=0.603 OR 1.25 CI (0.61-2.58)	p=0.629 OR 1.24 CI (0.64-2.40)

Tabelle 4.9 Genotyp-Phänotyp-Analyse für die drei getesteten SNPs bei Patienten mit Morbus Crohn. Krankheitslokalisierung wurde auf Basis der Montreal-Klassifikation festgelegt. Gezeigt werden p-Wert und Odds Ratio mit 95% Konfidenzintervall. Abkürzungen: n, Anzahl; p; P-Wert; OR, odds ratio; CI, confidence intervall

4.6. Analyse bezüglich einer Epistasis zwischen Mutationen im *PPARG*-Gen und *ATG16L1*

Ein Suszeptibilitätsgen für Morbus Crohn ist *ATG16L1*; dies stellt ein wichtiges Autophagie-Protein der Paneth-Zellen dar, spezialisierte Epithelzellen, die unter anderem für die Sekretion von Defensinen zuständig und damit für die Integrität der Dünndarmschleimhaut wichtig sind [132]. *ATG16L1*-defiziente Zellen zeigen neben einer erhöhten Expression des immunregulatorischen Zytokins Leptin auch eine erhöhte Expression von Genen, die am PPAR- γ -Signalweg beteiligt sind. Bei der Analyse einer Epistasis zwischen den SNPs rs2067819, rs3892175, rs3856806 (p.His447His) im *PPARG*-Gen und dem SNP rs2241880 (p.Thr300Ala) innerhalb des *ATG16L1*-Gen bezüglich einer Suszeptibilität für CED zeigte sich für keines der untersuchten Allele ein signifikanter p-Wert.

Nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen:

<i>PPARG</i> SNPs	Analyse bezüglich der Epistasis mit <i>ATG16L1</i> rs2241880 (p.Thr300Ala) p-Wert
rs2067819	0.258
rs3892175	0.560
rs3856806	0.490

Tabelle 4.10 Analyse der Epistasis zwischen den SNPs rs2067819, rs3892175, rs3856806 (p.His447His) im *PPARG*-Gen und dem SNP rs2241880 (p.Thr300Ala) innerhalb des *ATG16L1*-Gen bezüglich einer Suszeptibilität für CED. Alle p-sind unkorrigiert für multiple Vergleiche.

5. Diskussion

5.1. Pathogenese

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Es wird vermutet, dass die dynamische Balance zwischen Bakterien, besonders der normalen Darmflora, und der Immunantwort der Mucosa eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Pathogenese spielt. Das kann auf den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren und Wirtsfaktoren, wie zum Beispiel Variationen im Erbgut, zurückzuführen sein [28]. In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Suszeptibilitätsloci identifiziert, die die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung begünstigen.

5.2. Studiendesign

Diese Studie ist eine Assoziationsstudie, die drei Einzelnukleotidpolymorphismen des *PPARG*-Gens und deren Zusammenhang für eine erhöhte Krankheitssuszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen untersucht. Im Vorfeld dieser Studie beschrieben mehrere genomweite Kopplungsanalysen einen Suszeptibilitätslocus auf Chromosomenabschnitt 3p21-26, in dem auf Abschnitt 3p25.2 das *PPARG*-Gen liegt [74-77]. Für die weitere Untersuchung eines solchen Zusammenhangs bei Krankheiten mit multifaktorieller Genese ist das Studiendesign einer Assoziationsstudie geeignet [133-135]. Dabei wird die Allelverteilung der Polymorphismen in einer Gruppe von Erkrankten mit der einer Gruppe von gesunden, unverwandten Kontrollpersonen verglichen und auf einen signifikanten Unterschied untersucht. Um eine hohe Aussagekraft einer solchen Studie zu erreichen, sind einige Voraussetzungen durch das Studiendesign zu erfüllen. Die Fallzahl sollte nicht zu klein sein, um auch schwächere Assoziationen zu erkennen, und mindestens so groß wie die Ausgangsstudie. Die Patientengruppe sollte gut definiert sein. Die Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung sollte nach standardisierten Kriterien gestellt sein und eine Abgrenzung zu familiären und sporadischen Fällen erfolgen. Die Kontrollgruppe sollte ein- bis zweimal so groß wie die Patientengruppe sein und analog zur Patientengruppe definiert sein. Sie sollte in ihrer ethnischen und genetischen Zusammenstellung der Patientengruppe entsprechen. Die Ergebnisse einer Assoziationsstudie sollte durch weitere

Assoziationsstudien bestätigt werden [134]. Idealerweise sollte ein pathogenetischer oder ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen dem Genpolymorphismus und der Krankheit bestehen [133].

In dieser Arbeit wurden 616 Patienten mit Morbus Crohn, 365 Patienten mit Colitis ulcerosa und 1280 gesunde, unverwandte Kontrollen untersucht. Die Patienten und Kontrollen stammen aus dem süddeutschen Raum und sind alle europäischer Herkunft. Patienten- und Kontrollgruppe entsprechen sich in der Alterszusammensetzung; bei der Geschlechterzusammensetzung überwiegt bei den Patienten mit Morbus Crohn leicht das weibliche Geschlecht, bei den Patienten mit Colitis ulcerosa und in der Kontrollgruppe das männliche Geschlecht (siehe Tabelle 4.25). Die Diagnose Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa wurde anhand standardisierter Kriterien gestellt. Die Allelfrequenzen der drei Polymorphismen befinden sich für jede Gruppe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, was einen systematischen Fehler bei der Zusammenstellung der Gruppen nicht vermuten lässt.

5.3. Validität der verwendeten Genotypisierungsmethoden

Das Genom eines Menschen unterscheidet sich von dem eines anderen in durchschnittlich 0.1% seiner Nukleotidsequenz, das heißt im Schnitt variiert jede 1000. Base [136, 137]. Der häufigste Typ einer solchen Variante sind die sogenannten Einzelnukleotidpolymorphismen, auch SNPs (single nucleotide polymorphisms) genannt. Dies bezeichnet einen einzelnen biallelischen Basenaustausch an einer bestimmten Stelle eines Chromosoms, zum Beispiel der Austausch eines Cytosin gegen ein Thymin. Es wird geschätzt, dass in der gesamten Weltbevölkerung an zehn Millionen verschiedenen Stellen des Genoms SNPs vorkommen, das bedeutet im Schnitt an jeder 300. Basenstelle. Voraussetzung ist, dass beide Allele mit einer Frequenz von mehr als einem Prozent beobachtet werden. Damit machen die SNPs ungefähr 90% der Varianz im menschlichen Erbgut aus [138, 139]. Je nachdem, wo ein solcher Basenaustausch stattfindet, unterteilt man die SNPs in vier verschiedene Gruppen. rSNPs (random SNPs) liegen außerhalb von Genbereichen und wirken sich normalerweise nicht auf den Phänotyp aus. gSNPs (genassoziierte SNPs) liegen in unmittelbarer Nähe der Gene beziehungsweise in den Introns. Sie können sich dadurch auf die Aktivierung oder Repression einer Transkription des Gens auswirken. cSNPs (codierende SNPs)

liegen innerhalb der Exons eines Gens und können sich somit auf das Genprodukt auswirken, also zu einer veränderten Aminosäuresequenz des Proteins oder einer verkürzten Form des Proteins führen [140]. Die beiden letzteren zählt man zu den pSNPs (Phänotyp-relevante SNPs), da sie den Phänotyp eines Menschen beeinflussen können und sich daher sehr gut für genetische Assoziationsstudien eignen [133]. Die hier untersuchten Polymorphismen SNP1=rs2067819=G12350898A, SNP2=rs3892175=G12359887A und SNP3=rs3856806=C12467406T sind Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb des *PPARG*-Gens. SNP1=rs2067819=G12350898A und SNP2=rs3892175=G12359887A liegen jeweils innerhalb eines Introns, SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His innerhalb eines Exons; bewirken aber keinen Aminosäureaustausch. Wichtig ist, dass jede Probe eindeutig einem der beiden möglichen Allelvarianten zugeordnet werden kann. Die hier verwendete Methode mittels Polymerasekettenreaktion und Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse ist dafür geeignet [141]. Die in dieser Methode verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden sehr präzise an einer bestimmten Stelle innerhalb einer definierten Basensequenz (siehe 3.2.4). Alle Restriktionsendonukleasen sind jedoch auch in der Lage unspezifischer zu schneiden, was aber unter optimalen Bedingungen sehr selten ist. Für einige Enzyme erhöht sich aber die Rate der unspezifischen Schnitte bei nicht optimalen Bedingungen erheblich, was als Star-Aktivität bezeichnet wird [142]. Für die hier verwendeten Restriktionsenzyme HpyCH4IV und HhaI ist eine Star-Aktivität jedoch nicht beschrieben. Die Enzyme wurden unter optimalen Bedingungen laut Angaben des Herstellers New England Biolabs verarbeitet. Zur Validierung der Ergebnisse wurden Stichproben der mit dieser Methode typisierten Proben an ein kommerzielles Sequenzierunternehmen verschickt und in ihrer Sequenz bestätigt. Die Allelfrequenzen für jeden der drei Polymorphismen befinden sich für jede Gruppe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, was einen systematischen Fehler bei der Typisierung nicht vermuten lässt.

5.4. Bewertung der Ergebnisse aus genetischer Sicht

5.4.1. Analyse einer Assoziation der untersuchten Polymorphismen bezüglich einer Prädisposition für Morbus Crohn

In dieser Studie wurde zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen den Einzelnukleotidpolymorphismen SNP1=rs2067819=G12350898A, SNP2=rs3892175=G12359887A und SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His innerhalb des *PPARG*-Gens und einer erhöhten Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen in einer europäischen Patientengruppe untersucht. Es wurden die Genotypen- und Allelfrequenzen von 616 Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt sind, mit 1280 gesunden unverwandten Kontrollpersonen verglichen und statistisch ausgewertet. Für keinen der drei Polymorphismen zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang.

5.4.2. Vergleich der eigenen Daten mit den Daten anderer Studien

Initial berichtete Sugawara et al. 2005 von einer statistisch signifikanten Assoziation der Einzelnukleotidpolymorphismen SNP1=rs2067819=G12350898A und SNP2=rs3892175=G12359887A mit Morbus Crohn [78]. Eine weitere neuseeländische Studie von Leung et al. konnte die Assoziation von SNP1=rs2067819=G12350898A mit Morbus Crohn nicht bestätigen [143]. Die eigene Arbeit ist größer als die beiden anderen Arbeiten zusammen und ist die größte eigenständige Publikation zu PPAR- γ und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Folgende Tabellen vergleichen die Genotypenfrequenzen der beiden Studien und der eigenen Daten:

	SNP1- Genotypen Anzahl/ Frequenz			
	GG		GA und AA	
	Morbus Crohn	Kontrollen	Morbus Crohn	Kontrollen
Sugawara et al.	96/ 0,828	70/ 0,604	20/ 0,172	46/ 0,397
Leung et al.	124/ 0,681	122/ 0,649	58/ 0,319	66/ 0,351
eigene Daten	366/ 0,591	601/ 0,584	253/ 0,409	428/ 0,416

Tabelle 5.1 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP1=rs2067819=G12350898A in der Literatur; GA und AA wurden addiert, da genauere Daten von Sugawara et al. in der Literatur nicht vorhanden waren

	SNP1- Genotypen Anzahl/ Frequenz					
	GG		GA		AA	
	Morbus Crohn	Kontrollen	Morbus Crohn	Kontrollen	Morbus Crohn	Kontrollen
Leung et al.	124/ 0,681	122/ 0,649	48/ 0,264	55/ 0,293	10/ 0,055	11/0,058
eigene Daten	366/ 0,591	601/ 0,584	218/ 0,352	366/ 0,356	35/ 0,057	62/ 0,060

Tabelle 5.2 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP1=rs2067819=G12350898A von Leung et al. mit den eigenen Daten

	SNP2- Genotypen Anzahl/ Frequenz			
	GG		GA und AA	
	Morbus Crohn	Kontrollen	Morbus Crohn	Kontrollen
Sugawara et al.	107/ 0,863	89/ 0,724	17/ 0,137	34/ 0,276
eigene Daten	496/ 0,812	822/ 0,800	115/ 0,188	206/ 0,200

Tabelle 5.3 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP2=rs3892175=G12359887A in der Literatur; GA und AA wurden addiert, da genauere Daten von Sugawara et al. in der Literatur nicht vorhanden waren

	SNP3- Genotypen Anzahl/ Frequenz			
	CC		CT und TT	
	Morbus Crohn	Kontrollen	Morbus Crohn	Kontrollen
Sugawara et al.	106/ 0,815	105/ 0,840	24/ 0,185	20/ 0,160
eigene Daten	472/ 0,763	750/ 0,733	147/ 0,238	273/ 0,267

Tabelle 5.4 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP3=rs3856806=C12467406T in der Literatur; CT und TT wurden addiert, da genauere Daten von Sugawara et al. in der Literatur nicht vorhanden waren

Aus den Tabellen wird ersichtlich, dass sich die Frequenzen der Genotypen des jeweiligen Polymorphismus in den verschiedenen Arbeiten teilweise sehr unterscheiden. Folgende Tabelle vergleicht die aus den vorangegangenen Daten gewonnenen p-Werte:

	p-Wert _{SNP1-Genotyp}	p-Wert _{SNP2-Genotyp}	p-Wert _{SNP3-Genotyp}
Sugawara et al.	$3,76 \times 10^{-8}$	$1,11 \times 10^{-3}$	0,053
Leung et al.	0,54	nicht getestet	nicht getestet
eigene Daten	0,93	0,77	0,40

Tabelle 5.5 p-Werte aus Literatur und den eigenen Daten

Auch die aus den Genotypenfrequenzen errechneten p-Werte unterscheiden sich stark. So stellt Sugawara et al. initial einen stark signifikanten Zusammenhang von SNP1=rs2067819=G12350898A und SNP2=rs3892175=G12359887A mit Morbus Crohn fest. Diese Assoziation konnte aber weder von Leung et al. noch in der eigenen Arbeit repliziert werden. In der Literatur ist man sich der Schwierigkeit, genetische Assoziationen zu replizieren, bewusst [134, 144-146]. Mehrere Gründe können dafür verantwortlich sein. Zum einen stammen Patienten- und Kontrollpersonen der verschiedenen Arbeiten aus verschiedenen geographischen Gebieten, in denen unterschiedliche umweltbedingte und unterschiedliche genetische Herkunft herrschen und Einfluss auf das Ergebnis haben können. Eine weitere Ursache kann das Matching der Kontrollgruppe sein. Eine zu kleine oder unzureichend definierte Kontrollgruppe beeinflusst das Ergebnis maßgeblich [134]. Sehr wichtig für die Power einer Studie ist die Anzahl der Versuchspersonen. Sugawara et al. untersuchte nur 134 Patienten mit Morbus Crohn, wodurch leicht eine Selection Bias (Auswahl-Bias) auftreten kann und es schwierig sein kann, eine Schlussfolgerung aus den Ergebnissen zu ziehen, wenn die beobachtete Genotypenverteilung nicht der Genotypenverteilung in gesunden Individuen entspricht. Diese Problematik wurde auch schon durch Leung et al. diskutiert [143]. Leung et al. untersuchten neben einer Assoziation von dem in dieser Studie getesteten Einzelnukleotidpolymorphismus SNP1=rs2067819=G12350898A mit Morbus Crohn noch zwei weitere Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb des *PPARG*-Gens, rs1805192=Pro12Ala=C34G innerhalb *PPAR-γ2* und den *PPAR-γ3*-Promotor-Polymorphismus C681G. Der Polymorphismus rs1805192=Pro12Ala=C34G zeigte sich protektiv gegenüber Diabetes mellitus Typ 2 [147], gegenüber Atherosklerose im Bereich der Karotiden [148] und Myokardinfarkt [149]. Der *PPAR-γ3*-Promotor-Polymorphismus C681G verhindert die Bindung von STAT5B an den Promotor und somit eine Transaktivierung [150]. Auch diese zwei Einzelnukleotidpolymorphismen zeigten keinerlei Assoziation mit Morbus Crohn [143]. Zwei weitere Studien untersuchten ebenfalls den Polymorphismus rs1805192=Pro12Ala=C34G und konnten wie bei Leung et al. keinerlei signifikante Assoziation nachweisen [151, 152].

5.4.3. Analyse bezüglich einer Prädisposition für Colitis ulcerosa

Die Einzelnukleotidpolymorphismen SNP1=rs2067819=G12350898A, SNP2=rs3892175=G12359887A und SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His innerhalb des *PPARG*-Gens wurden neben einer Assoziation bezüglich einer Prädisposition für Morbus Crohn auch im Hinblick auf die Krankheitsentität Colitis ulcerosa untersucht. Dieser Zusammenhang wurde erstmals untersucht, daher liegen keine Daten aus der Literatur zum Vergleich vor. Es wurden die Genotyp- und Allelfrequenzen von 365 Patienten, die an Colitis ulcerosa erkrankt sind, mit 1280 gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen verglichen und statistisch ausgewertet. Für keinen der drei Polymorphismen zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang.

5.4.4. Geno-Phänotyp-Analyse

Die Ergebnisse von Sugawara et al. stammen größtenteils aus Studien an der SAMP1/YitFc-Maus, welche eine spontan auftretende Ileitis im Alter von 20-30 Wochen zeigt [78, 131]. Ähnlich zu Morbus Crohn bei Menschen zeigt auch diese Ileitis granulomatöse Läsionen und transmurale Läsionen. Daher wurden die drei getesteten Polymorphismen auf eine Assoziation bezüglich eines ilealen Befalls bei den untersuchten 615 Morbus Crohn Patienten hin untersucht; dies geschah auf Basis der Montreal-Klassifikation für chronisch entzündliche Darmerkrankungen [27]. Keine der untersuchten Polymorphismen zeigte eine signifikante Assoziation bezüglich eines ilealen Befalls.

5.4.5. Analyse im Hinblick auf eine Epistasie von *PPARG* mit *ATG16L1*

Neuere Studien zeigen in *ATG16L1*-defizienten Paneth-Zellen eine vermehrte Expression von am PPAR-Signalweg beteiligten Genen [128] sowie eine Autophagie-Induktion durch PPAR- γ [129]. Die Analyse bezüglich einer Epistasie zwischen den untersuchten Polymorphismen innerhalb des *PPARG*-Gens und der Morbus Crohn-assoziierten *ATG16L1*-Variante rs2241880 (p.Thr300Ala) zeigte jedoch keine signifikanten p-Werte.

5.4.6. Genomweite Kopplungsanalysen

Assoziationsstudien, die den Zusammenhang bestimmter Polymorphismen mit einem bestimmten Krankheitsbild untersuchen, werden im Anschluss an genomweiten Kopplungsanalysen durchgeführt, die in einem bestimmten Genabschnitt einen Suszeptibilitätslocus identifizieren (siehe 1.2.5.2) [146].

Zahlreiche genomweite Kopplungsanalysen untersuchten bereits das Genom bezüglich Suszeptibilitätsloci für chronisch entzündliche Darmerkrankungen [74-77, 153-157]. Davon vermuten mehrere einen Suszeptibilitätlocus auf Chromosomenabschnitt 3p, in dem auf Abschnitt 3p25.2 das *PPARG*-Gen liegt. Hampe et al. identifizierten Suszeptibilitätsloci in der Nähe der Short Tandem Repeats (STRs) D3S1304 und D3S1283, die das *PPARG*-Gen umgeben. Diese wiesen einen LOD-Score (logarithm of the odds-score) von 1,65 beziehungsweise 1,40 auf [76]. Der LOD-Score wird zur statistischen Abschätzung herangezogen, ob zwei Genorte nahe beieinander liegen und miteinander vererbt werden. Ein Wert über drei wird dabei normalerweise als Hinweis auf eine Genkopplung gesehen [158]. Duerr et al. identifizierten einen weiteren Locus auf 3p26 [77]. Zwei weitere Arbeiten identifizierten einen Locus in der Nähe von 3p21, was jedoch schon 35 Mbp vom *PPARG*-Gen entfernt liegt [154, 157]. Die anderen Studien konnten keine Suszeptibilitätsloci in der Nähe des *PPARG*-Gens identifizieren. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können durch mehrere Ursachen zu Stande kommen. In den Studien wird immer nur eine bestimmte Anzahl von Mikrosatellitenmarkern oder SNPs untersucht, was die Markerdichte bestimmt, die selbstverständlich nur einen bestimmten Ausschnitt und nicht die komplette Information über das Genom und Vererbung abbilden können. Darüber hinaus sind in den verschiedenen Studien die Phänotypen und das Studiendesign unterschiedlich präzise definiert. Auch die unterschiedliche Stichprobengröße der jeweiligen Studie wirkt sich auf das Ergebnis und die Power aus [146]. Es bleibt das Ergebnis weiterer genomweiter Kopplungsanalysen abzuwarten, die mit größeren Stichproben und genauerer Feinkartierung eine bessere Abbildung des Genoms und seiner Vererbung erreichen.

5.5. Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf eine funktionelle Rolle von PPAR- γ bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Das Ergebnis vieler funktioneller Expressionsstudien und erster therapeutischer Versuche lässt vermuten, dass PPAR- γ bei der Regulierung von Entzündungsvorgängen im Intestinaltrakt beteiligt ist. PPAR- γ wird zu einem hohen Maße im Darm exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei einer durch Bakterien induzierten Entzündung [98]. So greift er in mehrere inflammatorische Signalwege ein, indem er auf Kinasen und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, c-Jun, c-Fos und NFAT einwirkt [92, 115]. Außerdem inhibiert er die mukosale Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α [115] und Chemokinen [159], die Proliferation von inflammatorischen Zellen [160] und die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen [161]. Auch die Regulation der Expression von PPAR- γ in der Mukosa durch Interaktionen mit Bakterien wird beschrieben, was die hohe Expression von PPAR- γ im Kolon erklären würde [98]. Die Gabe von PPAR- γ -Liganden wie die Thiazolidinedione Troglitazone, Rosiglitazone und Pioglitazone an Versuchstiere, bei denen durch verschiedene Chemikalien eine Colitis ausgelöst wurde, zeigte prophylaktische und therapeutische Effekte [110]. Thiazolidinedione-Liganden, die PPAR- γ aktivieren, reduzieren die Th1-vermittelte Entzündung im Colitis-Mausmodell und verschieben die Immunantwort weg von einer Th1-vermittelten hin zu einer Th2-vermittelten Immunantwort. TZDs beeinflussen dabei nicht die mRNA-Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen oder für eine NF- κ B-Aktivierung, was das Vorhandensein eines bislang unbekanntes posttranskriptionalen regulatorischen antiinflammatorischen Mechanismus vermuten lässt; dieser ist von Interesse, um die Rolle von PPAR- γ innerhalb der intestinalen Immunantwort zu verstehen [113]. PPAR- γ wird außerdem auf myeloischen dendritischen Zellen (DC) exprimiert, was eine Rolle innerhalb der Regulation der DC-Funktion mit Antigen-Aufnahme, Aktivierung und Zytokin-Produktion wahrscheinlich macht [162]. Eventuell könnten DCs, die PPAR- γ exprimieren, als ein Mediator zwischen Lipid-Metabolismus und angeborenem Immunsystem dienen [162], dies würde neue therapeutische Optionen bieten [163]. Interessanterweise wurden DCs als ein wichtiger Regulator der intestinalen Inflammation identifiziert, basierend auf ihrer Fähigkeit, bakterielle Antigene aufzunehmen und proinflammatorische Kaskaden zu aktivieren [164-166].

Eine gezielte Ausschaltung des *PPARG*-Gens zeigte bei Versuchstieren eine Verschlimmerung der Colitis (siehe 1.3.4.4). Auch das in der Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen seit langem verwendete Medikament 5-Aminosalizylsäure (5-ASA) scheint über PPAR- γ zu wirken [94].

In einer Studie mit 15 Colitis ulcerosa-Patienten, die bei einem aktiven Schub den PPAR- γ -Liganden Rosiglitazone über zwölf Wochen erhielten, zeigten vier Patienten eine klinische Remission und drei der vier auch eine endoskopische Remission; weitere vier Patienten zeigten eine Verbesserung des Krankheitsbildes ohne vollständige Remission [126]. Colonepithelzellen von Colitis ulcerosa-Patienten zeigten eine um 60% reduzierte Expression von PPAR- γ -mRNA und -Proteinspiegel gegenüber Morbus Crohn-Patienten und gesunden Individuen [96].

5.6. Schlussfolgerung

Der aktuelle Forschungsstand lässt eine Beteiligung von PPAR- γ bei der Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung vermuten. Eine genauere Kenntnis über die Expression und seine Funktion innerhalb der intestinalen Homöostase und Inflammation ist jedoch nötig, um die Rolle von PPAR- γ bei der Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung vollständig zu verstehen. Eine Mitbeteiligung der in dieser Arbeit getesteten Einzelnukleotidpolymorphismen SNP1=rs2067819=G12350898A, SNP2=rs3892175=G12359887A und SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His im *PPARG*-Gen bei der Entstehung eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnten erfolgreich einige Gene identifiziert werden, die zur Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen beitragen können. Den initialen Erfolg hatten zwei Arbeitsgruppen mit der Identifikation von *NOD2/CARD15*; seitdem wurden mehrere zusätzliche Prädispositionsloci gefunden [28]. Verschiedene Kopplungsanalysen postulieren einen Suszeptibilitätsloкус auf Chromosomenabschnitt 3p21-26, in dem unter anderem auf Abschnitt 3p25.2 das *PPARG*-Gen liegt [74-77]. Dessen Analogon *PPAR-γ* bei Nagern identifizierten Sugawara et al. anhand der SAMP1/YitFc-Maus als neuen Suszeptibilitätsloкус für den Morbus Crohn. Die darauf folgende Testung von drei Polymorphismen innerhalb des humanen *PPARG*-Gens in einer Stichprobe von 134 Morbus Crohn-Patienten zeigte für zwei Polymorphismen eine starke Assoziation mit Morbus Crohn und identifizierte das *PPARG*-Gen als weiteres mögliches Suszeptibilitätsgen [78].

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob sich aus der Sicht möglicher genetischer Assoziationen Hinweise für eine Rolle der von Sugawara et al. untersuchten Polymorphismen im *PPARG*-Gen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ergeben. Dafür wurden 616 Patienten mit Morbus Crohn, 365 Patienten mit Colitis ulcerosa und 1280 gesunde, nicht verwandte Kontrollen auf folgende drei Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb des *PPARG*-Gens untersucht:

1. SNP1=rs2067819=G12350898A
2. SNP2=rs3892175=G12359887A
3. SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His

Vier Punkte wurden dabei bearbeitet:

1. Es sollten die Auswirkungen der drei oben genannten Polymorphismen im *PPARG*-Gen auf die Krankheitssuszeptibilität des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa geklärt werden. Dabei zeigten die Allelfrequenzen der Patientengruppe, die an Morbus Crohn erkrankt ist, wie auch die Patientengruppe, die an Colitis ulcerosa erkrankt ist, für keine der drei untersuchten Polymorphismen signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe, womit die von Sugawara et al. beschriebenen Assoziationen vor allem von SNP1 und SNP2 mit Morbus Crohn nicht bestätigt werden

konnte [78]. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit einer neuseeländischen Studie mit 182 Morbus Crohn-Patienten [143] und weiteren Kopplungsanalysen [153-156], die ebenfalls keine Assoziation mit dieser Region feststellen konnten.

2. Weiterhin wurde untersucht, ob bestimmte Haplotypen Assoziationen mit einem der Krankheitsbilder zeigen. Der Vergleich der Haplotyp-Frequenzen erbrachte jedoch keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Verteilung zwischen den Morbus Crohn- beziehungsweise den Colitis ulcerosa-Patienten und der Kontrollgruppe.
3. Zusätzlich wurde eine Analyse bezüglich einer Epistasis zwischen Mutationen im *PPARG*- und *ATG16L1*-Gen durchgeführt, die keine signifikante Assoziation zeigte.
4. Zuletzt wurde eine Genotyp-Phänotyp-Analyse bezüglich einer ilealen Beteiligung auf Grundlage der Montreal-Klassifikation vorgenommen, die ebenfalls für keines der untersuchten Polymorphismen eine signifikante Assoziation zeigte.

Das Ergebnis funktioneller Expressionsstudien und erster therapeutischer Versuche lässt vermuten, dass PPAR- γ bei der Regulierung von Entzündungsvorgängen im Intestinaltrakt beteiligt ist. Eine genauere Kenntnis über die Expression und seine Funktion innerhalb der intestinalen Homöostase und Inflammation ist jedoch nötig, um die Rolle von PPAR- γ bei der Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung vollständig zu verstehen. Die eigene Arbeit ist die größte eigenständige Publikation zu PPAR- γ und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen; eine Mitbeteiligung bei der Entstehung eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa der in dieser Arbeit getesteten Einzelnukleotidpolymorphismen SNP1=rs2067819=G12350898A, SNP2=rs3892175=G12359887A und SNP3=rs3856806=C12467406T=p.His449His im *PPARG*-Gen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

7. Abkürzungen und Begriffe

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro- (10 ⁻⁶)
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
15d-PGJ2	15-deoxy-Δ-Prostaglandin-J2
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
AF-1	ligand-independent activation function 1
AF-2	ligand-dependent activation function 2
AIEC	adherent-invasive <i>Escherichia coli</i>
AP-1	activator protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATG16L1	ATG16 autophagy related 16-like 1
bp	Basenpaar(e)
C	Celsius
CARD15	Caspase activation and recruitment domain 15
CCL5	CC chemokine ligand 5/ RANTES
CCR2	Chemokin-(C-C motif)-Receptor 2
CLA	conjugated linoleic acid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie
CU	Colitis ulcerosa
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
DALM	dysplasia associated lesion or mass
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DR-1	Direct Repeat-1
DSS	Dextransodiumsulfat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FMOC-L-leu	fluorenylmethyloxycarbonyl-L-leucine
FXR	Bile Acid and Farnesol X Receptor
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HODE	Hydroxyoctadecadienoicssäure
IBD	Inflammatory bowel disease
IEN	Intraepitheliale Neoplasie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-10 KO	Interleukin-10 knockout mice
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP-10	interferon-gamma-inducible protein-10
IκBβ	IκappaB-Kinase Beta
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LDL	low-density-Lipoproteinen

LXR	Oxysterol Liver X Receptor
m	Milli- (10^{-3})
M	Molar (mol/l)
MAPK	mitogen activated protein kinase
MC	Morbus Crohn
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP-9	Matrixmetallproteinase 9/ Gelatinase-B
mRNA	messenger ribonucleid acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NCoR	nuclear receptor co-repressor
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	nuclear factor ` κ -light-chain-enhancer` of activated B-cells
ng	Nanogramm
NH₄Cl	Ammoniumchlorid
NHR	Nuclear Hormone Receptor
nm	Nanometer
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain 2
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral-blood mononuclear cells
PBP	PPAR binding protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptors
PPAR-γfl/flCre+	PPAR- γ conditional knockout mice
PPRE	Peroxisome proliferator response element
PRR	Pattern-recognition Receptor
PTERG4	Prostaglandine E receptor 4
RFLP	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus
RXRα	retinoid x receptor α
sec	Sekunden
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPPARM	Selektive PPAR Modulator
SR-A	Scavenger-Rezeptor-A
SRC-1	steroid receptor coactivator-1
STAT-1	signal Transducer and activator of transcription-1
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like Receptor
TNBS	2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TR	Thyroid Receptor

Tris	Tromethamin
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
VDR	Vitamin D Receptor

8. Tabellen und Abbildungsverzeichnis

8.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Bestätigte Assoziationen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [47].....	16
Tabelle 1.2 Signifikante (Bonferroni $P < 0,05$) replizierte Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn [73].....	17
Tabelle 1.3 Effekte von PPAR- γ und seiner Liganden auf inflammatorische Zellen [79].	25
Tabelle 1.4 Antiinflammatorische Effekte von PPAR- γ in Tiermodellen [98].	28
Tabelle 2.1 Basisdaten der Studienpopulation.....	32
Tabelle 2.2 Materialien für die DNA-Isolierung.....	33
Tabelle 2.3 Materialien für die Polymerasekettenreaktion und für die Reinigung der PCR-Produkte	34
Tabelle 2.4 Verwendete Restriktionsenzyme für den Restriktionsverdau	34
Tabelle 2.5 Verwendete Restriktionspuffer für den Restriktionsverdau.....	34
Tabelle 2.6 Materialien für die Agarosegelelektrophorese	34
Tabelle 2.7 Primer für <i>PPARG</i> SNP1 (rs2067819)	35
Tabelle 2.8 Primer für <i>PPARG</i> SNP2 (rs3892175)	35
Tabelle 2.9 Primer für <i>PPARG</i> SNP3 (rs3856806)	35
Tabelle 2.10 Verwendete Geräte für die DNA-Isolierung, die Polymerasekettenreaktion, den Restriktionsverdau und die Agarosegelelektrophorese.....	36
Tabelle 3.1 Begriffserklärung der in der Formel (siehe Abbildung 3.1) enthaltenen Abkürzungen	39
Tabelle 3.2 Darstellung der drei Teilschritte der Polymerasekettenreaktion	39
Tabelle 3.3 Darstellung der Reaktionsfolge der Polymerasekettenreaktion.....	40
Tabelle 3.4 Verwendete Materialien für den PCR-Ansatz.....	40
Tabelle 3.5 MgCl ₂ -Konzentration, Annealing-Temperatur und Produktlänge des Amplifikats der jeweiligen unersuchten Zielsequenz	41
Tabelle 3.6 Verwendete Materialien für den Restriktionsverdau mit Konzentrations- und Volumenangabe	42
Tabelle 3.7 Verwendete Restriktionsenzyme mit jeweiliger Restriktionsbedingung .	42
Tabelle 3.8 Darstellung der Vierfeldertafel zur Berechnung des Signifikanzwertes .	47

Tabelle 3.9 Darstellung der drei Signifikanzniveaus	48
Tabelle 3.10 Darstellung des Punnet-Quadrats zur Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts.....	48
Tabelle 4.1 Demographische Eigenschaften der Studienpopulation.....	51
Tabelle 4.2 Bandenmuster des jeweiligen Genotyps für SNP1=rs2067819 im <i>PPARG</i> -Gen.....	52
Tabelle 4.3 Allel- und Genotypverteilung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie der Kontrollgruppe für den Polymorphismus SNP1=rs2067819	53
Tabelle 4.4 Bandenmuster des jeweiligen Genotyps für SNP2=rs3892175 im <i>PPARG</i> -Gen.....	54
Tabelle 4.5 Bandenmuster des jeweiligen Genotyps für SNP3=rs3856806 im <i>PPARG</i> -Gen.....	55
Tabelle 4.6 Allel- und Genotypenverteilung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie der Kontrollgruppe für SNP 3=rs3856806	56
Tabelle 4.7 Allelfrequenzen, p-Werte und Odds Ratio für die drei getesteten Polymorphismen im <i>PPARG</i> -Gen. Abkürzungen: MAF, minor allele frequencies; OR, odds ratio; CI, confidence interval.....	57
Tabelle 4.8 Frequenzen der Haplotypen bestehend aus den SNPs rs2067819, rs3892175 und rs3856806 bei Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen.	58
Tabelle 4.9 Genotyp-Phänotyp-Analyse für die drei getesteten SNPs bei Patienten mit Morbus Crohn.....	59
Tabelle 4.10 Analyse der Epistasie zwischen den SNPs rs2067819, rs3892175, rs3856806 (p.His447His) im <i>PPARG</i> -Gen und dem SNP rs2241880 (p.Thr300Ala) innerhalb des <i>ATG16L1</i> -Gen bezüglich einer Suszeptibilität für CED.....	60
Tabelle 5.1 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP1=rs2067819=G12350898A in der Literatur.....	64
Tabelle 5.2 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP1=rs2067819=G12350898A von Leung et al. mit den eigenen Daten	65
Tabelle 5.3 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP2=rs3892175=G12359887A in der Literatur.....	65
Tabelle 5.4 Vergleich der Frequenzen der verschiedenen Genotypen von SNP3=rs3856806=C12467406T in der Literatur	65

Tabelle 5.5 p-Werte aus Literatur und den eigenen Daten	65
--	----

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Modell zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED).....	8
Abbildung 1.2 Ungleichgewicht zwischen anti- und proinflammatorischen Zytokinen beim Morbus Crohn [38]	12
Abbildung 1.3 Schema der Struktur der PPAR-Familie [83].....	19
Abbildung 1.4 zeigt die Hexanukleotidmotive AGGTCA der PPRE-Elemente, die durch ein Basenpaar getrennt sind [85].....	19
Abbildung 1.5 Dreidimensionale Bilder in zwei Ebenen eines PPAR- γ -RXR α - Komplexes mit Bindung an ein PPRE.	20
Abbildung 1.6 zeigt die DNA-Bindungs-Domänen (DBDs) sowie deren C-terminalen Verlängerung von PPAR- γ (rot) und RXR α (blau) [85]	20
Abbildung 1.7 PPAR- γ -mRNA-Expression in verschiedenen Geweben.	21
Abbildung 1.8 Genomische Organisation des humanen <i>PPARG</i> -Gens [82].....	21
Abbildung 1.9 Die vier verschiedenen PPAR- γ -mRNA-Isoformen [82]	22
Abbildung 1.10 Dreidimensionales Bild der Struktur eines PPAR- γ -Proteins (graugrün) mit gebundenem MRL-20 (gelb) [89]	22
Abbildung 1.11 zeigt Rosiglitazone an die Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) von PPAR- γ gebunden.....	23
Abbildung 1.12 Lokalisation von SNP1-3 im <i>PPARG</i> -Gen [78].....	30
Abbildung 3.1 Formel zur Berechnung der Konzentration der Nukleinsäuren	38
Abbildung 3.2 Genotypisierung des SNP1=rs2067819 im <i>PPARG</i> -Gen.....	44
Abbildung 3.3 Genotypisierung des SNP2=rs3892175 im <i>PPARG</i> -Gen.....	45
Abbildung 3.4 Genotypisierung des SNP3=rs3856806 im <i>PPARG</i> -Gen.....	46
Abbildung 3.5 Formel zur Berechnung der Prüfgröße mittels Chi-Quadrat-Test.....	47
Abbildung 3.6 Formel zur Berechnung der Prüfgröße mittels exaktem Test nach Fisher	47
Abbildung 3.7 Formel zur Berechnung der Signifikanz	49
Abbildung 3.8 Formel zur Berechnung der Gen- oder Allelfrequenzen.....	49
Abbildung 4.1 Nachweis des SNP1=rs2067819 im <i>PPARG</i> -Gen	52
Abbildung 4.2 Nachweis des SNP2=rs3892175 im <i>PPARG</i> -Gen	54

Abbildung 4.3 Allel- und Genotypverteilung bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie der Kontrollgruppe für SNP2=rs3892175 54

Abbildung 4.4 Nachweis des SNP 3=rs3856806 im *PPARG*-Gen 56

9. Literatur

1. Nerich, V., E. Monnet, A. Etienne, S. Louafi, C. Ramee, S. Rican, A. Weill, N. Vallier, V. Vanboeckstael, G.R. Auleley, H. Allemand, and F. Carbonnel, Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12(3): 218-26.
2. Shivananda, S., J. Lennard-Jones, R. Logan, N. Fear, A. Price, L. Carpenter, and M. van Blankenstein, Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*, 1996. 39(5): 690-7.
3. Ott, C., F. Obermeier, S. Thieler, D. Kemptner, A. Bauer, J. Scholmerich, G. Rogler, and A. Timmer, The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2008. 20(9): 917-23.
4. Yapp, T.R., R. Stenson, G.A. Thomas, B.W. Lawrie, G.T. Williams, and A.B. Hawthorne, Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2000. 12(8): 907-11.
5. Loftus, C.G., E.V. Loftus, Jr., W.S. Harmsen, A.R. Zinsmeister, W.J. Tremaine, L.J. Melton, 3rd, and W.J. Sandborn, Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. 13(3): 254-61.
6. Bernstein, C.N., A. Wajda, L.W. Svenson, A. MacKenzie, M. Koehoorn, M. Jackson, R. Fedorak, D. Israel, and J.F. Blanchard, The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol*, 2006. 101(7): 1559-68.
7. Goh, K. and S.D. Xiao, Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis*, 2009. 10(1): 1-6.
8. Arin Letamendia, A., F. Borda Celaya, M.J. Burusco Paternain, C. Prieto Martinez, A. Martinez Echeverria, I. Elizalde Apestegui, M. Laiglesia Izquierdo, E. Macias Mendizabal, P. Tamburri Moso, and F. Sanchez Valverde, [High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study]. *Gastroenterol Hepatol*, 2008. 31(3): 111-6.
9. Appleyard, C.B., G. Hernandez, and C.F. Rios-Bedoya, Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(2): 106-11.
10. Blanchard, J.F., C.N. Bernstein, A. Wajda, and P. Rawsthorne, Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol*, 2001. 154(4): 328-35.

11. Yang, S.K., S. Yun, J.H. Kim, J.Y. Park, H.Y. Kim, Y.H. Kim, D.K. Chang, J.S. Kim, I.S. Song, J.B. Park, E.R. Park, K.J. Kim, G. Moon, and S.H. Yang, Epidemiology of inflammatory bowel disease in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-2005: a KASID study. *Inflamm Bowel Dis*, 2008. 14(4): 542-9.
12. Vlachonikolis, I.G., I.E. Koutroubakis, and O.N. Manousos, Epidemiology of inflammatory bowel disease in Heraklion, Crete. *Scand J Gastroenterol*, 2001. 36(9): 1008.
13. Loftus, E.V., Jr., P. Schoenfeld, and W.J. Sandborn, The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002. 16(1): 51-60.
14. Bjornsson, S. and J.H. Johannsson, Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2000. 12(1): 31-8.
15. Baumgart, D.C., The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int*, 2009. 106(8): 123-33.
16. Hoffmann, J.C., F. Autschbach, B. Bokemeyer, H.J. Buhr, K. Herrlinger, W. Hohne, C. Krieglstein, W. Kruis, G. Moser, J.C. Preiss, M. Reinshagen, G. Rogler, S. Schreiber, A.G. Schreyer, B. Siegmund, A. Stallmach, E.F. Stange, and M. Zeitz, [Short version of the updated German S3 (level 3) guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2008. 133(38): 1924-9.
17. Ochsenkuhn, T., M. Sackmann, and B. Goke, [Inflammatory bowel diseases (IBD) -- critical discussion of etiology, pathogenesis, diagnostics, and therapy]. *Radiologe*, 2003. 43(1): 1-8.
18. Knebel, U., H.J. Brambs, and J.F. Riemann, [Ulcerative colitis. Clinical diagnosis]. *Z Gastroenterol*, 2004. 42(9): 987-92.
19. Jurgens, M., R.P. Laubender, F. Hartl, M. Weidinger, J. Seiderer, J. Wagner, M. Wetzke, F. Beigel, S. Pfennig, J. Stallhofer, F. Schnitzler, C. Tillack, P. Lohse, B. Goke, J. Glas, T. Ochsenkuhn, and S. Brand, Disease activity, ANCA, and IL23R genotype status determine early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 105(8): 1811-9.
20. Reissmann, A., S.C. Bischoff, and W. Fleig, [Ulcerative colitis. Acute episode]. *Z Gastroenterol*, 2004. 42(9): 994-8.
21. Hoffmann, J.C., O. Schwandner, and H.P. Bruch, [Ulcerative colitis. Fulminant disease]. *Z Gastroenterol*, 2004. 42(9): 1002-6.
22. Dignass, A.U., K. Herrlinger, and J. Scholmerich, [Ulcerative colitis. Chronic active course]. *Z Gastroenterol*, 2004. 42(9): 1006-10.

23. Kruis, W. and S. Schreiber, [Ulcerative colitis. Maintenance therapy]. *Z Gastroenterol*, 2004. 42(9): 1011-4.
24. Buhr, H.J., M. Utzig, and E. Stange, [Surgery in ulcerative colitis]. *Z Gastroenterol*, 2004. 42(9): 1018-20.
25. Gasche, C., J. Scholmerich, J. Brynskov, G. D'Haens, S.B. Hanauer, E.J. Irvine, D.P. Jewell, D. Rachmilewitz, D.B. Sachar, W.J. Sandborn, and L.R. Sutherland, A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*, 2000. 6(1): 8-15.
26. Satsangi, J., M.S. Silverberg, S. Vermeire, and J.F. Colombel, The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 2006. 55(6): 749-53.
27. Silverberg, M.S., J. Satsangi, T. Ahmad, I.D. Arnott, C.N. Bernstein, S.R. Brant, R. Caprilli, J.F. Colombel, C. Gasche, K. Geboes, D.P. Jewell, A. Karban, E.V. Loftus Jr, A.S. Pena, R.H. Riddell, D.B. Sachar, S. Schreiber, A.H. Steinhart, S.R. Targan, S. Vermeire, and B.F. Warren, Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, 2005. 19 Suppl A: 5-36.
28. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2007. 448(7152): 427-34.
29. Loftus, E.V., Jr., Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 2004. 126(6): 1504-17.
30. Hanauer, S.B., Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. 12 Suppl 1: S3-9.
31. Oliva-Hemker, M. and C. Fiocchi, Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. 8(2): 112-28.
32. Bonen, D.K. and J.H. Cho, The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2003. 124(2): 521-36.
33. Mahida, Y.R. and V.E. Rolfe, Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)*, 2004. 107(4): 331-41.
34. Elson, C.O., Y. Cong, V.J. McCracken, R.A. Dimmitt, R.G. Lorenz, and C.T. Weaver, Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*, 2005. 206: 260-76.
35. Barnich, N., F.A. Carvalho, A.L. Glasser, C. Darcha, P. Jantscheff, M. Allez, H. Peeters, G. Bommelaer, P. Desreumaux, J.F. Colombel, and A. Darfeuille-Michaud, CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*,

- supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest*, 2007. 117(6): 1566-74.
36. Sutherland, L., J. Singleton, J. Sessions, S. Hanauer, E. Krawitt, G. Rankin, R. Summers, H. Mekhjian, N. Greenberger, M. Kelly, and et al., Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut*, 1991. 32(9): 1071-5.
 37. Matter, K. and M.S. Balda, Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 9): 1505-11.
 38. Brand, S., Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, 2009. 58(8): 1152-67.
 39. Podolsky, D.K., Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol*, 1999. 277(3 Pt 1): G495-9.
 40. Gassler, N., C. Rohr, A. Schneider, J. Kartenbeck, A. Bach, N. Obermuller, H.F. Otto, and F. Autschbach, Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 281(1): G216-28.
 41. Bouma, G. and W. Strober, The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(7): 521-33.
 42. Van Limbergen, J., R.K. Russell, E.R. Nimmo, G.T. Ho, I.D. Arnott, D.C. Wilson, and J. Satsangi, Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2006.
 43. Cario, E. and D.K. Podolsky, Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 2000. 68(12): 7010-7.
 44. Newman, B. and K.A. Siminovitch, Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005. 21(4): 401-7.
 45. Hugot, J.P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas, Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. 411(6837): 599-603.
 46. Thompson-Chagoyan, O.C., J. Maldonado, and A. Gil, Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr*, 2005. 24(3): 339-52.
 47. Cho, J.H. and C.T. Weaver, The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2007. 133(4): 1327-39.

48. Duerr, R.H., K.D. Taylor, S.R. Brant, J.D. Rioux, M.S. Silverberg, M.J. Daly, A.H. Steinhart, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L.W. Datta, E.O. Kistner, L.P. Schumm, A.T. Lee, P.K. Gregersen, M.M. Barmada, J.I. Rotter, D.L. Nicolae, and J.H. Cho, A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 2006. 314(5804): 1461-3.
49. Podolsky, D.K., Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 2002. 347(6): 417-29.
50. Kurata, J.H., S. Kantor-Fish, H. Frankl, P. Godby, and C.M. Vadheim, Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology*, 1992. 102(6): 1940-8.
51. Yang, H., K.D. Taylor, and J.I. Rotter, Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol Genet Metab*, 2001. 74(1-2): 1-21.
52. Farmer, R.G., W.M. Michener, and E.A. Mortimer, Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol*, 1980. 9(2): 271-7.
53. Orholm, M., P. Munkholm, E. Langholz, O.H. Nielsen, T.I. Sorensen, and V. Binder, Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 1991. 324(2): 84-8.
54. Binder, V., Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis*, 1998. 16(6): 351-5.
55. Brant, S.R. and Y.Y. Shugart, Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. 10(3): 300-11.
56. Montgomery, S.M., D.L. Morris, N.P. Thompson, J. Subhani, R.E. Pounder, and A.J. Wakefield, Prevalence of inflammatory bowel disease in British 26 year olds: national longitudinal birth cohort. *Bmj*, 1998. 316(7137): 1058-9.
57. Dean, M., Approaches to identify genes for complex human diseases: lessons from Mendelian disorders. *Hum Mutat*, 2003. 22(4): 261-74.
58. Bishop, D.T. and J.A. Williamson, The power of identity-by-state methods for linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 1990. 46(2): 254-65.
59. Risch, N., Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs. *Am J Hum Genet*, 1990. 46(2): 242-53.
60. Hugot, J.-P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.-P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.-F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas, Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. 2001. 411(6837): 599-603.

61. Ogura, Y., D.K. Bonen, N. Inohara, D.L. Nicolae, F.F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R.H. Duerr, J.-P. Achkar, S.R. Brant, T.M. Bayless, B.S. Kirschner, S.B. Hanauer, G. Nunez, and J.H. Cho, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. 2001. 411(6837): 603-606.
62. Duerr, R.H., K.D. Taylor, S.R. Brant, J.D. Rioux, M.S. Silverberg, M.J. Daly, A.H. Steinhart, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L.W. Datta, E.O. Kistner, L.P. Schumm, A.T. Lee, P.K. Gregersen, M.M. Barmada, J.I. Rotter, D.L. Nicolae, and J.H. Cho, A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science*, 2006. 314(5804): 1461-1463.
63. Glas, J., J. Seiderer, M. Wetzke, A. Konrad, H.P. Torok, S. Schmechel, L. Tonenchi, C. Grassl, J. Dambacher, S. Pfennig, K. Maier, T. Griga, W. Klein, J.T. Eppel, U. Schiemann, C. Folwaczny, P. Lohse, B. Goke, T. Ochsenkuhn, B. Muller-Myhsok, M. Folwaczny, T. Mussack, and S. Brand, rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS ONE*, 2007. 2(9): e819.
64. Hampe, J., A. Franke, P. Rosenstiel, A. Till, M. Teuber, K. Huse, M. Albrecht, G. Mayr, F.M. De La Vega, J. Briggs, S. Gunther, N.J. Prescott, C.M. Onnie, R. Hasler, B. Sipos, U.R. Folsch, T. Lengauer, M. Platzer, C.G. Mathew, M. Krawczak, and S. Schreiber, A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. 2007. 39(2): 207-211.
65. Rioux, J.D., R.J. Xavier, K.D. Taylor, M.S. Silverberg, P. Goyette, A. Huett, T. Green, P. Kuballa, M.M. Barmada, L.W. Datta, Y.Y. Shugart, A.M. Griffiths, S.R. Targan, A.F. Ippoliti, E.-J. Bernard, L. Mei, D.L. Nicolae, M. Regueiro, L.P. Schumm, A.H. Steinhart, J.I. Rotter, R.H. Duerr, J.H. Cho, M.J. Daly, and S.R. Brant, Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. 2007. 39(5): 596-604.
66. Libioulle, C.c., E. Louis, S. Hansoul, C. Sandor, F.d.r. Farnir, D. Franchimont, S.v. Vermeire, O. Dewit, M. de Vos, A. Dixon, B. Demarche, I. Gut, S. Heath, M. Foglio, L. Liang, D. Laukens, M. Mni, D. Zelenika, A.V. Gossuin, P. Rutgeerts, J. Belaiche, M. Lathrop, and M. Georges, Novel Crohn Disease Locus Identified by Genome-Wide Association Maps to a Gene Desert on 5p13.1 and Modulates Expression of PTGER4. *PLoS Genetics*, 2007. 3(4): e58.
67. Giallourakis, C., M. Stoll, K. Miller, J. Hampe, E.S. Lander, M.J. Daly, S. Schreiber, and J.D. Rioux, 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(1): 205-11.

-
68. Peltekova, V.D., R.F. Wintle, L.A. Rubin, C.I. Amos, Q. Huang, X. Gu, B. Newman, M. Van Oene, D. Cescon, G. Greenberg, A.M. Griffiths, P.H. St George-Hyslop, and K.A. Siminovitch, Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*, 2004. 36(5): 471-5.
69. Rioux, J.D., M.J. Daly, M.S. Silverberg, K. Lindblad, H. Steinhart, Z. Cohen, T. Delmonte, K. Kocher, K. Miller, S. Guschwan, E.J. Kulbokas, S. O'Leary, E. Winchester, K. Dewar, T. Green, V. Stone, C. Chow, A. Cohen, D. Langelier, G. Lapointe, D. Gaudet, J. Faith, N. Branco, S.B. Bull, R.S. McLeod, A.M. Griffiths, A. Bitton, G.R. Greenberg, E.S. Lander, K.A. Siminovitch, and T.J. Hudson, Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet*, 2001. 29(2): 223-8.
70. Stokkers, P.C., P.H. Reitsma, G.N. Tytgat, and S.J. van Deventer, HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*, 1999. 45(3): 395-401.
71. Parkes, M., J.C. Barrett, N.J. Prescott, M. Tremelling, C.A. Anderson, S.A. Fisher, R.G. Roberts, E.R. Nimmo, F.R. Cummings, D. Soars, H. Drummond, C.W. Lees, S.A. Khawaja, R. Bagnall, D.A. Burke, C.E. Todhunter, T. Ahmad, C.M. Onnie, W. McArdle, D. Strachan, G. Bethel, C. Bryan, C.M. Lewis, P. Deloukas, A. Forbes, J. Sanderson, D.P. Jewell, J. Satsangi, J.C. Mansfield, L. Cardon, and C.G. Mathew, Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. 2007. 39(7): 830-832.
72. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. 2007. 447(7145): 661-678.
73. Barrett, J.C., S. Hansoul, D.L. Nicolae, J.H. Cho, R.H. Duerr, J.D. Rioux, S.R. Brant, M.S. Silverberg, K.D. Taylor, M.M. Barmada, A. Bitton, T. Dassopoulos, L.W. Datta, T. Green, A.M. Griffiths, E.O. Kistner, M.T. Murtha, M.D. Regueiro, J.I. Rotter, L.P. Schumm, A.H. Steinhart, S.R. Targan, R.J. Xavier, C. Libioulle, C. Sandor, M. Lathrop, J. Belaiche, O. Dewit, I. Gut, S. Heath, D. Laukens, M. Mni, P. Rutgeerts, A. Van Gossum, D. Zelenika, D. Franchimont, J.P. Hugot, M. de Vos, S. Vermeire, E. Louis, L.R. Cardon, C.A. Anderson, H. Drummond, E. Nimmo, T. Ahmad, N.J. Prescott, C.M. Onnie, S.A. Fisher, J. Marchini, J. Ghorri, S. Bumpstead, R. Gwilliam, M. Tremelling, P. Deloukas, J. Mansfield, D. Jewell, J. Satsangi, C.G. Mathew, M. Parkes, M. Georges, and M.J. Daly, Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*, 2008. 40(8): 955-62.
74. Satsangi, J., M. Parkes, E. Louis, L. Hashimoto, N. Kato, K. Welsh, J.D. Terwilliger, G.M. Lathrop, J.I. Bell, and D.P. Jewell, Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet*, 1996. 14(2): 199-202.
75. Cho, J.H., D.L. Nicolae, L.H. Gold, C.T. Fields, M.C. LaBuda, P.M. Rohal, M.R. Pickles, L. Qin, Y. Fu, J.S. Mann, B.S. Kirschner, E.W. Jabs, J. Weber, S.B. Hanauer, T.M. Bayless, and S.R. Brant, Identification of novel

- susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(13): 7502-7.
76. Hampe, J., N.J. Lynch, S. Daniels, S. Bridger, A.J. Macpherson, P. Stokkers, A. Forbes, J.E. Lennard-Jones, C.G. Mathew, M.E. Curran, and S. Schreiber, Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2001. 48(2): 191-7.
 77. Duerr, R.H., M.M. Barmada, L. Zhang, J.P. Achkar, J.H. Cho, S.B. Hanauer, S.R. Brant, T.M. Bayless, R.N. Baldassano, and D.E. Weeks, Evidence for an inflammatory bowel disease locus on chromosome 3p26: linkage, transmission/disequilibrium and partitioning of linkage. *Hum Mol Genet*, 2002. 11(21): 2599-606.
 78. Sugawara, K., T.S. Olson, C.A. Moskaluk, B.K. Stevens, S. Hoang, K. Kozaiwa, F. Cominelli, K.F. Ley, and M. McDuffie, Linkage to peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in SAMP1/YitFc mice and in human Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2005. 128(2): 351-60.
 79. Kostadinova, R., W. Wahli, and L. Michalik, PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Curr Med Chem*, 2005. 12(25): 2995-3009.
 80. Michalik, L., B. Desvergne, and W. Wahli, Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(1): 61-70.
 81. Dreyer, C., G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, and W. Wahli, Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 1992. 68(5): 879-87.
 82. Meirhaeghe, A. and P. Amouyel, Impact of genetic variation of PPARgamma in humans. *Mol Genet Metab*, 2004. 83(1-2): 93-102.
 83. Moraes, L.A., L. Piqueras, and D. Bishop-Bailey, Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*, 2006. 110(3): 371-85.
 84. Kliewer, S.A., K. Umesono, D.J. Noonan, R.A. Heyman, and R.M. Evans, Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, 1992. 358(6389): 771-774.
 85. Chandra, V., P. Huang, Y. Hamuro, S. Raghuram, Y. Wang, T.P. Burris, and F. Rastinejad, Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 2008: 350-356.
 86. Kota, B.P., T.H. Huang, and B.D. Roufogalis, An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, 2005. 51(2): 85-94.
 87. Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A.M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J.C. Fruchart, S. Deeb, A. Vidal-Puig, J. Flier, M.R. Briggs, B. Staels, H. Vidal, and J. Auwerx, The organization, promoter analysis, and

- expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, 1997. 272(30): 18779-89.
88. Dubuquoy, L., S. Dharancy, S. Nutten, S. Pettersson, J. Auwerx, and P. Desreumaux, Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet*, 2002. 360(9343): 1410-8.
 89. Bruning, J.B., M.J. Chalmers, S. Prasad, S.A. Busby, T.M. Kamenecka, Y. He, K.W. Nettles, and P.R. Griffin, Partial agonists activate PPARgamma using a helix 12 independent mechanism. *Structure*, 2007. 15(10): 1258-71.
 90. Szeles, L., D. Torocsik, and L. Nagy, PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(8): 1014-30.
 91. Wu, G.D., Is there a role for PPAR gamma in IBD? Yes, no, maybe. *Gastroenterology*, 2003. 124(5): 1538-42.
 92. Su, C.G., X. Wen, S.T. Bailey, W. Jiang, S.M. Rangwala, S.A. Keilbaugh, A. Flanigan, S. Murthy, M.A. Lazar, and G.D. Wu, A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*, 1999. 104(4): 383-9.
 93. Lewis, S.N., J. Bassaganya-Riera, and D.R. Bevan, Virtual Screening as a Technique for PPAR Modulator Discovery. *PPAR Res*, 2009. 2010: 861238.
 94. Rousseaux, C., B. Lefebvre, L. Dubuquoy, P. Lefebvre, O. Romano, J. Auwerx, D. Metzger, W. Wahli, B. Desvergne, G.C. Naccari, P. Chavatte, A. Farce, P. Bulois, A. Cortot, J.F. Colombel, and P. Desreumaux, Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med*, 2005. 201(8): 1205-1215.
 95. Balint, B.L. and L. Nagy, Selective modulators of PPAR activity as new therapeutic tools in metabolic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006. 6(1): 33-43.
 96. Dubuquoy, L., E.A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J.-F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux, Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003. 124(5): 1265-1276.
 97. Konturek, P.C., J. Kania, V. Kukharsky, M. Raithel, M. Ocker, K. Rembiasz, E.G. Hahn, and S.J. Konturek, Implication of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and proinflammatory cytokines in gastric carcinogenesis: link to Helicobacter pylori-infection. *J Pharmacol Sci*, 2004. 96(2): 134-43.
 98. Dubuquoy, L., C. Rousseaux, X. Thuru, L. Peyrin-Biroulet, O. Romano, P. Chavatte, M. Chamillard, and P. Desreumaux, PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 2006. 55(9): 1341-9.

99. Drori, S., G.D. Girnun, L. Tou, J.D. Szwaya, E. Mueller, X. Kia, R.A. Shivdasani, and B.M. Spiegelman, Hic-5 regulates an epithelial program mediated by PPARgamma. *Genes Dev.*, 2005. 19(3): 362-375.
100. Ricote, M. and C.K. Glass, PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(8): 926-35.
101. Zhang, B., J. Berger, E. Hu, D. Szalkowski, S. White-Carrington, B.M. Spiegelman, and D.E. Moller, Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol*, 1996. 10(11): 1457-66.
102. Ricote, M., J. Huang, J. Welch, and C. Glass, The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol*, 1999. 66(5): 733-739.
103. Adachi, M., R. Kurotani, K. Morimura, Y. Shah, M. Sanford, B.B. Madison, D.L. Gumucio, H.E. Marin, J.M. Peters, H.A. Young, and F.J. Gonzalez, Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut*, 2006. 55(8): 1104-13.
104. Jay, M.A. and J. Ren, Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev*, 2007. 3(1): 33-9.
105. Gervois, P., I.P. Torra, J.C. Fruchart, and B. Staels, Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med*, 2000. 38(1): 3-11.
106. LeBrasseur, N.K., M. Kelly, T.S. Tsao, S.R. Farmer, A.K. Saha, N.B. Ruderman, and E. Tomas, Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. 291(1): E175-81.
107. Pajvani, U.B., M. Hawkins, T.P. Combs, M.W. Rajala, T. Doebber, J.P. Berger, J.A. Wagner, M. Wu, A. Knopps, A.H. Xiang, K.M. Utzschneider, S.E. Kahn, J.M. Olefsky, T.A. Buchanan, and P.E. Scherer, Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem*, 2004. 279(13): 12152-62.
108. Armoni, M., C. Harel, F. Bar-Yoseph, S. Milo, and E. Karnieli, Free fatty acids repress the GLUT4 gene expression in cardiac muscle via novel response elements. *J Biol Chem*, 2005. 280(41): 34786-95.
109. Hugot, J.P., PPAR and Crohn's disease: another piece of the puzzle? *Gastroenterology*, 2005. 128(2): 500-3.
110. Shah, Y.M., K. Morimura, and F.J. Gonzalez, Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-{gamma} in macrophage suppresses experimentally induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 292(2): G657-666.

111. Saubermann, L.J., A. Nakajima, K. Wada, S. Zhao, Y. Terauchi, T. Kadowaki, H. Aburatani, N. Matsushashi, R. Nagai, and R.S. Blumberg, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 2002. 8(5): 330-9.
112. Takagi, T., A. Yamamuro, K. Tamita, K. Yamabe, M. Katayama, S. Mizoguchi, M. Ibuki, T. Tani, K. Tanabe, K. Nagai, K. Shiratori, S. Morioka, and J. Yoshikawa, Pioglitazone reduces neointimal tissue proliferation after coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes mellitus: an intravascular ultrasound scanning study. *Am Heart J*, 2003. 146(2): E5.
113. Schaefer, K.L., S. Denevich, C. Ma, S.R. Cooley, A. Nakajima, K. Wada, J. Schlezinger, D. Sherr, and L.J. Saubermann, Intestinal antiinflammatory effects of thiazolidenedione peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands on T helper type 1 chemokine regulation include nontranscriptional control mechanisms. *Inflamm Bowel Dis*, 2005. 11(3): 244-52.
114. Bassaganya-Riera, J., K. Reynolds, S. Martino-Catt, Y. Cui, L. Hennighausen, F. Gonzalez, J. Rohrer, A.U. Benninghoff, and R. Hontecillas, Activation of PPAR [gamma] and [delta] by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2004. 127(3): 777-791.
115. Desreumaux, P., L. Dubuquoy, S. Nutten, M. Peuchmaur, W. Englaro, K. Schoonjans, B. Derijard, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, M.D. Leibowitz, J.F. Colombel, and J. Auwerx, Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med*, 2001. 193(7): 827-38.
116. Rocchi, S., F. Picard, J. Vamecq, L. Gelman, N. Potier, D. Zeyer, L. Dubuquoy, P. Bac, M.F. Champy, K.D. Plunket, L.M. Leesnitzer, S.G. Blanchard, P. Desreumaux, D. Moras, J.P. Renaud, and J. Auwerx, A unique PPARgamma ligand with potent insulin-sensitizing yet weak adipogenic activity. *Mol Cell*, 2001. 8(4): 737-47.
117. Nakajima, A., K. Wada, H. Miki, N. Kubota, N. Nakajima, Y. Terauchi, S. Ohnishi, L.J. Saubermann#, T. Kadowaki, and R.S. Blumberg, Endogenous PPAR[gamma] Mediates Anti-inflammatory Activity in Murine Ischemia-Reperfusion Injury. *Gastroenterology*, 2001. 120(2): 460-469.
118. Cuzzocrea, S., B. Pisano, L. Dugo, A. Ianaro, N.S. Patel, R. Di Paola, T. Genovese, P.K. Chatterjee, M. Di Rosa, A.P. Caputi, and C. Thiemermann, Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Br J Pharmacol*, 2003. 140(2): 366-76.
119. Sato, N., R.A. Kozar, L. Zou, J.M. Weatherall, B. Attuwaybi, S.D. Moore-Olufemi, N.W. Weisbrodt, and F.A. Moore, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma mediates protection against cyclooxygenase-2-induced gut

- dysfunction in a rodent model of mesenteric ischemia/reperfusion. *Shock*, 2005. 24(5): 462-9.
120. Sato, N., F.A. Moore, B.C. Kone, L. Zou, M.A. Smith, M.A. Childs, S. Moore-Olufemi, S.G. Schultz, and R.A. Kozar, Differential induction of PPAR-gamma by luminal glutamine and iNOS by luminal arginine in the rodent postischemic small bowel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. 290(4): G616-23.
 121. Hontecillas, R., M.J. Wannemuehler, D.R. Zimmerman, D.L. Hutto, J.H. Wilson, D.U. Ahn, and J. Bassaganya-Riera, Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. *J Nutr*, 2002. 132(7): 2019-27.
 122. Tanaka, T., H. Kohno, S. Yoshitani, S. Takashima, A. Okumura, A. Murakami, and M. Hosokawa, Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*, 2001. 61(6): 2424-8.
 123. Sanchez-Hidalgo, M., A.R. Martin, I. Villegas, and C. Alarcon De La Lastra, Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*, 2005. 69(12): 1733-44.
 124. Lytle, C., T.J. Tod, K.T. Vo, J.W. Lee, R.D. Atkinson, and D.S. Straus, The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand rosiglitazone delays the onset of inflammatory bowel disease in mice with interleukin 10 deficiency. *Inflamm Bowel Dis*, 2005. 11(3): 231-43.
 125. Katayama, K., K. Wada, A. Nakajima, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, S. Nakagawa, T. Kadowaki, R. Nagai, Y. Kamisaki, R.S. Blumberg, and T. Mayumi, A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology*, 2003. 124(5): 1315-24.
 126. Lewis, J.D., G.R. Lichtenstein, R.B. Stein, J.J. Deren, T.A. Judge, F. Fogt, E.E. Furth, E.J. Demissie, L.B. Hurd, C.G. Su, S.A. Keilbaugh, M.A. Lazar, and G.D. Wu, An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(12): 3323-8.
 127. Peyrin-Biroulet, L., J. Beisner, G. Wang, S. Nuding, S.T. Oommen, D. Kelly, E. Parmentier-Decrucq, R. Dessein, E. Merour, P. Chavatte, T. Grandjean, A. Bressenot, P. Desreumaux, J.F. Colombel, B. Desvergne, E.F. Stange, J. Wehkamp, and M. Chamaillard, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(19): 8772-7.
 128. Cadwell, K., J.Y. Liu, S.L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J.K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J.A. Carrero, S. Hunt, C.D. Stone, E.M. Brunt, R.J. Xavier, B.P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T.S. Stappenbeck, and H.W.t. Virgin, A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 2008. 456(7219): 259-63.

129. Zhou, J., W. Zhang, B. Liang, M.C. Casimiro, D. Whitaker-Menezes, M. Wang, M.P. Lisanti, S. Lanza-Jacoby, R.G. Pestell, and C. Wang, PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. 41(11): 2334-42.
130. Baur, M. and J. Danilovs, Reference tables of two and three-locus haplotype frequencies for HLA-A, B, C, DR, Bf and GLO. *UCLA Tissue Typing Laboratory*, 1980: 955-1210.
131. Kozaiwa, K., K. Sugawara, M.F. Smith, Jr., V. Carl, V. Yamschikov, B. Belyea, S.B. McEwen, C.A. Moskaluk, T.T. Pizarro, F. Cominelli, and M. McDuffie, Identification of a quantitative trait locus for ileitis in a spontaneous mouse model of Crohn's disease: SAMP1/YitFc. *Gastroenterology*, 2003. 125(2): 477-90.
132. Ouellette, A.J., Paneth cell alpha-defensin synthesis and function. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. 306: 1-25.
133. Gambaro, G., F. Anglani, and A. D'Angelo, Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet*, 2000. 355(9200): 308-11.
134. Cardon, L.R. and J.I. Bell, Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*, 2001. 2(2): 91-99.
135. Consortium, T.I.H., The International HapMap Project. 2003. 426(6968): 789-796.
136. Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C.R. Lane, E.P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemesh, L. Ziaugra, L. Friedland, A. Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G.Q. Daley, and E.S. Lander, Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 1999. 22(3): 231-8.
137. Halushka, M.K., J.B. Fan, K. Bentley, L. Hsie, N. Shen, A. Weder, R. Cooper, R. Lipshutz, and A. Chakravarti, Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet*, 1999. 22(3): 239-47.
138. Kruglyak, L. and D.A. Nickerson, Variation is the spice of life. *Nat Genet*, 2001. 27(3): 234-6.
139. Reich, D.E., S.B. Gabriel, and D. Altshuler, Quality and completeness of SNP databases. *Nat Genet*, 2003. 33(4): 457-8.
140. Chakravarti, A., To a future of genetic medicine. *Nature*, 2001. 409(6822): 822-823.
141. Shi, M.M., Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes. *Am J Pharmacogenomics*, 2002. 2(3): 197-205.

142. Bitinaite, J. and I. Schildkraut, Self-generated DNA termini relax the specificity of SgrAI restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(3): 1164-9.
143. Leung, E., J. Hong, A. Fraser, T. Merriman, and G. Krissansen, PPAR-gamma and Crohn's disease in New Zealand. *Gastroenterology*, 2006. 130(7): 2249-50; author reply 2250.
144. Colhoun, H.M., P.M. McKeigue, and G.D. Smith, Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *The Lancet*, 2003. 361(9360): 865-872.
145. Zondervan, K.T. and L.R. Cardon, The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet*, 2004. 5(2): 89-100.
146. Hirschhorn, J.N. and M.J. Daly, Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. 2005. 6(2): 95-108.
147. Altshuler, D., J.N. Hirschhorn, M. Klannemark, C.M. Lindgren, M.C. Vohl, J. Nemesh, C.R. Lane, S.F. Schaffner, S. Bolk, C. Brewer, T. Tuomi, D. Gaudet, T.J. Hudson, M. Daly, L. Groop, and E.S. Lander, The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2000. 26(1): 76-80.
148. Al-Shali, K.Z., A.A. House, A.J. Hanley, H.M. Khan, S.B. Harris, B. Zinman, M. Mamakeesick, A. Fenster, J.D. Spence, and R.A. Hegele, Genetic variation in PPARG encoding peroxisome proliferator-activated receptor gamma associated with carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2004. 35(9): 2036-40.
149. Ridker, P.M., N.R. Cook, S. Cheng, H.A. Erlich, K. Lindpaintner, J. Plutzky, and R.Y. Zee, Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(5): 859-63.
150. Meirhaeghe, A., L. Fajas, F. Gouilleux, D. Cottel, N. Helbecque, J. Auwerx, and P. Amouyel, A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(2): 289-94.
151. Wang, F., T. Tahara, T. Arisawa, M. Sakata, K. Takahama, M. Watanabe, I. Hirata, and H. Nakano, Polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is not associated to Japanese ulcerative colitis. *Hepatology*, 2008. 55(81): 73-5.
152. Atug, O., V. Tahan, F. Eren, A. Tiftikci, N. Imeryuz, H.O. Hamzaoglu, and N. Tozun, Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARGgamma) gene in inflammatory bowel disease. *J Gastrointest Liver Dis*, 2008. 17(4): 433-7.
153. Rioux, J.D., R.J. Xavier, K.D. Taylor, M.S. Silverberg, P. Goyette, A. Huett, T. Green, P. Kuballa, M.M. Barmada, L.W. Datta, Y.Y. Shugart, A.M. Griffiths, S.R. Targan, A.F. Ippoliti, E.J. Bernard, L. Mei, D.L. Nicolae, M. Regueiro, L.P. Schumm, A.H. Steinhart, J.I. Rotter, R.H. Duerr, J.H. Cho, M.J. Daly, and S.R.

- Brant, Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*, 2007. 39(5): 596-604.
154. Parkes, M., J.C. Barrett, N.J. Prescott, M. Tremelling, C.A. Anderson, S.A. Fisher, R.G. Roberts, E.R. Nimmo, F.R. Cummings, D. Soars, H. Drummond, C.W. Lees, S.A. Khawaja, R. Bagnall, D.A. Burke, C.E. Todhunter, T. Ahmad, C.M. Onnie, W. McArdle, D. Strachan, G. Bethel, C. Bryan, C.M. Lewis, P. Deloukas, A. Forbes, J. Sanderson, D.P. Jewell, J. Satsangi, J.C. Mansfield, L. Cardon, and C.G. Mathew, Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*, 2007. 39(7): 830-832.
155. Libioulle, C., E. Louis, S. Hansoul, C. Sandor, F. Farnir, D. Franchimont, S. Vermeire, O. Dewit, M. de Vos, A. Dixon, B. Demarche, I. Gut, S. Heath, M. Foglio, L. Liang, D. Laukens, M. Mni, D. Zelenika, A. Van Gossum, P. Rutgeerts, J. Belaiche, M. Lathrop, and M. Georges, Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet*, 2007. 3(4): e58.
156. Franke, A., J. Hampe, P. Rosenstiel, C. Becker, F. Wagner, R. Hasler, R.D. Little, K. Huse, A. Ruether, T. Balschun, M. Wittig, A. Elsharawy, G. Mayr, M. Albrecht, N.J. Prescott, C.M. Onnie, H. Fournier, T. Keith, U. Radelof, M. Platzer, C.G. Mathew, M. Stoll, M. Krawczak, P. Nurnberg, and S. Schreiber, Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS ONE*, 2007. 2(1): e691.
157. Paavola, P., T. Helio, M. Kiuru, L. Halme, U. Turunen, J. Terwilliger, A.L. Karvonen, R. Julkunen, S. Niemela, H. Nurmi, M. Farkkila, and K. Kontula, Genetic analysis in Finnish families with inflammatory bowel disease supports linkage to chromosome 3p21. *Eur J Hum Genet*, 2001. 9(5): 328-34.
158. Dawn Teare, M. and J.H. Barrett, Genetic linkage studies. *Lancet*, 2005. 366(9490): 1036-44.
159. Marx, N., F. Mach, A. Sauty, J.H. Leung, M.N. Sarafi, R.M. Ransohoff, P. Libby, J. Plutzky, and A.D. Luster, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol*, 2000. 164(12): 6503-8.
160. Harris, S.G. and R.P. Phipps, The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol*, 2001. 31(4): 1098-105.
161. Jackson, S.M., F. Parhami, X.P. Xi, J.A. Berliner, W.A. Hsueh, R.E. Law, and L.L. Demer, Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(9): 2094-104.

-
162. Szatmari, I., D. Torocsik, M. Agostini, T. Nagy, M. Gurnell, E. Barta, K. Chatterjee, and L. Nagy, PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood*, 2007. 110(9): 3271-80.
 163. Martin, H., Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat Res*, 2009. 669(1-2): 1-7.
 164. Takenaka, S., E. Safroneeva, Z. Xing, and J. Gauldie, Dendritic cells derived from murine colonic mucosa have unique functional and phenotypic characteristics. *J Immunol*, 2007. 178(12): 7984-93.
 165. Niess, J.H. and H.C. Reinecker, Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005. 21(6): 687-91.
 166. Niess, J.H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B.A. McCormick, J.M. Vyas, M. Boes, H.L. Ploegh, J.G. Fox, D.R. Littman, and H.C. Reinecker, CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*, 2005. 307(5707): 254-8.

10. Danksagung

Herzlichen Dank an

Herrn PD Dr. Med. Stephan Brand
für die Überlassung des Themas und konsequente, verlässliche und hilfsbereite
Unterstützung.

Herrn Dr. med. Dipl.-Biol. Jürgen Glas
für die gute Zusammenarbeit und freundliche, kompetente und hilfsbereite
Betreuung.

Meine Familie und meine Freundin für die Unterstützung, Freundschaft und Liebe.