

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II -Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Die Rolle von *DMBT1*-Polymorphismen auf die Suszeptibilität und
den Phänotyp von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

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

vorgelegt von
Emmanuelle Le Bras

aus
Bruges
(Frankreich)

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stephan Brand
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Sibylle Koletzko Priv. Doz. Dr. Tim M. Strom
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Dipl.-Biol. Jürgen Glas
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	10.10.2013

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. J. Diegelmann, E. Le Bras, B. Göke, D. Czamara, J. Glas, S. Brand. 2011. Identification of Novel DMBT1 Gene Variants as Susceptibility Variants for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, Vol. 140, Issue 5. ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(11)61089-5. Elsevier Science. Digestive Disease Week (DDW), Mai 2011 in Chicago.
2. J. Diegelmann, D. Czamara, E. Le Bras, E. Zimmermann, T. Olszak, B. Göke, A. Franke, J. Glas, S. Brand. 2012. Identification of DMBT1 single nucleotide polymorphisms and their haplotypes as novel susceptibility variants for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*. Vol. 6, Supplement 1. 7. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) –Kongress, Februar 2012 in Barcelona.
3. J. Diegelmann, E. Le Bras, A Franke, J Glas, S Brand. 2012. Identification of DMBT1 single nucleotide polymorphisms and their haplotypes as novel susceptibility variants for Crohn's disease and ulcerative colitis influencing DMBT1 expression via the transcription factors CREB1 and ATF-2. *Z Gastroenterol*; 50 - K180. DOI: 10.1055/s-0032-1324115. Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) -Kongress, September 2012 in Hamburg.
4. J. Diegelmann, D. Czamara, E. Le Bras, E. Zimmermann, T. Olszak, A. Bedynek, B. Göke, A. Franke, J. Glas, S. Brand 2013. Intestinal DMBT1 Expression is Modulated by Crohn's Disease-associated IL23R Variants and by a DMBT1 Variant which Influences Binding of the Transcription Factors CREB1 and ATF-2. In Press at Plos One September 2013.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter-(10 ⁻⁶)
∞	unendlich
APC	Antigen-präsentierende Zelle
<i>ATG16L1</i>	Autophagy related 16-like 1
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. ulcerosa</i>	Colitis ulcerosa
<i>CARD</i>	Caspase Activation Recruiting Domain
CCR6	Chemokine (C-C motif) Receptor 6
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
<i>DMBT1</i>	Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (Gen)
DMBT1	Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (Protein)
DMBT1 ^{GP-340}	Glykoprotein 340/ <i>DMBT1</i> -Isoform
DMBT1 ^{SAG}	Salivary Agglutinin/ <i>DMBT1</i> -Isoform
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSS	Dextrane Sulfate Sodium
ERK	Extracellular Signal-Related Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
GIT	Gastrointestinaltrakt
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudien
HIV-I	humanes Immundefizienz-Virus I
HLA	humanes Leukozytenantigen
IAV	Influenza A Virus
IBD	Inflammatory Bowel Disease
ICOSLG	Inducible T-cell co-Stimulator Ligand
IL	Interleukin
IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor
<i>IRGM</i>	Immunity-related GTPase family M (Gen)
JAK	Janus-Kinase
KI	Konfidenzintervall
LC480	Light Cycler®480 (Roche Diagnostics)
LPS	Lipopolysaccharide

M. Crohn	Morbus Crohn
MAF	minor allele frequency
MDP	Muramyldipeptid
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase Kinase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
<i>NOD2</i>	Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 2 (Gen)
OR	Odds Ratio
PAMPs	Pathogen-associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKC	Protein-Kinase C
PMA	Phorbol-Ester-Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PRRs	Pattern-Recognition Receptors
<i>PTGER4</i>	Prostaglandin E Receptor 4 (Gen)
<i>PTPN2/22</i>	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 2/22 (Gen)
RT-PCR	Real-Time PCR
Sek	Sekunden
<i>SLC22A4/A5</i>	Solute Carrier Family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), Member 4/5, Gen
SNP	Single Nukleotid Polymorphism
SRCR	Scavenger Receptor Cystein-rich
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TFF	Trefoil Factor Family
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Receptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg-Zell	regulatorische T-Zelle
WTCCC	Wellcome Trust Case Control Consortium
z.B.	zum Beispiel

In der vorliegenden Arbeit werden englische Begriffe kursiv geschrieben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Allgemeines, Klassifikation und Epidemiologie</i>	1
1.1.1	Epidemiologische Daten.....	1
1.1.2	Das Krankheitsbild des Morbus Crohns.....	2
1.1.3	Das Krankheitsbild der Colitis ulcerosa.....	3
1.1.4	Diagnostik und Therapie der CED.....	5
1.2	<i>Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen</i>	8
1.2.1	Die Rolle von Umweltfaktoren und der bakteriellen Darmflora.....	9
1.2.2	Die gestörte Integrität der Schleimhautbarriere.....	10
1.2.3	Die gestörte mukosale Immunabwehr.....	11
1.2.4	Evidenz für die Rolle genetischer Faktoren aus der genetischen Epidemiologie.....	17
1.3	<i>Die Genetik chronisch entzündliche Darmerkrankung</i>	18
1.3.1	Ansätze zur Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen: Kopplungsanalysen, Assoziationsanalysen und Einzelnukleotid-Polymorphismen.....	18
1.3.2	Gene der angeborenen Pathogenerkennung.....	21
1.3.3	Gene der Autophagie: <i>ATG16L1</i> und <i>IRGM</i> Gene.....	22
1.3.4	Gene der adaptiven Abwehr und der Th17-Zelldifferenzierung.....	23
1.3.5	Gene zur Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere.....	26
1.4	<i>DMBT1 als Suszeptibilitätsgen für CED</i>	26
1.4.1	SAG, gp-340 und DMBT1: Isoproteine des <i>DMBT1</i> -Gens.....	26
1.4.2	Struktur und Organisation des <i>DMBT1</i> -Gens.....	27
1.4.3	Die Rolle von <i>DMBT1</i> in der angeborenen Immunabwehr.....	29
1.4.3.1	<i>DMBT1</i> kodiert einen <i>Pattern Recognition Receptor</i>	29
1.4.3.2	Interaktion von <i>DMBT1</i> mit endogenen Proteinen.....	30
1.4.4	Rolle von <i>DMBT1</i> bei Regenerierungs-, Differenzierungs- und Tumorsuppressionsprozessen.....	30
1.4.5	Rolle des <i>DMBT1</i> -Gens bei der CED-Pathogenese.....	31
1.4.5.1	Einfluß von <i>DMBT1</i> auf die Schleimhaut-Homöostase.....	31
1.4.5.2	Assoziation eines <i>Copy Number Polymorphismus</i> mit M. Crohn.....	32
2	Zielsetzung der Arbeit	34
3	Material	36
3.1	<i>Studienpopulation</i>	36
3.2	<i>Material für molekularbiologische Experimente</i>	37
3.2.1	Material für die PCR.....	37
3.2.1.1	PCR-Material, PCR-Kits, Sequenzierungs-Kits.....	37
3.2.1.2	Verwendete Primer für die Durchführung der Sequenzierung.....	37
3.2.2	Material für die RT-PCR.....	38
3.2.2.1	RT-PCR-Material und RT-PCR-Kits.....	38
3.2.2.2	Verwendete Primer und FRET-Sonden für die RT-PCR.....	38
3.2.3	Material für die Gelelektrophorese.....	39
3.3	<i>Verbrauchsmaterial und Geräte</i>	39
3.4	<i>Verwendete Computer-Programme</i>	40

4	41	41
4.1	41	41
4.2	41	41
4.3	41	41
4.3.1	41	41
4.3.2	43	43
4.3.3	45	45
4.3.4	47	47
4.4	47	47
4.5	47	47
4.6	48	48
4.6.1	48	48
4.6.2	48	48
4.6.3	50	50
4.6.4	50	50
4.7	50	50
4.8	51	51
4.9	51	51
5	52	52
5.1	52	52
5.2	53	53
5.2.1	54	54
5.2.2	55	55
5.2.3	55	55
5.2.4	55	55
5.2.5	56	56
5.2.6	56	56
5.2.7	56	56
5.2.8	57	57
5.3	59	59
5.3.1	60	60
5.3.2	66	66
5.4	72	72
5.4.1	72	72
5.4.2	76	76
5.5	77	77
5.5.1	78	78
5.5.2	78	78
5.5.3	79	79
5.6	80	80

6	Diskussion	82
6.1	<i>Kritische Evaluation des Studiendesigns und der Genotypisierungsmethode</i>	82
6.2	<i>Evaluation der Genotypisierung</i>	86
6.2.1	<i>DMBT1-Polymorphismen sind mit CED assoziiert</i>	86
6.2.2	<i>Haplotypen im DMBT1-Gen zeigen Assoziationen mit CED</i>	93
6.2.3	<i>Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zwischen DMBT1-Polymorphismen und CED..</i>	93
6.2.4	<i>Epistasie: Gen-Gen-Interaktionen von DMBT1 mit NOD2, IL23 und IL27</i>	94
6.3	<i>Hypothesen zur Rolle der DMBT1-Polymorphismen in der CED-Pathogenese</i>	95
6.3.1	<i>Mutationen im DMBT1-Gen beeinflussen die Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere</i>	95
6.3.2	<i>Mutationen im DMBT1-Gen beeinflussen die Restitution der geschädigten intestinalen Schleimhaut in CED</i>	102
6.3.3	<i>Schlussfolgerung und Ausblick: Die integrative Rolle des DMBT1-Gens für die Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere zwischen Pathogen-abwehr und Gewebergenerierung in CED</i>	108
7	Zusammenfassung	113
	<i>TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS</i>	115
	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	117

1 Einleitung

Unter dem Begriff „chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (CED) fasst man hauptsächlich die zwei Krankheitsbilder Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa (C. ulcerosa) zusammen, die durch eine chronische, schubweise verlaufende Entzündung der Darmwand charakterisiert sind. Beide Erkrankungen lassen sich anhand klinischer und ätiopathologischer Kriterien unterscheiden. Diagnosestellung und Therapie befolgen gemeinsame Prinzipien und werden in dieser Arbeit gemeinsam beschrieben.

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Allgemeines, Klassifikation und Epidemiologie

1.1.1 Epidemiologische Daten

Trotz weltweitem Vorkommen der CED findet sich ein ungleichmäßiges geographisches Verteilungsmuster mit globaler Nord-Süd-Diskrepanz. Die höchsten Inzidenzraten werden nach wie vor in Europa und in den USA beobachtet. Die niedrigsten Inzidenzraten zeigen sich in Asien und in Südamerika (1, 2). In Europa liegt die Inzidenz für M. Crohn zwischen 0,7 und 9,8 Fällen pro 100,000 Menschen pro Jahr. Für C. ulcerosa liegt sie zwischen 1,5 und 20,3 Fälle pro 100,000 Menschen pro Jahr. Die Prävalenz beträgt 8,3 bis 214 pro 100,000 für M. Crohn und 21,45 bis 243 pro 100,000 für die C. ulcerosa (2, 3).

Die Inzidenz innerhalb Europas zeigt ebenfalls einen Nord-Süd-Gefälle, mit einer Inzidenz von 24,5 pro 100,000 in Island gegenüber einer Inzidenz von 1,6 pro 100,000 in Portugal (4, 5). Gegenwärtig beobachten Epidemiologen eine steigende Inzidenz in den südlichen Region sowie das Erreichen einer Plateauphase in nördlichen Regionen (2, 5, 6). Interessanterweise verzeichnen Länder mit ursprünglich niedrigen Inzidenzraten wie Japan, Südkorea, Singapur, Nordindien und Lateinamerika momentan einen Anstieg der Inzidenz (2, 7). Dies wird auf sozioökonomische Faktoren zurückgeführt. Hier werden die Industrialisierung dieser Länder mit einer „Verwestlichung“ der Lebensstile als Grund genannt, wie auch ein wachsendes Gesundheitsbewusstsein und eine verbesserte medizinische Versorgung mit Verbesserung der Diagnostik (7).

Auch ethnische Unterschiede scheinen bei der Epidemiologie der CED eine wichtige Rolle zu spielen. Global betrachtet, nimmt die Prävalenz von nicht-jüdischen kaukasischen über afroamerikanische, lateinamerikanische und asiatische Bevölkerungsgruppen graduell ab.

Einige Forscher stehen diesen ethnischen Unterschiede skeptisch gegenüber und ziehen sozioökonomische Faktoren heran (2, 8). Epidemiologische Studien zur ethnischen Verteilung der CED zeigen interessanterweise, dass die Krankheitsprävalenz- und inzidenz

in bestimmten Migrationsgruppen über Generationen mit dem Herkunftsland vergleichbar bleibt. Während in anderen Migrationsgruppen beobachtet wird, dass sich die Krankheitsprävalenz- und Inzidenz der des Gastlandes anpassen (4, 9, 10). Außerdem wurden höhere Inzidenzraten in städtischen Bevölkerungen im Vergleich mit ländlichen Populationen sowie eine Dominanz der höheren sozioökonomischen Schichten gegenüber Bevölkerungskreisen mit einem niedrigeren Sozialstatus beobachtet (4). M. Crohn und C. ulcerosa beginnen meistens zwischen dem 15. und dem 30. Lebensjahr. Fraglich wird ein zweiter Altersgipfel bei den 60- bis 80-Jährigen beschrieben (2). Die Geschlechtsverteilung ist für C. ulcerosa ausgeglichen. Bei M. Crohn besteht eine geringfügige weibliche Dominanz (2).

Diese epidemiologischen Erkenntnisse weisen auf die Rolle genetischer und umweltbedingter Faktoren zur Entstehung CED hin.

1.1.2 Das Krankheitsbild des Morbus Crohns

M. Crohn kann den gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT) von der Mundhöhle bis zum After befallen. Hauptmanifestationsort des M. Crohns ist bei 80-90% aller Patienten der Dünndarm, insbesondere das terminale Ileum. Dabei weisen 15-25% ausschließlich einen Dickdarmbefall auf. Makroskopisch zeigt sich in der Darmwand eine segmentale, diskontinuierliche Entzündung mit aphtösen Läsionen. Mikroskopisch ist dabei in allen Darmwandschichten, von der Schleimhaut bis zur Serosa, ein transmurales Befallmuster erkennbar. Diese transmurale Entzündung ist für das typische Erscheinungsbild von M. Crohn mit Fistelbildung, Abszessbildung, Stenosierung und Fibrosierung der Darmwand verantwortlich. Zusätzlich werden häufig nicht verkäsende Granulome in extraintestinale Organen gefunden, selten jedoch in Schleimhautbiopsien (11, 12).

Insgesamt zeigt M. Crohn ein sehr heterogenes Krankheitsbild. Die typischen Symptome sind chronische oder rezidivierende, von Durchfall begleitete, kolikartige Schmerzen im rechten unteren Quadranten des Abdomens. Bei Befall des Rektums leiden die Patienten an perianalen Fisteln, Fissuren, Abszesse und analen Stenosen. Darüber hinaus besteht oft eine unspezifische Symptomatik mit Meteorismus, Abgeschlagenheit und moderater Temperaturerhöhung (11, 12). Als systematische Klassifikation wurde 1998 die Vienna-Klassifikation (13) erstellt, welche 2005 revidiert und durch die Montreal-Klassifikation ersetzt wurde. Diese ermöglicht eine Einteilung nach Krankheitsverhalt, Lokalisation der Entzündung und Alter bei Krankheitsbeginn (14). Der Krankheitsphänotyp wird durch die Kombination dieser drei Charakteristika bestimmt. Man unterscheidet je nach Krankheitsverhalt drei Subgruppen: erstens das entzündliche, nicht stenosierende, nicht penetrierende Krankheitsbild, zweitens das fibrostenotisch-obstruierende Krankheitsbild und drittens das

penetrierende-fistulierende Krankheitsbild. Eine solche Einteilung ist von klinischer Relevanz, da sich damit Therapie und Prognose für den Patienten individuell gestalten lassen. Kriterien der M. Crohn-Klassifikation sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Kriterien	Wien-Klassifikation	Montreal-Klassifikation
Alter bei Krankheitsbeginn	A1: unter 40 Jahre A2: über 40 Jahre	A1: unter 16 Jahre A2: zwischen 17 und 40 Jahre A3: über 40 Jahre
Lokalisation der Erkrankung	L1: Ileum L2: Dickdarm L3: Ileum u. Dickdarm L4: oberer GIT	L1: Ileum L2: Dickdarm L3: Ileum u. Dickdarm L4: isoliert oberer GIT*
Krankheitsverhalten	B1: nicht stenosierend, nicht penetrierend B2: stenosierend B3: penetrierend-fistulierend	B1: nicht stenosierend, nicht penetrierend B2: stenosierend B3: penetrierend-fistulierend P: perianal **

Tabelle 1: Die Wien- und Montreal-Klassifikation für M. Crohn. Mod. nach Silverberg 2005 (14).

Anm.: *: L4 wird zu L1 bis L3 zusätzlich addiert wenn ein Befall des oberen GIT begleitend besteht

** : p wird zu B1 bis B3 zusätzlich addiert, wenn gleichzeitig ein perianaler Befall begleitend besteht

Langjährige Erkrankungsverläufe werden von zahlreichen Spätkomplikationen geprägt. Fistel- und Abszessbildung, rezidierende Darmobstruktionen, hämorrhagische Blutungen und Darmwandperforation mit daraus resultierender Peritonitis gehören zu den häufigsten schwerwiegenden Folgen (12). Weitere Komplikationen können Folgen der Malabsorption und der Malresorption sein wie Osteoporose und Elektrolytstörungen (15). Aus verschiedenen Studien geht hervor, dass das Risiko, an Dick- oder Dünndarmkarzinomen zu erkranken, mit der Dauer, der Ausdehnung und der Aktivität der Erkrankung steigt (16-18). Eine schwedische populationsbasierte Studie zeigte z.B. ein insgesamt 2,5-fach erhöhtes Risiko für M. Crohn-Patienten und ein 5,6-fach erhöhtes Risiko bei M. Crohn-Patienten mit isoliertem Befall des Dickdarms (16). Trotz des Mangels an kontrollierten Studien, zur Effektivität von Maßnahmen zur Mortalitätssenkung, empfehlen Experten regelmäßige endoskopische Kontrollen im symptomfreien Intervall zur Früherkennung von Neoplasien (19-21).

1.1.3 Das Krankheitsbild der Colitis ulcerosa

Die C. ulcerosa ist eine Entzündung der Dickdarmschleimhaut die sich zumeist vom Rektum beginnend nach proximal bis max. 1-2 cm in das terminalen Ileum als sogenannte *backwash ileitis* ausbreiten kann (22). Während sich bei 40-50% der Patienten die C. ulcerosa auf das Rektum und das Rektosigmoid beschränkt, haben 30-40% eine Ausdehnung auf andere Teile des Kolons und 20% eine totale Kolitis (12). In milden Entzündungsverläufen erscheint

die Schleimhaut erythematös und fein-granuliert, in schwereren Fällen entstehen hämorrhagische, ödematöse Ulzerationen. In fortgeschrittene Stadien wird die Schleimhaut atrophisch und der Dickdarm verengt und verkürzt sich als Folge einer Fibrosierung. Im Gegensatz zum M. Crohn limitiert sich der Entzündungsprozess auf die Schleimhaut und die oberflächliche Submukosa und hat ein kontinuierliches Befallmuster (12). Es zeigt sich typischerweise eine gestörte Kryptenstruktur mit reduzierter Kryptenanzahl sowie eine neutrophile Entzündung, die zu charakteristischen Kryptenabszessen führen können (11). Die C. ulcerosa präsentiert sich charakteristischerweise mit chronischen oder rezidivierenden blutig-schleimigen Durchfällen, Tenesmen, rektalen Blutungen und krampfartigen Bauchschmerzen. In schweren Fällen kommen Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Fieber hinzu (12). Wie beim M. Crohn bietet die Montreal-Klassifikation eine systematische Einteilung des Krankheitsphänotyps, der durch die Korrelation des Schweregrades der Entzündung mit der Ausdehnung der Erkrankung charakterisiert ist (14). Die Tabelle 2 bietet einen Überblick über die Montreal-Klassifikation nach anatomischer Ausdehnung der Entzündung. Die Tabelle 3 stellt die Montreal-Klassifikation mit Einteilung nach klinischem Schweregrad der Erkrankung dar.

Ausdehnung der Entzündung		Anatomische Korrelate
E1	ulzerative Proktitis	Die Ausdehnung limitiert sich auf das Rektum
E2	linksseitige ulzerative Kolitis (distale Kolitis)	Die Ausdehnung limitiert sich auf einen Teil des Kolorektums distal der linken Kolonflexur
E3	extensive Kolitis (Pankolitis)	Die Ausdehnung breitet sich proximal der linken Kolonflexur aus

Tabelle 2: Die Montreal-Klassifikation für die C. ulcerosa nach Ausdehnung der Entzündung. Mod. nach Silverberg 2005 (14).

Die Einteilung nach Schweregrad berücksichtigt Kriterien wie Häufigkeit der Durchfälle, Zeichen einer systematischen Toxizität und das subjektive Empfinden des Patienten.

Schweregrad der Erkrankung		Beschreibung
S0	klinische Remission	asymptomatisch
S1	milde C. ulcerosa	vier oder weniger Stuhlgänge/Tag (mit oder ohne Blutbeimischung), keine systemischen Symptome, normale Entzündungsmarker
S2	moderate C. ulcerosa	mehr als vier Stuhlgänge/Tag mit minimalen Zeichen einer systemischen Toxizität
S3	schwergradige C. ulcerosa	mindestens sechs blutige Stuhlgänge/Tag, Herzfrequenz mind. 90/min, Temperatur mind. 37,5°C, Hämoglobin < 10,5/ml und BSG mind. 30mm/St.

Tabelle 3: Die Montreal-Klassifikation für die C. ulcerosa nach Schweregrad der Erkrankung. BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit Modifiziert nach Silverberg 2005 (14) .

Langzeitkomplikationen bestimmen auch bei dieser Krankheit die Prognose. Ein fulminanter Verlauf tritt bei 15% der Patienten auf und kann wegen massiver Hämorrhagien in einzelnen Fällen eine Kolektomie notwendig machen (11, 12). Weiter können sich ein toxisches Megakolon mit daraus resultierender Peritonitis und eine Obstruktionssymptomatik als Folge von Strikturen entwickeln. Wie beim M. Crohn besteht das Risiko eines Dickdarmkarzinoms, das bei gleichzeitig diagnostizierter primär sklerosierender Cholangitis (PSC) weiter ansteigt (17). Das Risiko eines Kolonkarzinoms hängt wie beim M. Crohn von der Ausdehnung, der Dauer und der Aktivität der Erkrankung ab (23, 24). Bei Patienten mit einer Pankolitis steigt das Malignomrisiko nach 8-10 Jahren jährlich um 0,5 bis 1%. Interessanterweise haben Patienten mit einer Proktitis oder Proktosigmoiditis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe kein erhöhtes Malignomrisiko (18, 25-29).

Eine Gemeinsamkeit beider Erkrankungen ist das zusätzliche Auftreten extraintestinaler Symptome bei einem Drittel aller Patienten, welche den gesamten Organismus befallen können (12, 30). Die Ausprägung von Symptomen, die dem Krankheitsbeginn vorausgehen oder sich erst Jahre später manifestieren können, korreliert nicht immer mit dem Ausmaß der Krankheitsaktivität (30). Häufige, nicht spezifische Hautmanifestationen sind das Erythema nodosum, das Pyoderma gangrenosum und die Psoriasis (30). Rheumatologische Symptome sind neben unspezifische Gelenksbeschwerden die asymptomatische Sakroileitis und die Spondyloarthritis. Augenerkrankungen sind häufig und treten als Konjunktivitis, Episkleritis oder als gefährliche Uveitis mit möglichem Sehverlust auf. Ebenso häufig sind Gallensteine als Folge der Gallensäure-Malabsorption. Das gleichzeitige Auftreten einer PSC ist für die C. ulcerosa spezifisch, korreliert aber nicht mit dem Verlauf, dem Beginn sowie dem Schweregrad der Kolitis (30) (31). Ferner können Nierensteine als Folge einer Hyperoxalurie auftreten, als Spätkomplikation gilt die Entwicklung einer Nieren-Amyloidose (32).

1.1.4 Diagnostik und Therapie der CED

Die Diagnostik der CED ist umfangreich und stützt sich sowohl auf die Anamnese und Klinik des Patienten, als auch auf Befunde der Endoskopie und des Labors. Letztere sind jedoch unspezifisch und geben ausschließlich das Vorhandensein eines Entzündungsprozesses wider. Die Koloskopie mit Entnahme multipler Biopsien gilt als Goldstandard bei der Diagnosestellung der CED und ermöglicht die makroskopische und histologische Beurteilung der Schleimhaut (12, 33). Meistens wird dabei eine Unterscheidung zwischen M. Crohn und C. ulcerosa möglich. Die Abbildung 1 zeigt typische endoskopische Charakteristika. Die histologischen Unterscheidungsmerkmale zwischen M. Crohn und C. ulcerosa werden in Abbildung 2 veranschaulicht. Neben der Endoskopie bestehen andere Möglichkeiten der

bildgebenden Verfahren wie die Sonographie, kernspintomographische (Hydro-MR) und computertomographische Untersuchungen und die Kapselendoskopie, die vor allem bei Befall des oberen GIT hilfreich sein kann (34). Biomarker im Stuhl, wie z.B. die Myeloperoxidase oder Calprotectin werden eine wichtige Rolle in der Diagnostik, wie auch in der Kontrolle des Therapieerfolges, zugeschrieben (35, 36). Zusätzlich kann eine Reihe von Antikörpern gegen bakterielle Bestandteile bei CED bestimmt werden. Aufgrund ihrer niedrigen Sensitivität zählt dies nicht zur Routinediagnostik, kann aber zur Abschätzung des Krankheitsverlaufes durchaus hilfreich sein. Perinukleäre antineutrophile cytoplasmatische Antikörper (pANCA) werden bei 60-70% der *C. ulcerosa*-Patienten gefunden. 60-70% der *M. Crohn*-Patienten und 10-15% der *C. ulcerosa*-Patienten sind positiv für den Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper (ASCA). Dieser ist bei *M. Crohn* Patienten mit frühzeitigen Komplikationen assoziiert (34, 37, 38). Weitere serologische Marker, wie das Anti-OmpC, Cbir1, der Flagellin-Antikörper und der 12-Antikörper, konnten identifiziert werden und in Zusammenhang mit bestimmten Krankheitsphänotypen gesetzt werden. (39-42). Innovative Technologien in der Diagnostik versprechen neben pharmakogenetischen Tests zur Vorhersage des therapeutischen Ansprechens die Nutzung der genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) für die Früherkennung und Prävention schwerer Krankheitsverläufe durch Genotyp-Phänotyp-Korrelationen (33).

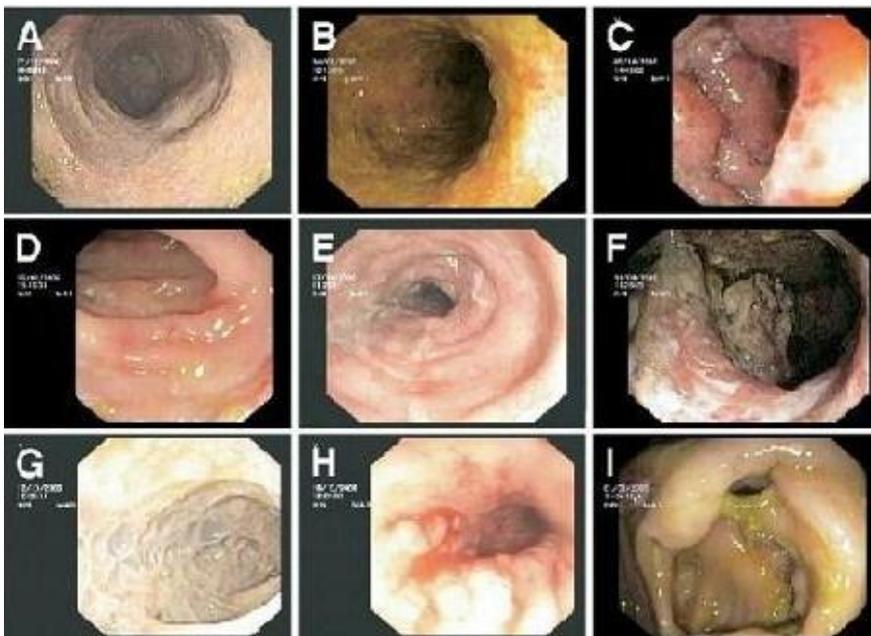


Abbildung 1: Typische endoskopische Charakteristika bei *M. Crohn* und *C. ulcerosa*. Mod. aus Nikolaus und Schreiber 2007 (33)

Anm. (A-C, G): *C. ulcerosa*. (A): Milde Entzündung mit reduzierter Haustrierung, fehlendes Durchscheinen der Gefäße. (B): Moderate Entzündung mit reduzierter Haustrierung. Die Schleimhaut ist ödematös, ulzeriert und mit Fibrin belegt. (C): Schwergradige Entzündung mit Einengung des Lumens durch Pseudopolypen. (G): Chronisches Stadium, keine Haustrierung, „Fahrradschlauchphänomen“. **(D-F, H-I): *M. Crohn*.** (D): Milde Entzündung mit einer isolierten kleinen aphthösen Läsion. (F): schwergradige Entzündung mit tiefen fissuralen Ulzerationen. (H): Chronischer Stadium: Strikturen und Stenosen. (I): Chronische Destruktion der Ileocäkalklappe.

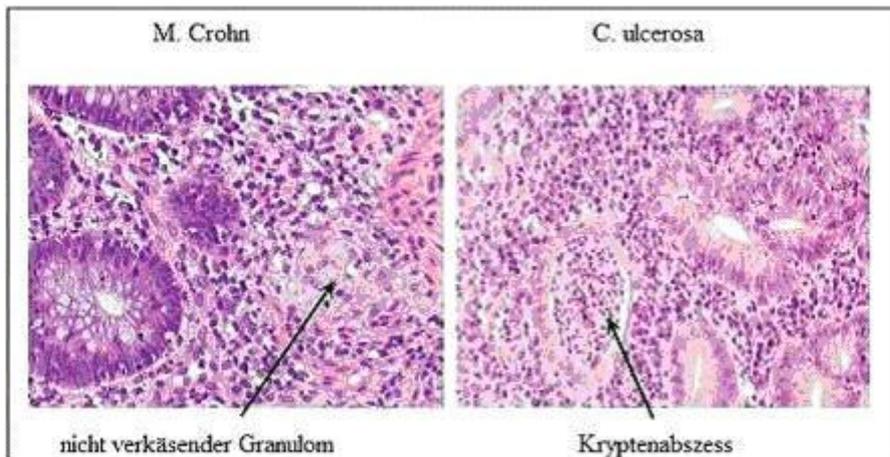


Abbildung 2: Histologische Charakteristika bei M. Crohn und C. ulcerosa. Mod. aus Xavier 2007 (43).

Die Therapie der CED ist multidimensional und multidisziplinär. Diese orientiert sich sowohl an Verlauf, Lokalisation und Aktivität der Erkrankung als auch an Patienten-spezifischen Faktoren wie Schmerztoleranz oder persönlichen Begleitumständen. Die Therapie des akuten Schubes beinhaltet den Einsatz topischer Glukokortikoide, Antibiotika und bei der C. ulcerosa auch v. a. Mesalazin. Bei schweren Schüben werden systemische Glukokortikoide, Immunsuppressiva und Biologicals wie *Tumor Necrosis Factor α* -Blocker (TNF- α -Blocker) verabreicht. Zur Erhaltung der Remission sind sowohl bei der C. ulcerosa als auch beim M. Crohn bei komplizierten oder chronisch aktiven Verläufen Purinanaloga wie Azathioprin geeignet. Beim M. Crohn und der C. ulcerosa werden bei Therapieversagen oder bei fistulierendem Verlauf Biologicals eingesetzt. Die nicht-medikamentöse Therapie der CED beinhaltet diätetische Maßnahmen, körperliche Bewegung und psychologische Betreuung. Obwohl chirurgische Maßnahmen bei M. Crohn grundsätzlich gemieden werden sollten, werden 70 bis 90% der Patienten mindestens einmal in ihrem Leben, meistens aufgrund eingetretene Komplikationen, operiert (44). Patienten mit C. ulcerosa unterziehen sich in 25-35% der Fälle mindestens einmal einem chirurgischen Eingriff. Die Kolektomie mit Einlage einer analen ileo-pouch-Anastomose ist bis heute die einzige Heilungsmöglichkeit. Sie beinhaltet jedoch Risiken einer Pouchitis oder eines Darmverschlusses.

1.2 Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Obwohl die genaue Pathogenese der CED nicht vollständig verstanden ist, wird angenommen, dass verschiedene Faktoren miteinander interferieren und somit zur Krankheitsentstehung beitragen. Die folgende Abbildung 3 fasst die aktuelle Vorstellung zur Pathogenese der CED zusammen.

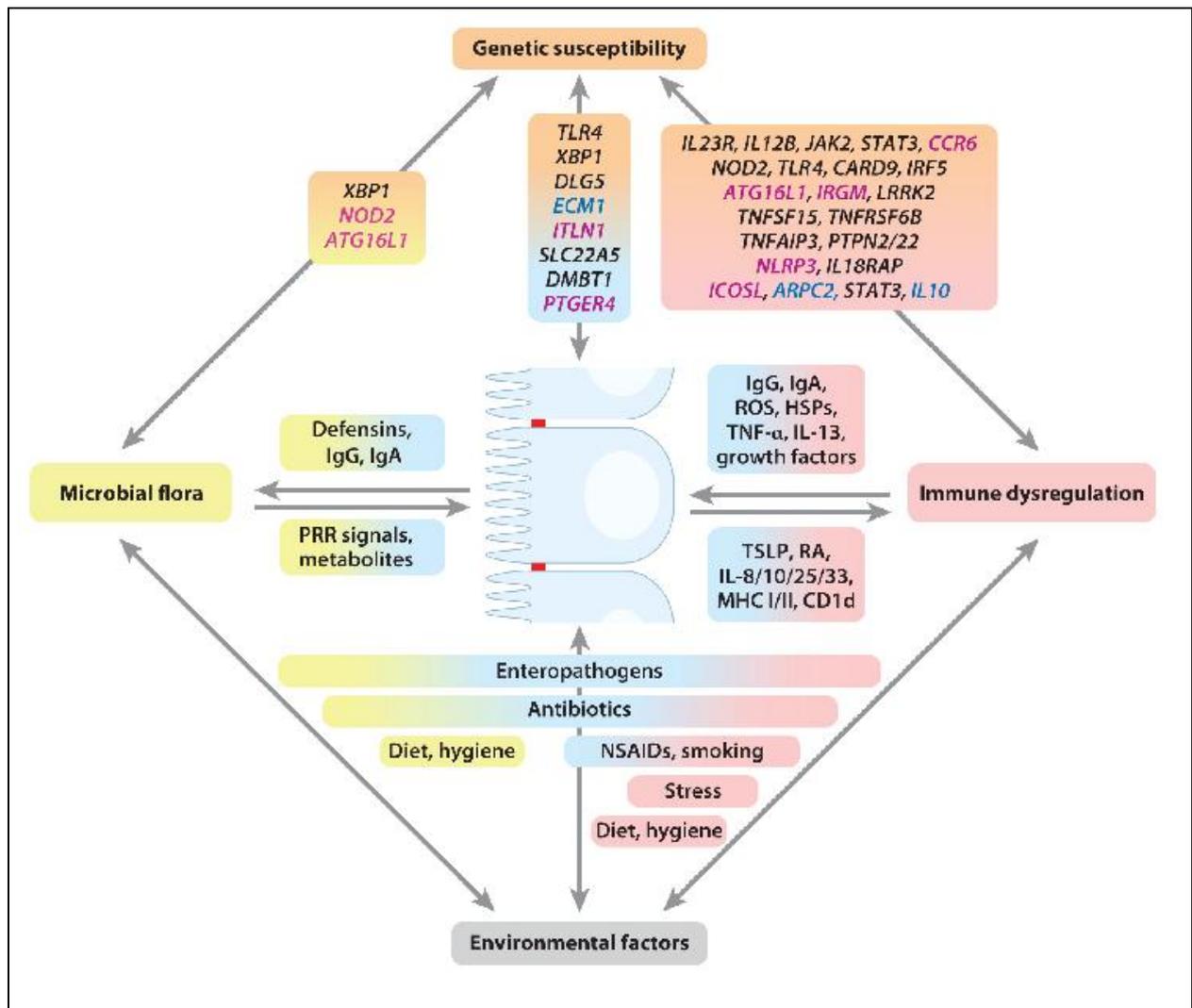


Abbildung 3: Die multifaktorielle Ätiopathogenese von CED. Mod nach Kaser (45)

Anm: Zur Entstehung von CED spielen verschiedene Faktoren eine Rolle, unter anderem Umweltfaktoren, die mikrobielle Darmflora, das mukosale Immunsystem und letztendlich genetische Faktoren. Gene, welche mit M. Crohn assoziiert wurden sind Magenta markiert, Gene, welche mit der C. ulcerosa assoziiert wurden sind Blau markiert, Gene, welche für beide Erkrankungen relevant sind, wurden Schwarz markiert.

Legende: HSPs, *heat shock proteins*; MHC, *major histocompatibility complex*; NSAIDs, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs* (auf deutsch NSRA, nicht-steroidale-Anti-Rheumatika); PRR, *pattern-recognition receptor*, RA, *retinoic acid*, ROS, *reactive oxygen species*; TSLP, *thymic stromal lymphopoietin*

1.2.1 Die Rolle von Umweltfaktoren und der bakteriellen Darmflora

Die steigende Inzidenz der CED innerhalb der letzten Jahrzehnte, das geographische Nord-Süd-Gefälle, sowie eine nicht 100%ige Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen sind Hinweise für die Bedeutung von Umweltfaktoren in der Ätiologie beider Erkrankungen. Bis jetzt konnte die Rolle zweier Faktoren durch mehrere Replikationsstudien gesichert werden: Erstens wurde das Rauchen von Zigaretten mit einer protektiven Rolle für die *C. ulcerosa* und einem krankheitsfördernden Effekt für *M. Crohn* assoziiert. Zweitens wurde die frühe Durchführung einer Appendektomie ebenfalls mit einer protektiven Rolle für die *C. ulcerosa* und einem krankheitsfördernden Effekt für *M. Crohn* assoziiert (46-49). Es gibt eine Reihe von Hypothesen zu Umweltfaktoren, die zum Teil mit nicht reproduzierbaren oder widersprüchlichen Ergebnissen publiziert wurden. Dazu gehören unter anderem die Hygienehypothese (50), die Rolle von Nahrungsbestandteilen- oder Zusätzen und die Anwendung nicht-steroidaler-Anti-Rheumatika als potentieller Störfaktor der intestinalen Schleimhautbarriere (49, 51). Obwohl bei Mäusen eine entzündliche Kolitis durch Stress induziert werden kann, und auch beim Menschen eine stress-induzierte Erhöhung der Schleimhautpermeabilität gezeigt worden sind, bleibt die Rolle psychologischer Faktoren umstritten (52, 53).

Einer der am intensivsten erforschten Umweltfaktoren stellt die Darmflora dar. In experimentellen Tiermodellen wurde gezeigt, dass Mäuse nach absolut keimfreier Züchtung keine Kolitis entwickeln. Erst die Inokulation mit Bakterien der Darmflora führt zur Auslösung einer spontanen Kolitis. In *IL10*-defizienten Mäusen kann eine Kolitis durch Kontamination mit Bakterien der Darmflora wie *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* und *Bacteroides vulgatus* ausgelöst werden (54). Außerdem sprechen, neben der Wirksamkeit von Antibiotika beim *M. Crohn* (55-58), die Milderung der Entzündung in den aboralen Darmabschnitten nach Umleitung des Faeces durch einer Stomaanlage (59) und das Vorkommen bakterieller Antigene im Blut von CED-Patienten für eine Rolle von Bakterien in der Krankheitspathogenese (40, 41). Jedoch ist unklar, ob die anhaltende Entzündung gegen die Darmflora als Folge eines Verlustes der oralen Toleranz, oder als Konsequenz einer physiologischen Immunantwort gegen eine anhaltende Infektion mit Pathogenen oder virulent veränderten Kommensalen zu deuten ist. Vier verschiedene pathogenetische Erklärungsmechanismen, die sich teils ergänzen, teils widersprechen, können diese Zusammenhänge ansatzweise vermitteln. Erstens ist es nicht auszuschließen, dass CED durch einen spezifischen Erreger verursacht werden. Über die Jahre wurden mehrere Keime verdächtigt, unter anderem *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis*, *E. coli*, *Yersinien*, *Campylobacter* oder das Masernvirus (60). Für Kontroversen hat vor allem das *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) als Ursache des *M. Crohn*s gesorgt, dessen kausale Rolle bis heute nicht geklärt worden ist (61-66). Kürzlich haben Barnich et al. die

selektive Kolonisation des Ileums bei M. Crohn-Patienten mit adhärennten *E. coli*-Stämmen (AIEC) beschrieben, die in Makrophagen persistieren und dort die Produktion von TNF- α und eine T-Zell-Aktivierung stimulieren (67, 68). Neben spezifischen Erregern wird auch untersucht, ob der Gewinn von Virulenzfaktoren der physiologischen Darmflora ursächlich sein könnte (69-71). Zweitens wurden funktionelle Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora von M. Crohn-Patienten im Vergleich zu Kontrollindividuen festgestellt. Daraus resultiert eine Abnahme der mikrobiellen Vielfalt, welche zum Ungleichgewicht zwischen schützenden und schädigenden Bakterien führt (72-77). Drittens könnten Bakterien der Darmflora aufgrund einer erhöhten Schleimhautpermeabilität zu einer pathologischen Überaktivierung des Immunsystems führen (78). Ein ungehemmtes Bakterienwachstum und die Persistenz intrazellulärer Bakterienbestandteile können Folge einer angeborenen Abwehrschwäche sein (79, 80). Viertens kann es in Folge eines Verlustes der physiologischen Hyporeaktivität gegen die Darmflora zur anhaltenden und fehlerhaften Aktivierung des Immunsystems kommen (80-82). Insgesamt ist anzunehmen, dass Bakterien erst bei Immundefekten des Wirtes eine Rolle bei der CED-Entstehung zuzuschreiben ist (43, 56, 78, 80, 83, 84).

1.2.2 Die gestörte Integrität der Schleimhautbarriere

Die Aufrechterhaltung der Schleimhautintegrität als besondere Grenzfläche zwischen dem Wirt und der Außenwelt gehört neben der Resorption von Flüssigkeiten und Nahrungsbestandteilen und der Sekretion von Verdauungsenzymen zu den bemerkenswertesten Aufgaben der intestinalen Schleimhaut. Dafür muss das intestinale Epithel wie eine selektive Schranke funktionieren, um den Übertritt wichtiger Makromoleküle zu ermöglichen und das Eindringen von Antigenen zu limitieren. Das Epithel dient als Mediator zwischen dem antigenreichen Lumen und dem darunter liegenden intestinalen Immunsystem, das in der Lage sein muss, harmlosen von aggressiven Bakterien zu unterscheiden (85). Die Aufrechterhaltung der selektiven Permeabilität wird durch hochkomplexe Strukturen gewährleistet, wie die *zona occludens* und die *tight junctions*, die durch Botenstoffe, wie Zytokine, TNF- α und Interferon- γ , dynamisch reguliert werden. Die physiologische Hyporeaktivität des intestinalen Immunsystems gegenüber Nahrungsbestandteilen und apathogenen Antigenen hängt von der relativen Undurchdringbarkeit und der funktionellen Integrität der Schleimhautbarriere, von der Sekretion antimikrobieller Peptide, von der effektiven Beseitigung eingedrungener Antigene und von Schleimhaut-Reparatursystemen ab (12, 43, 49, 86). Diese Hyporeaktivität ist als aktive Hemmung der Immunantwort durch die Wirkung antiinflammatorischer Peptide wie IL-10 oder TNF- β und nicht als passive Toleranz zu verstehen (12). Defekte in einem dieser

komplexen Prozesse führen zu einer erhöhten Antigenexposition im Lumen, zu einer pathologischen T-Zell-Antwort und zur einer fehlerhaften Bakterienelimination, woraus eine chronische Entzündung des Darms resultieren kann (49, 87). Tatsächlich können Störungen dieses empfindlichen Gleichgewichts bei CED-Patienten beobachtet werden. Erstens kann bei M. Crohn-Patienten eine deutlich gesteigerte Schleimhautpermeabilität gemessen werden (88-91). Zweitens konnte bereits gezeigt werden, dass *NOD2*-Mutationsträger (ein Bakterienerkennungs-Molekül der angeborenen Abwehr, welches mit M. Crohn assoziiert wurde, siehe 1.3.2) eine reduzierte Produktion des endogenen antibakteriellen Faktors α -Defensin durch Paneth-Zellen aufweisen (92, 93). Außerdem konnte bei CED-Patienten eine gestörte Expression des MUC2-Proteins in intestinalen Becherzellen festgestellt werden. MUC2 ist ein Hauptbestandteil der intestinalen Schleimschicht, der schützende Funktionen zugeschrieben werden (43). Ferner deutet die Herabregulierung wichtiger Zelladhäsions-Komplexe in Schleimhautbiopsien von CED-Patienten auf Defekte in der Schleimhautbarriere hin (89-91, 94). Obwohl nicht eindeutig differenziert werden kann, ob diese Störung der Schleimhautintegrität Konsequenz oder Ursache der chronischen Darmentzündung ist, mündet sie in einer anhaltenden und sich selbst unterhaltenden Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen Bakterien der Darmflora.

1.2.3 Die gestörte mukosale Immunabwehr

Strukturell und funktionell lässt sich das Immunsystem in einen afferenten Schenkel der Antigenerkennung, Prozessierung und Präsentation und in einen efferenten Schenkel der Immunantwort einteilen. Die angeborene Immunabwehr erkennt unspezifische gemeinsame molekulare Strukturen der meisten Pathogene, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster („*pathogen-associated molecular pattern*“, PAMPS), die durch mustererkennende Rezeptoren erkannt werden („*pattern recognition receptors*“, PRRs). Wichtigste Vertreter der PAMPS sind Muralmyldipeptide (MDP), Peptidoglykan-Motive in der Zellwand Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien, Lipopolysaccharide (LPS), Zucker-Bestandteile in der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien und Lipoteichonsäuren (95). Die adaptive Immunabwehr besteht aus einer humoralen und zellulären antigenspezifischen Antwort, die entweder durch einen direkten Kontakt mit dem Antigen oder nach Bindung an Antigen-präsentierende-Zellen („*antigen presenting cells*“, APCs) aktiviert wird. Haupteffektoren der adaptiven Immunabwehr sind B- und T-Lymphozyten. T-Lymphozyten lassen sich anhand ihrer Oberflächenmolekülen in CD4+-Zellen (T-Helfer-Zellen), CD8+-Zellen (T-Killer-Zellen), regulatorische T-Zellen (Treg) und T-Gedächtniszellen unterscheiden. Ende der 80er Jahren konnten Mosmann et al. zwei Unterformen der CD4+-Zellen unterscheiden, die Th1- und Th2-Zellen, welche durch unterschiedliche Zytokinen gefördert werden und unterschiedliche

Funktionen in der Immunantwort besitzen (96). Vereinfacht betrachtet, wurde bis vor kurzem eine Th1-dominierte Antwort bei M. Crohn angenommen, welche durch die Produktion von Interferon- γ und IL-2 charakterisiert wurde. Th1-Zytokine stimulieren Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, und TNF- α , die wiederum die Th1-Antwort verstärken (97). Zusätzlich kommt es durch die Produktion unspezifischer Entzündungsmediatoren, wie von Chemokinen, Prostaglandinen und Leukotrienen zur Gewebszerstörung und zur Rekrutierung weiterer Leukozyten aus dem Intravasalraum, was zur Unterhaltung der Entzündung beiträgt. Die Wirkungen einer erhöhten Th1-Zell-Aktivierung werden durch eine gleichzeitige Reduktion von T-Suppressorzellen und regulatorische T-Zellen, welche die antiinflammatorische Zytokine IL-10 und TGF- β produzieren, verstärkt. Bei der C. ulcerosa wurde vorwiegend von einer Th2-geführten Immunantwort ausgegangen (98, 99). Diese atypische Th2-Zell-Antwort zeichnet sich durch die Produktion von *transforming growth factor* β (TGF- β), IL-13 und IL-5, aber nicht IL-4 aus (86, 100). Während Th1-Zellen in die Abwehr intrazellulärer Pathogene involviert sind, haben Th2-Zellen ihre Hauptrolle bei allergischen Erkrankungen sowie bei der Abwehr extrazellulärer Keime (101). Neueste Studien haben durch die Beschreibung regulatorischer, antiinflammatorischer T-Zellen (Treg) und einer neuen T-Zell-Population, den proinflammatorischen Th17-Zellen, dieses Th1/Th2-Konzept hinterfragt (101). Die Differenzierung der verschiedenen T-Zellen, ausgehend von einer naiven CD4⁺-T-Zelle, wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen gesteuert (101). Dabei spielen die Zytokine der IL-12-Familie eine herausragende Rolle. Die IL-12-Familie, bestehend aus IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35, sind durch strukturelle Gemeinsamkeiten charakterisiert, weisen allerdings unterschiedliche Funktionen in der adaptiven Immunantwort auf (102-104). Die Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die IL-12-Familie mit ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften.

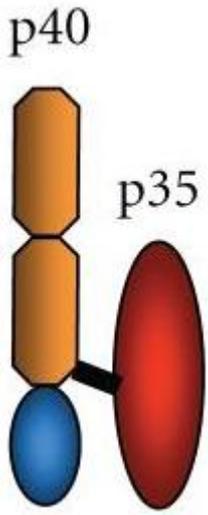
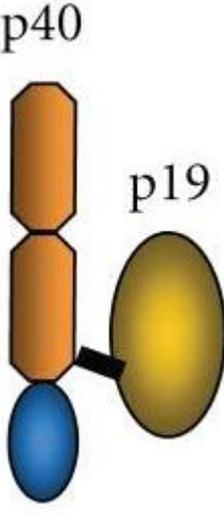
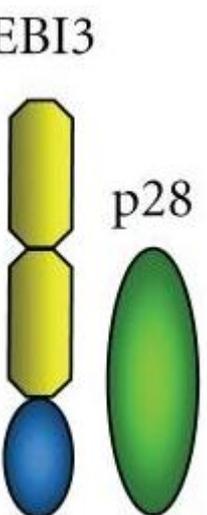
Interleukine	IL-12	IL-23	IL-27
Schematische Struktur			
Untereinheiten	p40/p35	p40/p19	EBI3/p28
Rezeptoruntereinheiten	IL-12Rβ1/ IL-12Rβ2	IL-12Rβ1/ IL-23R	gp130/WSX-1 (TCCR)
aktivierte STATs	STAT4	STAT3	STAT1, STAT3
Produzierende Zellen	APCs Makrophagen	APCs Makrophagen	APCs Makrophagen
Funktion	IFN-γ Produktion Th1- Differenzierung	Proliferation CD4+ Gedächtniszellen, Expansion und Aufrechterhaltung der Th17-Zellen, IL-17 und IL-22-Produktion	Proliferation naiver CD4+, frühe Th-1- Differenzierung, Suppression der Th-2 und Th-17-Zell- Differenzierung, Produktion proinflammatorischer Zytokinen

Tabelle 4: Die IL-12-Zytokin-Familie: Struktur und Eigenschaften, mod. aus Wei 2011 und Xu 2010 (103, 104)

Anm: aus Platzgründen wurde der IL-12-Familie zugehörige IL-35 nicht abgebildet.

STATs, *Signal Transducers and Activators of Transcription*, sind Transkriptionsfaktoren, welche die Th-Zell-Signalwege vermitteln.

Ein Überblick über die Signaltransduktionswege der Th-Zell-Differenzierung ist Abbildung 4 zu entnehmen. Die neu entdeckten Th17-Zellen werden durch den Transkriptionfaktor *Retinoid-Related Orphan Receptor-γt* (RORγt), die Oberflächenrezeptoren für IL-23 (IL-23R), CCR6 und die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26 und CCL20 charakterisiert. Th17-Zellen differenzieren unter dem Einfluss von IL-1β, IL-6, IL-21 und IL-23 (101). Es ist anzunehmen, dass entzündliche Aktivitäten, die dem Th1-Zell aktivierenden Zytokin IL-12 zugeschrieben wurden, eigentlich durch das Th17-Zell-aktivierende Zytokin IL-23 vermittelt werden, da beide Zytokine die gemeinsame Untereinheit IL-12/IL-23p40 besitzen. Mehrere Arbeitsgruppen haben eine vermehrte Anzahl Th1- und Th17-Zellen und eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen bei CED-Patienten beschrieben (105-107). Wichtiges Element in der Differenzierungskette der naiven CD4+

Zellen ist IL-27, ebenfalls Mitglied der IL-12-Familie. Das heterodimere IL-27. besteht aus der IL-12p40-ähnlichen Untereinheit, dem Epstein-Barr-Virus-induziertem-Gen 3 (EBI3) und der IL-12p35-ähnlichen Untereinheit p28. IL-27 induziert die Proliferation naiver CD4⁺-Zellen durch die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, unter anderem STAT1, STAT2, STAT3, JAK1 und JAK2. Weiterhin induziert IL-27 die Th1-Differenzierung über den Transkriptionsfaktor T-bet und unterstützt die IL-12-abhängige IFN- γ -Produktion (IFN- γ) (108). Zusätzlich konnte IL-27 durch eine Hemmung des Th17-Transkriptionsfaktor ROR γ t und eine Förderung der IL-10-produzierenden Treg-Zellen Tr1 antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden (109, 110). Die bis jetzt verfügbaren Studien über die Rolle von IL-27 in der Pathogenese CED sind widersprüchlich, da sowohl eine protektive als auch proinflammatorische Wirkung gezeigt wurde (111-115).

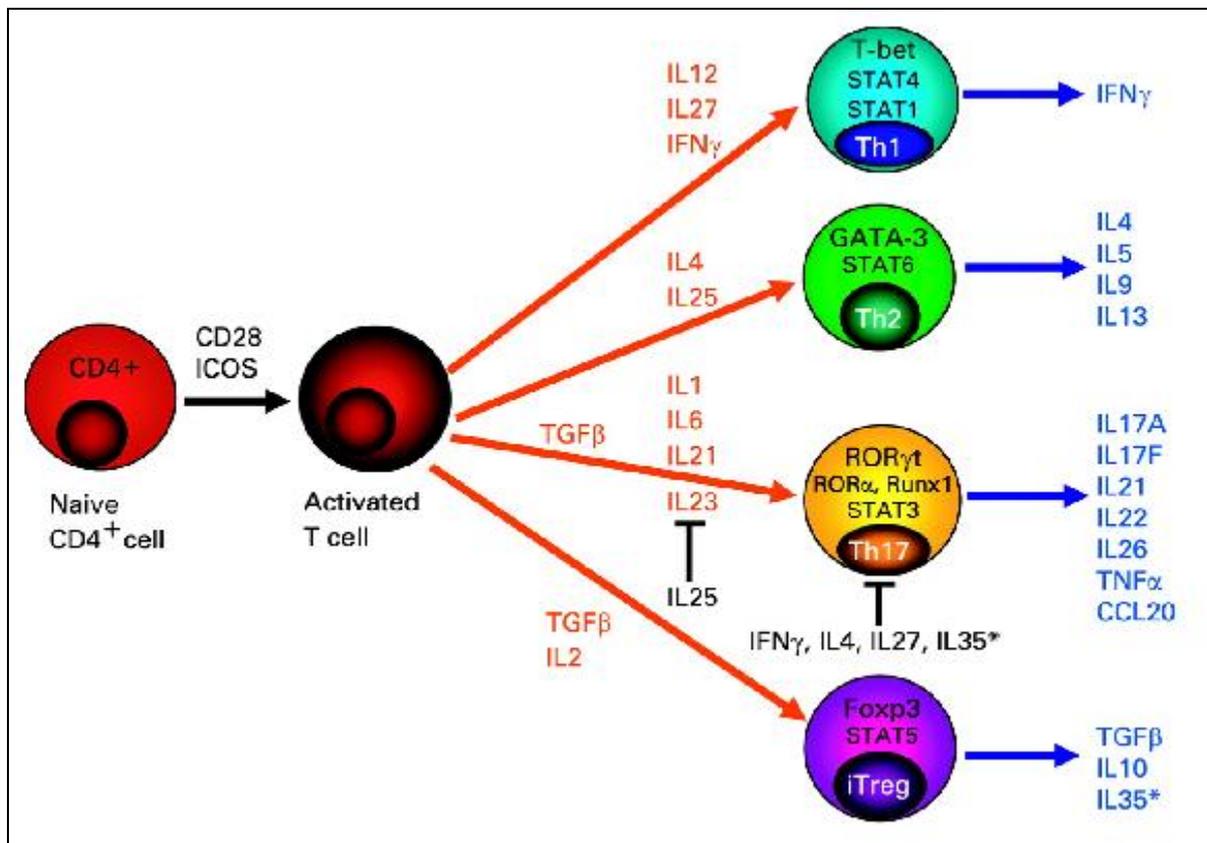


Abbildung 4: Die T-Helfer-Zell-Differenzierung, mod. aus Brand 2010, (101): Die Th1, Th2, Th17- und regulatorischen T-Zellen entwickeln sich aus einer naiven CD4⁺-Zelle. Zytokine, die die Differenzierung fördern, sind in Rot markiert. In Blau erscheinen die wichtigsten Zytokine, die durch die differenzierten Th-Zellen produziert werden. Zytokine, welche die Th-17-Differenzierung hemmen, sind Schwarz markiert. Hauptsignale für die Differenzierung von Th17-Zellen sind die Zytokine IL-6 und TGF- β . IL-27 und IFN- γ hemmen die Entwicklung der Th17-Zellen durch eine Hemmung von IL-6 und TGF- β und des Transkriptionsfaktors ROR γ t. Die jeweiligen Transkriptionsfaktoren (T-bet, GATA-3, ROR γ t und Foxp3) der Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen sind eingekreist markiert.* Nur Treg-Zellen bei Mäusen produzieren kontinuierlich IL-35, welches antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und die Th17-Differenzierung limitiert.

Legende: GATA, GATA binding protein; ICOS, inducible co-stimulatory molecule; IL, Interleukin; RUNX, runt-related transcription factor; FOXP, forkhead box P3; STAT, signal transducer and activator of transcription; T-bet, T box expressed in T cells.

Bei einem gesunden mukosalen Immunsystem überwiegen antiinflammatorische Faktoren. Durch aktive Unterdrückung von Entzündungsprozessen wird ein Zustand der physiologischen Toleranz erzielt. Ein gesundes Immunsystem steht jedoch in konstanter Alarmbereitschaft und wird rasch sowohl über die angeborene Immunantwort als auch über die erworbene Immunantwort durch T- und B-Zellen aktiviert. Das mukosale Immunsystem wird durch die hohe Antigenlast des Lumens besonders gefordert. Hierfür stehen mit den M-Zellen, den Peyerschen Plaques und den Immunzellen der Lamina propria spezialisierte Strukturen bereit. Abbildung 5 gibt einen Überblick über Strukturen des mukosalen Immunsystems (78, 87, 116).

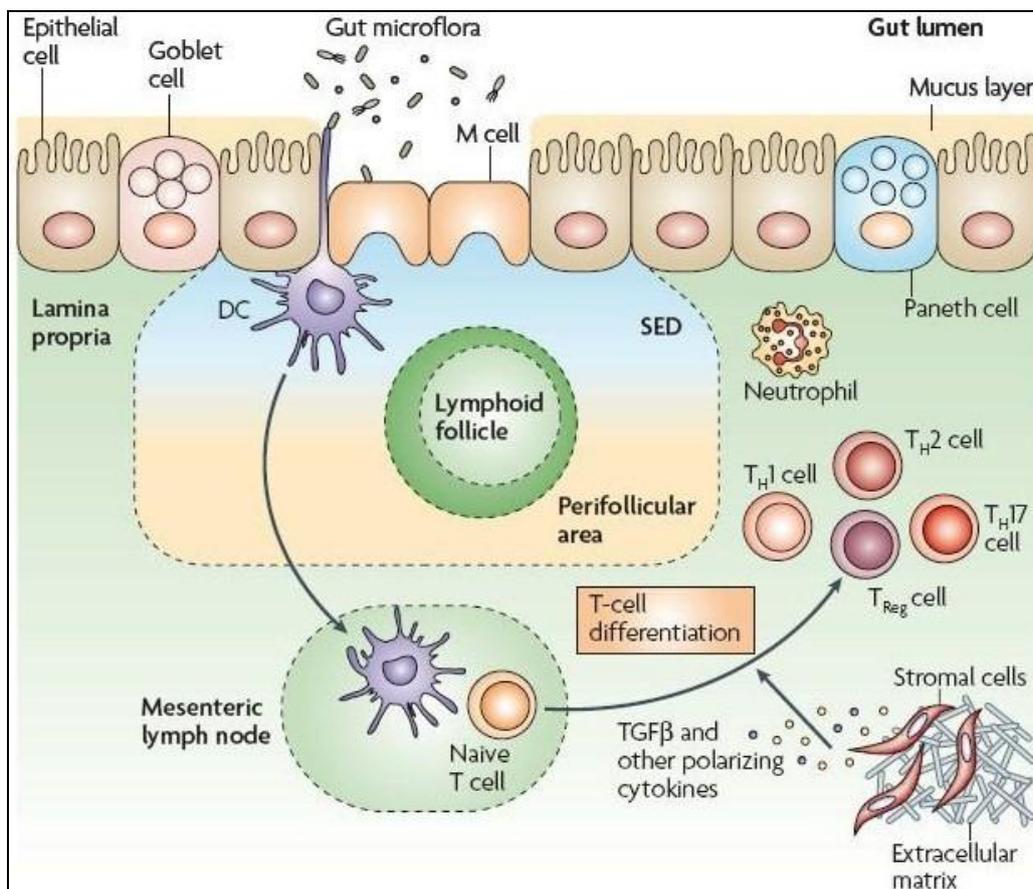


Abbildung 5: Funktionelles Schema zum mukosalen Immunsystem. Mod. aus: Cho 2008 (117)

Anm.: Antigene werden aus dem Lumen über M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels unverändert resorbiert und über APCs in den darunter liegenden Follikeln der Peyerschen Plaques prozessiert und der spezifischen Immunabwehr präsentiert. Es kommt zur Stimulierung von naiven T-Zellen, die unter dem Einfluss von Zytokinen, unter anderem IL-23, IL-4 und IFN- γ aktiviert werden und zu reifen T-Zellen differenzieren (Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen). Intestinale Epithelzellen resorbieren ebenfalls Antigene, welche über MHC-II Moleküle zur T-Zell-Aktivierung an ihre Oberfläche präsentiert werden. Diese Mechanismen tragen vermutlich zur Toleranz bei (117).

Die gemeinsame Endstrecke des Zusammenspiels von Genetik und Umweltfaktoren bei CED ist durch ein pathologisches Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort geprägt und mündet in einer Unterhaltung einer chronischen Entzündung. Es ist davon

auszugehen, dass beim M. Crohn ein Ungleichgewicht zu Gunsten der proinflammatorischen Th17- und Th1-Zellen, zur chronischen Entzündung beiträgt (101, 118), und bei C. ulcerosa eine Th2-ähnliche Immunantwort die Entzündungsprozesse im Gange hält. Die Abbildung 6 zeigt die stark vereinfachte aktuelle Theorie zur Dichotomie der Th1/Th-17-Immunantwort bei M. Crohn und der Th2-Antwort bei der C. ulcerosa. Die Abbildung 7 macht das Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Th1-, Th2- und Th17-Zytokinen deutlich.

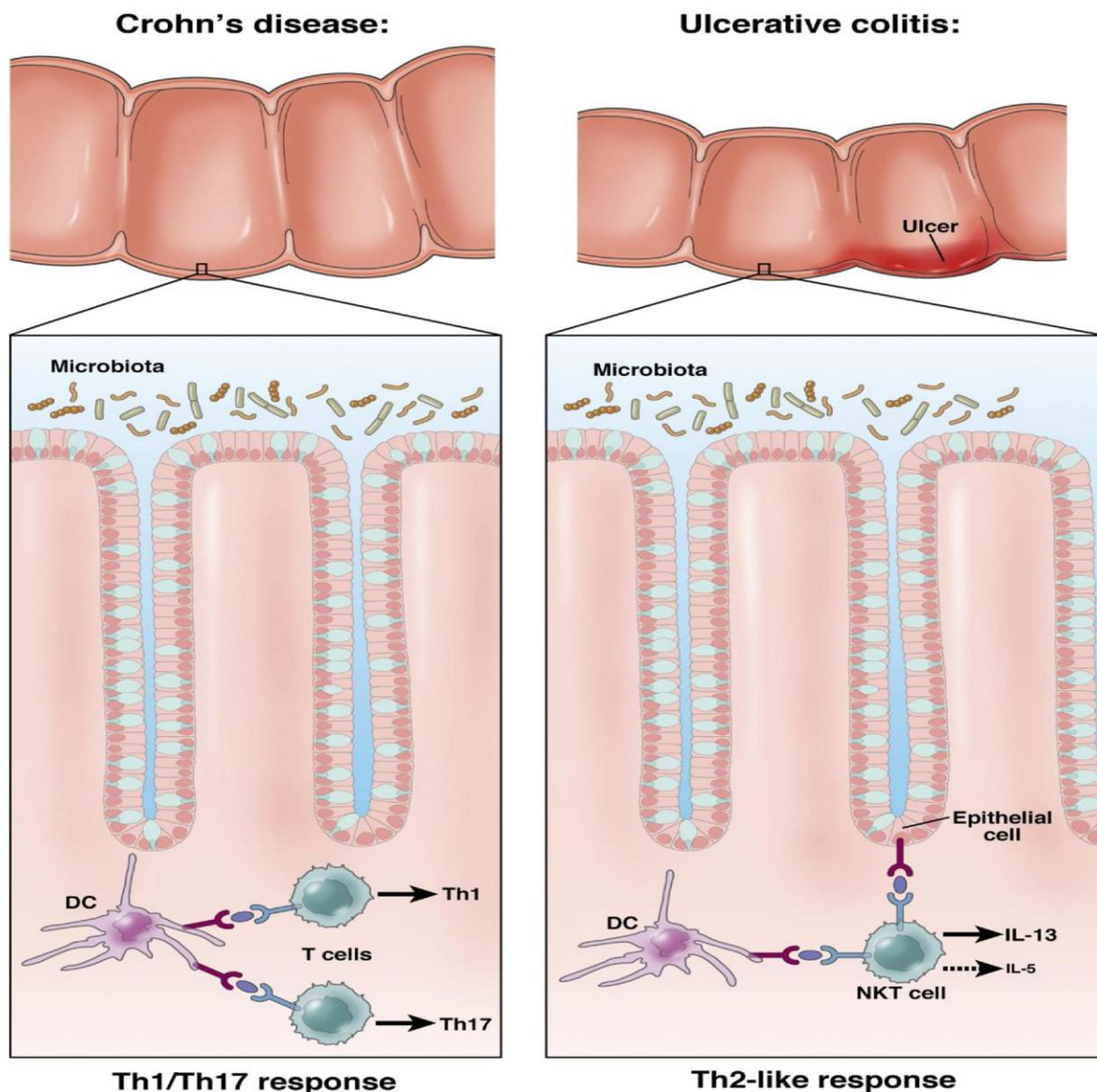


Abbildung 6: Stark vereinfachtes Schema zur Dichotomie der Zytokinen in CED. Mod. nach Strober 2011 (102).

Anm: Obwohl M. Crohn und C. ulcerosa als Unterformen der CED gemeinsame genetische Eigenschaften aufweisen, werden sie durch unterschiedliche T-Zell-Immunantworten geprägt. M. Crohn wird durch ein Th1/Th17-Antwort geprägt, welche vor allem durch die Interleukine IL-12 und IL-23 getrieben wird. Bei der C. ulcerosa wird eine Th2-ähnliche Antwort beobachtet, welche vorwiegend durch IL-13- und IL-5-produzierende Killer-Zellen gesteuert wird.

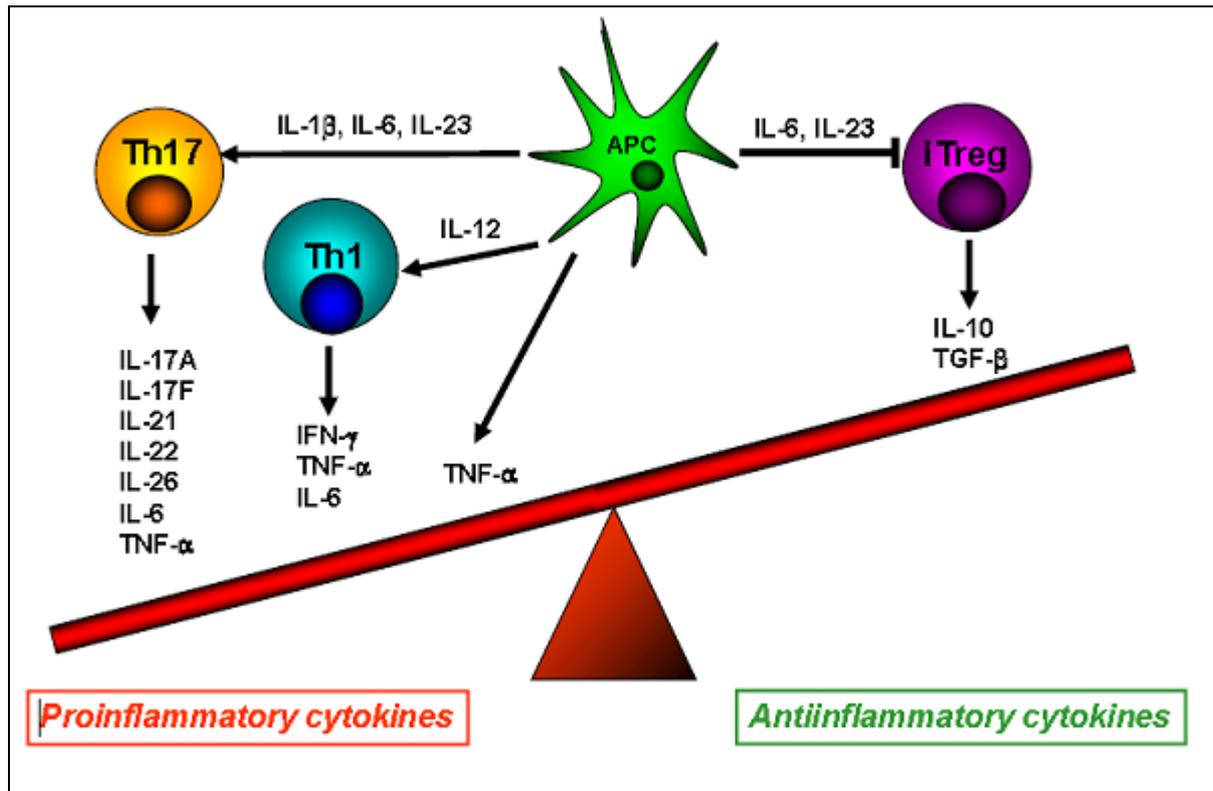


Abbildung 7: Das Ungleichgewicht zwischen antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen bei M. Crohn. Mod. aus: Brand 2009 (101).

Anm.: Zytokine werden nach Aktivierung durch APC ausgeschüttet, triggern die T-Zelldifferenzierung und haben teilweise direkt proinflammatorische Effekte. Bei CED überwiegt die Produktion proinflammatorischer Th17- und Th1-Zellen gegenüber regulatorischen T-Zellen. IL-23 hemmt die Wirkung der regulatorischen T-Zellen, wodurch Entzündungsprozesse getriggert werden.

Die Bedeutung der Th17-Antwort bei der CED-Pathogenese wird durch zahlreiche Studien belegt, welche Assoziationen zwischen Genen der Th17-Differenzierung und dem M. Crohn bzw. der C. ulcerosa nachweisen konnten, siehe 1.3.4.

1.2.4 Evidenz für die Rolle genetischer Faktoren aus der genetischen Epidemiologie

Die immer wieder beobachtete familiäre Häufung von CED, die hohe CED-Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen sowie die ethnischen Unterschiede der Inzidenzen machen eine genetische Ursache von CED deutlich. Bei ca. 5-20% der Patienten mit CED findet sich eine positive Familienanamnese, häufiger beim M. Crohn als bei der C. ulcerosa (1). Für M. Crohn-Verwandte ersten Grades beträgt das Lebenszeit-Risiko etwa 10% und steigt auf 36%, wenn zwei Verwandte betroffen sind. Ebenfalls liegt das relative Risiko für Geschwisterkinder von M. Crohn-Indexpatienten 30-40 mal höher als das Risiko der Normalpopulation. Für die C. ulcerosa sinkt das relative Risiko auf 10-20% (1). Studien mit monozygoten und dizygoten Zwillingen geben Konkordanzraten für den M. Crohn zwischen

20-50%, bzw. 0-7%, und für die *C. ulcerosa* 14-19% bzw. 0-5% (1). Eine weitere Beobachtung ist die überzufällige Übereinstimmung spezifischer Krankheitscharakteristika wie Krankheitslokalisierung und Krankheitsverhalten innerhalb von Einzelfamilien (75-80% der betroffenen Familien). Bei 20% der Familien kommen beide Erkrankungen vor (117). Aus diesen Beobachtungen heraus lassen sich mehrere Erkenntnisse schließen: es wird deutlich, dass die Rolle der Genetik beim M. Crohn wichtiger als bei der *C. ulcerosa* ist. Ebenso können beide Erkrankungen einen teilweise gemeinsamen, teilweise jedoch unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben. Ferner wird deutlich, dass CED nicht mit einem einfachen Mendelschen Erbgang vererbt werden, sondern dass das Zusammenspiel multipler genetischer Varianten das Erkrankungsrisiko und das Erkrankungsmuster bestimmt.

1.3 Die Genetik chronisch entzündliche Darmerkrankung

1.3.1 Ansätze zur Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen: Kopplungsanalysen, Assoziationsanalysen und Einzelnukleotid-Polymorphismen

Die genetische Untersuchung polygener Erkrankungen wie CED bedarf spezieller molekular-epidemiologischer Methoden. Um so genannte Suszeptibilitätsgene für die CED zu entdecken, werden zwei sich ergänzende Methoden angewendet. Kopplungsanalysen untersuchen die Kosegregation (d.h., zwei Marker werden vollständig gekoppelt vererbt) lokalisierter polymorpher Erkrankungs- assoziierter Marker mit dem Ziel, potentielle Kandidatenregionen zu identifizieren. Dafür wird die Tatsache ausgenutzt, dass das gesuchte Gen in der Nähe des verwendeten Markers liegen muss, wenn beide in Familien gemeinsam vererbt werden (119). Als Marker werden Mikrosatellitenmarker im gesamten Genom eingesetzt. Kopplungsanalysen ermöglichen die genomweite Suche nach Genloci, welche potentielle Kandidatengene enthalten, ohne Vorwissen über die der Erkrankung zugrunde liegenden biochemischen Prozesse. Wurde eine Kandidatenregion auf einem Chromosom identifiziert, wird durch weiterführende Feinkartierung versucht, Kandidatengene zu identifizieren, deren Funktion im pathophysiologischen Zusammenhang mit der Erkrankung logisch verknüpft sein könnte. Assoziationsstudien haben zum Ziel, Kandidatenregionen auf bestimmte Kandidatengene einzugrenzen, oder Kandidatengene direkt auf genetische Variationen zu untersuchen. Dafür werden Patientengruppen mit Kontrollindividuen bezüglich der Allelfrequenz solcher genetischer Variationen statistisch verglichen. Am häufigsten werden sogenannte Einzel-nukleotidpolymorphismen untersucht („*single nucleotid polymorphism*“, SNP). SNPs sind die häufigsten genetischen Varianten im menschlichen Genom mit einem statistischen Vorkommen von 1 SNP alle 100 bis 300 Basenpaare. Es handelt sich um einen Einzelbasenaustausch der genomischen DNA, der in

der Gesamtbevölkerung mit einer Mindestfrequenz von 1% zu finden ist und stabil vererbt wird. Genom-weite Assoziationsstudien (GWAS) sind seit dem Einsatz der Chip-SNP-basierte Hochdurchsatztypisierungstechnologie und der Fertigstellung der Genotypisierung der wichtigsten Haplotypkonstellationen im Genom (HapMap Projekt) möglich. Eine gefundene statistische Signifikanz muss durch mehrere Replikationsstudien bestätigt werden. Auch sind darauf folgende tierexperimentelle und funktionelle Analysen zum Kandidatengen notwendig, um einen kausalen Zusammenhang beweisen zu können (120). In den letzten Monaten wurden mehrere Meta-Analysen aus GWAS veröffentlicht, welche die Zahl der Suszeptibilitätsloci für CED (so genannte *intestinal bowel disease loci*, IBD-Loci) auf insgesamt 99 erhöhen. Davon sind 71 Loci mit M. Crohn, 47 Loci mit der C. ulcerosa und 28 Loci mit beide Erkrankungen assoziiert (121-123), Die Abbildung 8 gibt einige der wichtigsten Suszeptibilitätsgene für M. Crohn, C. ulcerosa und für beide Erkrankungen gemeinsam wieder.

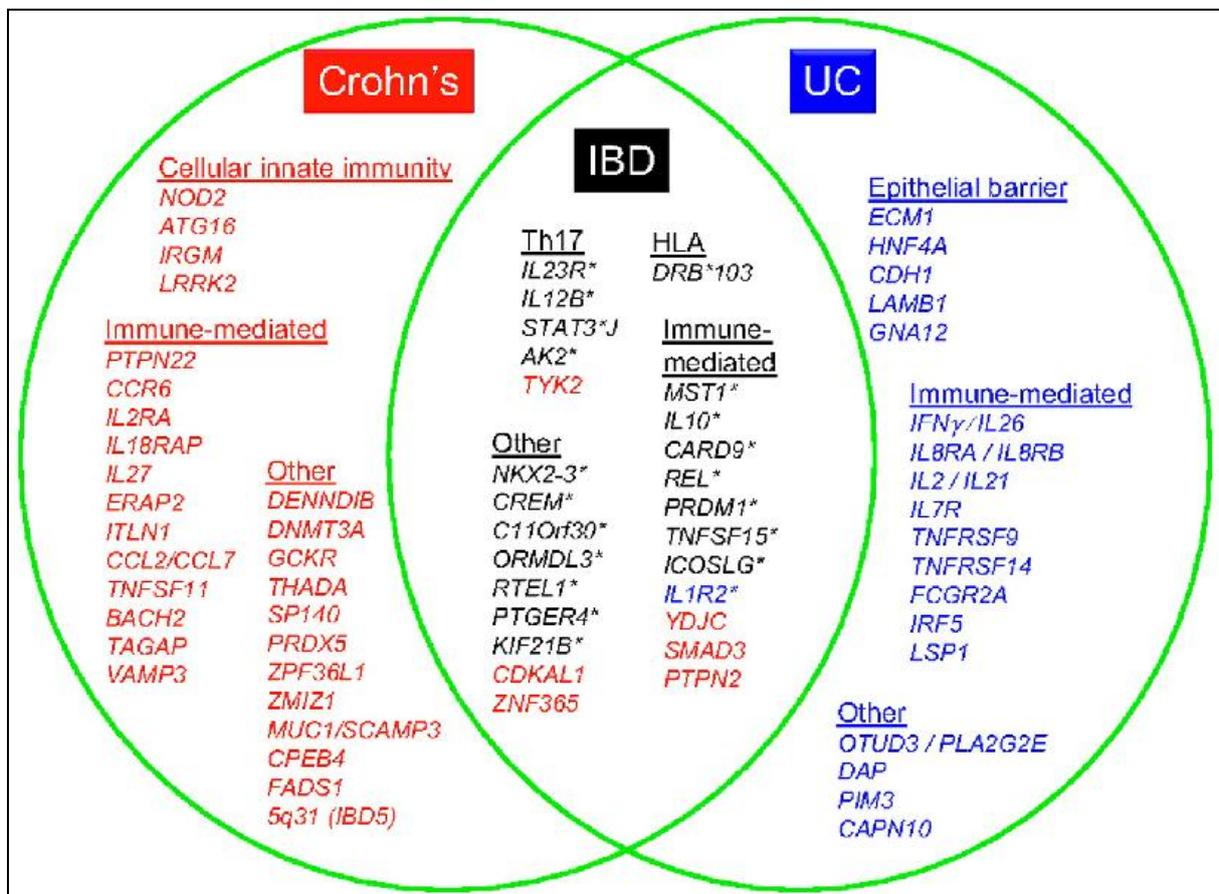


Abbildung 8: Suszeptibilitätsgene für CED. Mod. nach Lees 2011 (123)

Anm: Für M. Crohn (in Rot markiert) und C. ulcerosa (in Blau markiert) sind Gene dargestellt, die mit einem P-Wert $<5 \times 10^{-8}$ assoziiert sind. Für Gene, welche sowohl mit dem M. Crohn als auch mit der C. ulcerosa assoziiert sind gilt folgende Markierung: in Schwarz, p-Wert $<5 \times 10^{-8}$ für M. Crohn und C. ulcerosa; in Rot, p-Wert $<5 \times 10^{-8}$ für M. Crohn und $<5 \times 10^{-4}$ für die C. ulcerosa; in Blau, p-Wert $<5 \times 10^{-8}$ für die C. ulcerosa und p-Wert $<5 \times 10^{-4}$ für M. Crohn. CD, M. Crohn. UC, C. ulcerosa.

In diesen Loci werden Gene verschlüsselt, die in unterschiedlichen homöostatischen Mechanismen involviert sind und somit auf unterschiedlichste Art zur Entstehung von CED beitragen könnten: 1. Mechanismen der angeborenen Pathogenerkennung; 2. Mechanismen der Autophagie; 3. Mechanismen der adaptiven Immunantwort und der Th17-Zelldifferenzierung; 4. Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere; 5. IL-10-assoziierte Signalwege (123, 124). Die Abbildung 9 fasst diese Signalwege zusammen. Im Folgenden werden einzelne ausgewählte Suszeptibilitätsloci näher beschrieben. Diese wurden alle durch die Meta-Analysen von Barrett et al. und Franke et al. bestätigt (122, 125)

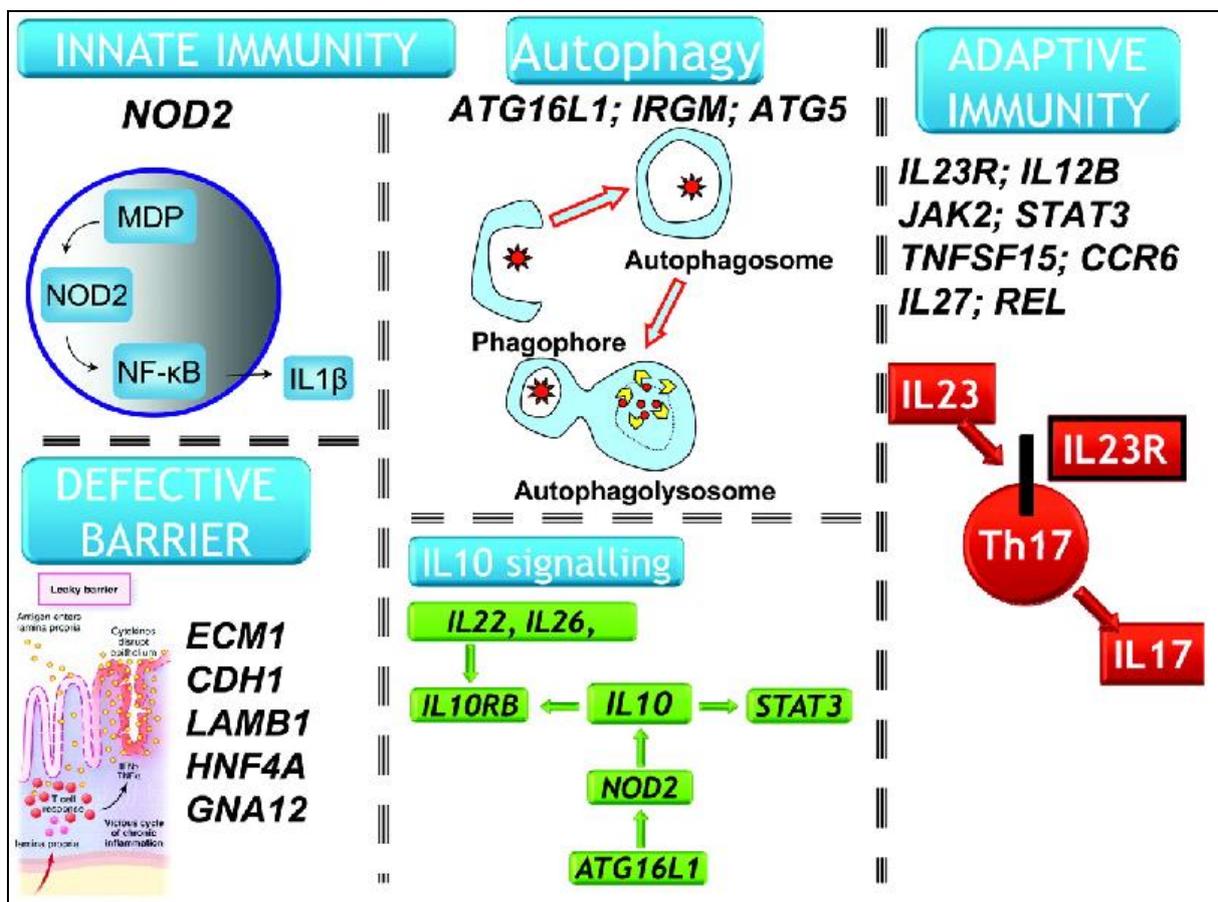


Abbildung 9: Die verschiedenen Signalwege der Suszeptibilitätsgene für CED. Mod. nach Lees 2011 (123). Erläuterung siehe Text.

Anm: *Innate Immunity*, angeborene Immunabwehr. *Autophagy*, Autophagie. *Adaptive Immunity*, adaptive Immunabwehr. *IL-10 signalling*, IL-10-Signalwege. *Defective Barrier*, gestörte Schleimhautbarriere.

1.3.2 Gene der angeborenen Pathogenerkennung

Das *NOD2*-Gen

In dem erstmals 1996 durch die Arbeitsgruppe von Hugot identifiziertem Suszeptibilitätslocus IBD1 konnte 2001 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen das verantwortliche Gen *NOD2* identifiziert werden (126-128). *NOD2* kodiert einen intrazellulären Rezeptor für MDP und gehört somit zur großen Gruppe der PRRs (79, 129). Die drei wesentlichen, mit dem M. Crohn assoziierten *NOD2*-Polymorphismen (p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsinsC) betreffen den Teil des Proteins, der in der Bakterienerkennung involviert ist (130). Economou und Oostenbrug führten 2004 bzw. 2006 zwei große Meta-Analysen durch, die Assoziationen der *NOD2*-Polymorphismen mit einer erhöhten Suszeptibilität für M. Crohn in kaukasischen Populationen bestätigten (131, 132) Dagegen konnten sich diese Assoziationen in Studien mit asiatischen Populationen nicht zeigen (133-136). Zusätzlich validierte diese Metaanalyse Befunde aus vorherigen Genotyp-Phenotyp-Korrelationsstudien, die gezeigt hatten, dass Mutationen im *NOD2*-Gen mit einem Befall des Ileums und einem geringen Alter bei Erstdiagnose assoziiert waren (137, 138). Die Aktivierung von *NOD2* via MDP, das von APCs, Epithelzellen und Paneth-Zellen exprimiert wird, resultiert in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) der die Expression pro- und antiinflammatorischer Moleküle induziert (139, 140). Diese drei SNPs sind alle mit einer reduzierten Aktivierung von NF- κ B als Antwort auf eine MDP-Stimulation assoziiert. Dies steht in Widerspruch mit der gemessenen erhöhten NF- κ B Aktivität in intestinale Mukosa von CED-Patienten (117, 141). Eine Erklärung dafür bietet die Arbeit von Strober et al. Dort wurde gezeigt, dass in *NOD2*-defizienten Zellen das Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2) eine NF- κ B-Aktivierung nicht hemmen kann (141). TLRs befinden sich auf der Oberfläche von APCs und Epithelzellen und sind wie *NOD2* als PRRs Teil der angeborenen Immunabwehr (142). Darüber hinaus wurde der *NOD2*-mutierte Genotyp sowohl in tierexperimentellen Modellen als auch in humanen Expressionsanalysen mit einer reduzierten Produktion von Cryptidinen bzw. α -Defensinen in Verbindung gebracht, welche endogene antimikrobielle Peptide sind, die vorwiegend in Paneth-Zellen produziert werden (143). Durch eine gestörte Defensin-Produktion ist die Integrität der Schleimhautbarriere beeinträchtigt, wodurch Epithelzellen eine erhöhte Exposition mit Bakterien ausgesetzt werden. (93, 117, 140).

Die TLR-Gene

Die Toll-like Rezeptoren gehören zur großen Familie der PRRs und kommen membran-gebunden auf Zelloberflächen vor. Die *TLR 1, 2, 3, 4, 6* und *9*-Gene sind in Kopplungs- und GWAS als Suszeptibilitätsgene für M. Crohn beschrieben worden (144). Darunter sind die

Assoziationen zwischen dem *TLR4*-Gen und M. Crohn am besten analysiert worden. Zwei unabhängige Meta-Analysen konnten die Assoziation des *TLR4*-Polymorphismus p.Asp299Gly mit M. Crohn bestätigen (145, 146). Mutationen im *TLR4*-Gen wurden mit einer erhöhten Suszeptibilität für gravierende bakterielle Infektionen in Zusammenhang gebracht (147, 148).

CARD9

Zhernakova et al. konnten 2008 das *CARD9*-Gen auf Chromosom 9q34.3 als Suszeptibilitätsgen für M. Crohn identifizieren und replizierten somit die gefundene Assoziation aus der GWAS des Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) zwischen M. Crohn und *CARD9* (149). 2010 konnten McGovern et al. ebenfalls *CARD9* mit der *C. ulcerosa* assoziieren (150). *CARD9* scheint von besonderer Bedeutung zu sein, weil das Gen durch seine funktionelle Eigenschaften Gene der angeborenen Immunabwehr wie *NOD2* und *TLR* mit Genen der adaptiven Abwehr verbindet, die in der Th17-Zelldifferenzierung und im IL-23-Signaltransduktionsweg involviert sind (151).

1.3.3 Gene der Autophagie: *ATG16L1* und *IRGM* Gene

Der Mechanismus der Autophagie umfasst mehrere zelluläre Prozesse, die zur Beseitigung zelleigener Abfallprodukte, fehlerhafter Organellen und Proteinen dienen und somit zur Aufrechterhaltung des zytoplasmatischen Metabolismus beitragen. In den Jahren 2004 und 2005 erschienen unabhängige Studien zur Autophagie, die Evidenz für eine Beteiligung in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr erbrachten (152-156). Es wurde somit klar, dass Mechanismen der Autophagie auch zur intrazytoplasmatischen Keimabwehr dienen. Seit 2007 haben GWAS zwei Suszeptibilitätsgene der Autophagie identifiziert, *ATG16L1* und *IRGM*, welche eindeutige Assoziationen mit dem M. Crohn aufwiesen. Die Assoziationen zwischen *ATG16L1* und M. Crohn wurden anschließend durch mehrere unabhängige Studien aus Deutschland ($p=4 \times 10^{-8}$), Nordamerika ($p < 10^{-10}$) und aus England ($p=6,5 \times 10^{-13}$) repliziert (157-161). Dabei handelt es sich um den kodierenden *ATG16L1*-SNP rs2241880, der zu einem Aminosäureaustausch führt (T300A). Eine deutsche Forschungsgruppe konnte ebenfalls signifikante Assoziationen mit dem *ATG16L1*-SNP rs2241879 und M. Crohn nachweisen. Bis auf die britische Forschungsgruppe von Prescott et al. konnte bisher keine Assoziationen zwischen den *ATG16L1*-Varianten und der *C. ulcerosa* nachgewiesen werden (159). Interessanterweise konnte diese Assoziationen mit M. Crohn in einer japanischen Studie nicht repliziert werden, wodurch deutlich wird, dass bei europäischen und asiatischen Individuen unterschiedliche genetische Varianten involviert sind (159, 162). *ATG16L1* befindet sich auf Chromosom 2q.37.1 und kodiert ein Protein,

welches zusammen mit Atg12 und Atg5 einen 800 kDa großen Komplex bildet, der zur Ausbildung eines Autophagosoms beiträgt. Studien deuten darauf hin, dass Prozesse der Autophagie direkt zur Beseitigung von intrazellulären Pathogenen beitragen. Ferner wurde deutlich, dass der Prozess der Autophagie zur MHCII-vermittelnden Antigen-Prozessierung und -Präsentation von körpereigenen Proteinen auf der Zelloberfläche beiträgt, sodass ein direkter Zusammenhang mit der adaptiven Abwehr besteht. Zusätzlich zeigte sich, dass Prozesse der Autophagie in Prozesse der T-Zell-Proliferation und -Differenzierung involviert sind, welche bei der Pathogenese des M. Crohn eine wichtige Rolle spielen (152, 160, 163). Ferner zeigten Cadwell et al., dass genetische Variationen im *ATG16L1*-Gen mit tiefgreifenden Veränderungen in Stoffwechselwegen und Eigenschaften der Paneth-Zellen im Ileum assoziiert sind. (164). Die GWAS des WTCCC konnte hochsignifikante Assoziationen zwischen *IMRG*-Polymorphismen und M. Crohn nachweisen, die in einer unabhängigen Studie repliziert werden konnten ($p=2,1 \times 10^{-10}$) (161). *IRGM* auf Chromosom 5q33.1 kodiert ein kleines Protein, welches zur so genannten p47-Immunabwehr-assoziierten Guanosin-Triphosphatase-Familie (*p47 immunity related GTPase Family*) gehört. Singh et al. zeigten, dass *IRGM* in Prozesse der Autophagie zur Beseitigung von *M. tuberculosis* in menschlichen Makrophagen benötigt wird (165). Welche Mechanismen durch die *IRGM*-Varianten zur Pathogenese von M. Crohn beitragen, sind wie bei *ATG16L1* weitgehend unklar.

1.3.4 Gene der adaptiven Abwehr und der Th17-Zelldifferenzierung

Das veraltete Konzept der Th1/Th2-Dichotomie in der Pathogenese CED wurde durch die Identifizierung einer neuen proinflammatorischen T-Zell-Population, der Th17-Zellen, stark verändert (101). Die Th-Zell-Differenzierung wird maßgebend durch die Interleukin-12-Familie, bestehend aus IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35, beeinflusst. Während IL-12 vor allem die Th1-Zell-Antwort steuert, wurde IL-23 eine Schlüsselrolle bei der Th17-Zelldifferenzierung zugesprochen (101). IL-27 hemmt die Th17-Differenzierung und fördert die IL-10-Produktion durch Treg-Zellen (109, 110). Neuere Studien haben die Rolle der Th17-Zellen bei der CED-Pathogenese untermauert, indem verschiedene genetische Varianten mit M. Crohn und *C. ulcerosa* signifikant assoziiert werden konnten. Die Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Gene der Th17-Differenzierung, welche mit CED assoziiert sind. Im Nachfolgenden werden einige Gene näher beschrieben.

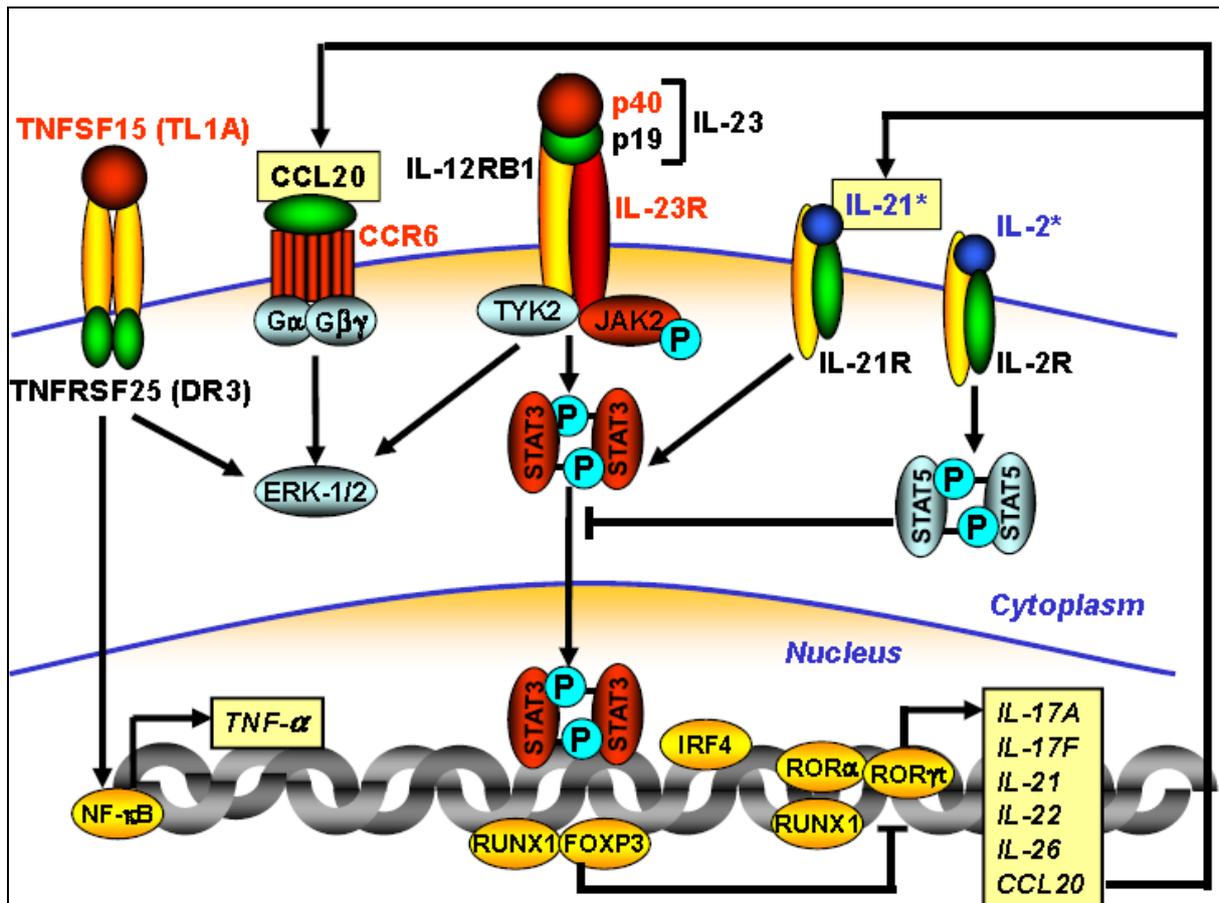


Abbildung 10: Proteine, welche durch Suszeptibilitätsgene für *M. Crohn* und für die *C. ulcerosa* kodiert werden und in der Th17-Zell-Differenzierung involviert sind. Mod. aus Brand 2010 (101)

Anm: Die dargestellten Gene spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion der Th17-Zellen und wurden durch GWAS mit *M. Crohn* assoziiert (in Rot markiert). Die Gene *IL23R*, *IL12B*, *JAK2* und *STAT3* wurden auch mit der *C. ulcerosa* assoziiert.

Legende: ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; FOXP3, *forkhead box P3*; IL-23R, Interleukin-23 Rezeptor; IRF, *interferon regulatory factor*; JAK2, *Janus kinase 2*; NF-κB, *nuclear factor kappa B*; ROR, *retinoid-related orphan receptor*; RUNX, *runt related transcription factor*; SNP, *single nucleotide polymorphism*; STAT, *signal transducer and activator of transcription*; Th, T-Helferzellen; TNF, *tumour necrosis factor*; TNFRSF, *TNF receptor superfamily 25*; TNFSF, *TNF superfamily*; TYK, *tyrosine kinase*;

IL-12

Das *IL12B*-Gen kodiert die p40-Untereinheit, die für die IL-12- und IL-23-Rezeptoren gemeinsam ist. IL-12 ist ein potenter Induktor der IFN- γ -Produktion, welches die Th1-Differenzierung maßgeblich stimuliert. Bis zur Entdeckung der Th17-Zellen galt die Immunantwort der Th1-Zellen als Hauptkomponente in der CED-Pathogenese (43, 49, 101, 117). *IL-12B* wurde als Suszeptibilitätsgen für *M. Crohn* als erstes von dem Wellcome Trust Case Control Consortium identifiziert und für *C. ulcerosa* von Franke et al. beschrieben (166). Aktuell wird die Rolle von *IL-12B* bei CED erneut untersucht, da viele Eigenschaften, die *IL-12B* zugeschrieben wurden, angesichts der gemeinsamen Untereinheit p40 möglicherweise *IL-23*-abhängig sind.

IL23R

IL-23 stimuliert die IL-23-Rezeptoren (IL-23R) an der Oberfläche der Th17-Zellen und stabilisiert die bereits differenzierten T-Zellen. Die Rolle der Th17-Zellen in der CED-Pathogenese wurde vor allem durch eine GWAS von Duerr et al. untermauert, welche erstmals signifikante Assoziationen von genetischen Varianten im *IL23R*-Gen mit einer Suszeptibilität für M. Crohn nachweisen konnten (167). Daraufhin folgten weitere Studien, die ebenfalls Assoziationen mit der *C. ulcerosa* nachweisen konnten, die allerdings schwächer sind als beim M. Crohn (168-170). Für bestimmte Polymorphismen wie z.B. rs11209026 (p.Arg381Gln) wurde eine protektive Rolle des Minor-Allels beschrieben, während für andere Varianten, z.B. rs1004819 eine erhöhte Suszeptibilität für M. Crohn beschrieben worden ist. Es bleibt noch unklar, durch welche Mechanismen *IL23R*-Polymorphismen die Suszeptibilität für M. Crohn erhöhen. Es wird angenommen, dass die IL-23-Signaltransduktionswege einen anhaltenden Entzündungsprozess fördern (117). Diese Assoziationen wurden im Verlauf mehrmals repliziert (125).

IL27

IL-27 gehört IL-12-Zytokin-Familie und hat eine heterodimere Struktur, bestehend aus dem EBI3 und der p28-Untereinheit (97, 171). IL-27 wird in der frühen adaptiven Immunantwort aus aktivierten APCs produziert und hemmt die Entwicklung der proinflammatorischen Th17-Zellen, indem die Expression des Th17-Zell-Transkriptionsfaktors ROR γ t inhibiert wird (108, 109, 115). Weitere antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-27 schließen unter anderem die Differenzierung von IL-10- produzierenden Tr1-Zellen (eine Untergruppe der Treg-Zellen) und die Hochregulierung der IL-10-Expression ein, welches aus Th2-Zellen und Monozyten gebildet wird und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt (110, 115). Bis jetzt konnten unsere Arbeitsgruppe sowie andere Forschungsgruppen Assoziationen von *IL27*-Polymorphismen (rs1968752 und rs151181) mit M. Crohn und *C. ulcerosa* nachweisen (115, 122, 172). Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe IL-27 als Mediator der epithelialen Schleimhautbarriere identifizieren und charakterisierte *DMBT1* als Zielgen von *IL27*. Damit wird deutlich, dass eine Untersuchung der *DMBT1*-Polymorphismen hinsichtlich der Suszeptibilität für CED entscheidend ist (115).

STAT3, JAK2, CCR6 und ICOSLG

Die *STAT3* und *JAK2*-Gene auf Chromosom 17q21 bzw. 9p24 kodieren Proteine, die Teil der Signaltransduktionswege des IL-23-Rezeptors sind. Während die Meta-Analyse von Barrett et al. Assoziationen zwischen *STAT3* und M. Crohn bestätigte, konnte eine deutsche Studie Assoziationen von *STAT3* ausschließlich mit der *C. ulcerosa* zeigen (166). Für *JAK2* konnten

Assoziationen mit dem M. Crohn und der C. ulcerosa nachgewiesen werden (125, 151, 173). *CCR6* auf Chromosom 6q27 ist der Chemokin-Rezeptor für das *chemokine (C-C) motif ligand 20* (CCL20), welches durch unreife dendritische Zellen und Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle für die B-Zelldifferenzierung und die spezifische T-Zellrekrutierung während entzündlicher Prozesse in Epithelzellen spielt (174). Das *ICOSLG*-Gen auf Chromosom 21q22 kodiert für ein co-stimulierendes Protein der mukosalen T-Zell-Regulierung und spielt auch eine Rolle bei der Antigenpräsentation (175). Die Meta-Analyse von Barrett et al. zeigte für diese Gene signifikante Assoziationen mit M. Crohn (125).

HLA-Gene, *PTPN2*, *PTPN22*

Der IBD3-Locus auf Chromosom 6 beinhaltet Gene der HLA-Familie. Die *HLA-DRB1* Region ist von allen Regionen am besten untersucht worden und zeigt die stärksten Assoziationen mit M. Crohn und mit C. ulcerosa. Fernando et al. zeigten weitere Assoziationen von *HLA*-Genen und CED (168, 176). Die *PTPN2* und *PTPN22*-Gene auf Chromosom 18p11 bzw. 1p13 kodieren für Tyrosin-Phosphatasen und wurden durch die Studie von Barrett et al. mit M. Crohn assoziiert (125)

1.3.5 Gene zur Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere

PTGER4* und *SLC22A4/A5

Die Assoziation des *PTGER4*-Gens auf Chromosom 5p13, welches für den Prostaglandin 4-Rezeptor kodiert, wurde durch die Meta-Analyse von Barrett et al. bestätigt. Die im IBD5-Bereich gelegenen *SLC22A4*- und *SLC22A5*-Gene kodieren für zwei organische Kationentransporter OCTN1 und OCTN2. Diese Assoziation wurde erstmals von Peltekova et al. beschrieben und konnte durch die Meta-Analyse von Barrett et al. bestätigt werden (125, 177). Die Assoziationen von Polymorphismen im *PTGER4*-Gen, *SLC22A4* und *SLC22A5*-Genen mit der Suszeptibilität für M. Crohn wurde ebenfalls durch unsere Arbeitsgruppe repliziert (178, 179).

1.4 *DMBT1* als Suszeptibilitäts-gen für CED

1.4.1 *SAG*, gp-340 und *DMBT1*: Isoproteine des *DMBT1*-Gens

DMBT1 auf Chromosom 10q26.13 kodiert drei Isoproteine: *Salivary agglutinin* (*SAG*), *lung glycoprotein-340* (gp-340) und *Deleted in Malignant Brain Tumors 1* (*DMBT1*). Das *SAG* wurde erstmal von Ericson und Rundegren als agglutinierende Substanz für *Streptococcus mutans* im Speichel als 300-400 kDa großes Molekül aus den Speicheldrüsen isoliert, und wurde für seine antikariogene Eigenschaften bedeutsam (180). Das gp-340

wurde 14 Jahren später zusammen mit dem *Lung Surfactant Protein D* (SP-D) aus dem bronchoalveolären Lungensekret von Patienten mit alveolärer Proteinose aufgereinigt. DMBT1 wurde als Produkt vom *DMBT1*-Gen identifiziert, welcher erstmals durch Mollenhauer et al. als Tumor-Suppressor-Gen beschrieben wurde, da eine Deletion und/oder eine genomische Restrukturierung des Gens mit zwei Arten von Hirntumoren (Meduloblastome und multiforme Glioblastome) signifikant assoziiert war (181, 182). Diese häufigen genomischen Restrukturierungen konnten mittlerweile auch in anderen epithelialen Tumoren der Lunge, des Magens und des Ösophagus beobachtet werden (183-186). Bis jetzt konnte die gefundenen Mutationen keine Inaktivierung des Genes erklären, sodass eine Herabregulation auf transkriptionaler Ebene in epithelialen Tumoren vermutet wird (185, 187, 188). Mehrere Studien konnten zeigen, dass es sich bei SAG, gp-340 und DMBT1 um drei Isoformen des gleichen Gens *DMBT1* handelt, da alle 3 Proteine die weitgehend gleiche Aminosäure-Sequenz haben. Es bleibt unklar, ob diese Isoformen durch alternatives Spleißen und/oder posttranslationale Veränderungen entstehen oder ob diese auf der hohen genetischen Variabilität des Gens beruhen. DMBT1/SAG/gp-340 wird entweder als membran-gebundenes Protein auf der Oberfläche alveoläre Makrophagen und auf der apikalen Membran von Epithelzellen exprimiert (189-191) oder als gelöstes Protein in den Körperflüssigkeiten ausgeschieden. Hauptsyntheseorte sind vor allem Darm, Magen und Lunge (181, 189). Daneben werden kleinere Menge im Hirn, in den Speicheldrüsen, in den Hoden, im Uterus, in der Mamma, in der Prostata und im Pankreas produziert (192). Abhängig vom Entwicklungsstadium und vom Gewebe werden unterschiedliche Varianten des *DMBT1* exprimiert (181, 185).

1.4.2 Struktur und Organisation des *DMBT1*-Gens

Das längste *DMBT1*-Allel, SR47+, umfasst ca. 80 kb genomische DNA und beinhaltet 55 Exone, wobei nur 54 durch ihre Anwesenheit in mRNAs bestätigt wurden. Der Hauptteil des Gens besteht aus 13 ca. 3-4 kb langen tandemförmig aneinander gereihten Einheiten. Jede Einheit besteht aus einem Exon, der für einen so genannten *scavenger receptor cysteine-rich receptor* (SRCR) kodiert, zwei Exone die für die sogenannten *SCRC interspersed domains* (SIDs) kodieren und einem interkalierenden Intron. Nach 13 Einheiten wird das Gen von einer CUB-Domäne, einer 14. nicht-funktionsrelevanten SRCR-Domäne und einer Zona Pellucida (ZP)-Domäne gefolgt (siehe Abbildung 11). Das Exon 55 kodiert möglicherweise eine Transmembran-Domäne. Diese Einheiten weisen eine sehr hohe, bis zu 99,8%ige Homologie untereinander auf, sowohl in den exonischen als auch in den intronischen Sequenzen, die wahrscheinlich Grundlage für die genomische Instabilität von *DMBT1* ist. Dadurch ergeben sich unterschiedlich lange Allele, die sich in ihre Anzahl an SRCR-Domäne

unterscheiden. Das kürzeste Allel, auch SR47- genannt, besitzt nur 8 solcher Einheiten. Da diese Variabilität auch in gesunde Individuen vorkommt, stellt sich die Frage, wodurch diese bedingt sind und welche Konsequenzen sie mit sich bringen (188, 193).

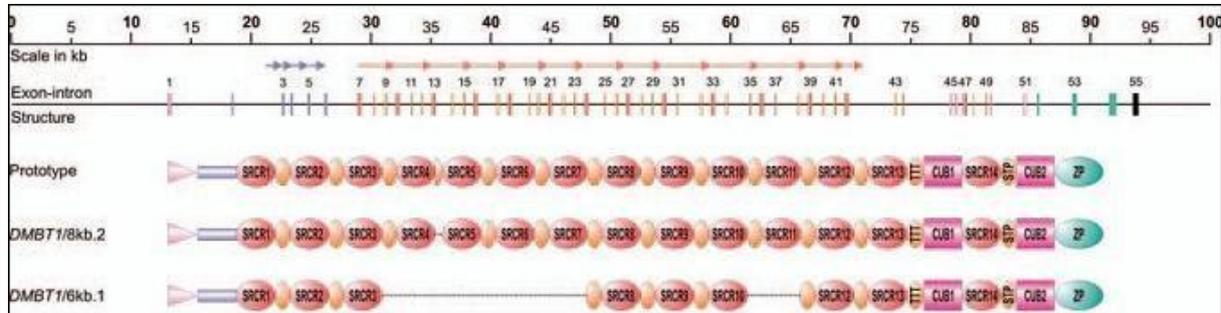


Abbildung 11: Genomische Struktur von *DMBT1*, mod. nach Ligtenberg 2007, (192).

Anm.: Obere Zeile: Maßstab in kb; zweite Zeile: Verteilung der Exon/Intron-Organisation im Gen. Die Pfeile zeigen die repetitiven Einheiten. Nur ungerade Exons sind dargestellt. Kleine Exons (z.B. die für SIDs kodieren) wurden nicht maßstabgerecht gezeichnet. Die Farben der Exone korrespondieren mit der kodierenden Sequenz in der dritten Zeile. Die dritte Zeile stellt den *DMBT1*-Prototyp mit dem längsten Allel dar. Die vierte Zeile (*DMBT1/8kb.2*) stellt das größte *DMBT1*-Allel, die fünfte Zeile (*DMBT1/6kb.1*) das kleinste Allel dar, das bis jetzt identifiziert wurde.

Durch sein auffälligstes Strukturmerkmal, die repetitive Abfolge von 13 SRCR-Domänen, ist die Zuordnung des *DMBT1*-Gens zu der so genannten SRCR-Superfamilie berechtigt. Letztere besteht aus sezernierten oder membran-gebundenen Proteinen aus 100-110 Aminosäuren (194), die Liganden-bindende Eigenschaften besitzen und damit eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen erfüllen. SCRC-Domänen sind hoch konservierte Proteine, die in allen mehrzelligen Lebewesen vorkommen (195-197) und sich nach Anzahl der Cystein-Reste in der SCRC-Region in 2 Untergruppen einteilen lassen (197): 6 Reste für Gruppe A-Proteine, und 8 für Gruppe B-Proteine, zu denen auch *DMBT1* zählt. *DMBT1*-Homologe wurden in Mäusen (CRP-ductin, Muclin), Ratten (Ebenerin), Hasen (Hensin), Rindern (Bovin gallbladder mucin) und in Rhesusaffen (H3) identifiziert. Gemeinsames Merkmal dieser Proteine ist das Vorkommen von SCRC-, CUB- und ZP-Domänen, wobei die Reihenfolge und Anzahl diese Domänen variieren kann (192). CUB-Domänen werden nach 3 Proteinen benannt, in denen sie erstmals entdeckt wurden (*complement subcomponents*, C1s/c1r; *embryonic sea urchin protein*, Uegf; *bone morphologic protein 1*, Bmp1) und kommen in Proteinen vor, die in Entwicklungsprozesse involviert sind (198). Zona-Pellucida-Domänen (ZP) wurden in Spermien-Rezeptoren gefunden, die an der Zona Pellucida der Eizellen andocken (199). Obwohl die Funktionen der ZP-haltigen Proteine sehr vielfältig sind, befinden sich diese ZP-Domänen meistens extrazellulär und spielen eine wichtige Rolle für die extrazelluläre Protein-Oligomerisation (200).

DMBT1 besitzt 14 N-Bindungsregionen und eine Vielzahl potentieller O-Glykosylierungs-Regionen, wobei letzteren vorwiegend in den SIDs zu finden sind. SAG und gp-340 haben

vermutlich ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster, wobei nicht klar ist, ob dieses innerhalb eines Individuums oder zwischen den Individuen variiert. Zusätzlich wurden zeitabhängige Variationen des Glykosylierungsmusters beobachtet, die möglicherweise hormonell reguliert werden (201, 202).

1.4.3 Die Rolle von *DMBT1* in der angeborenen Immunabwehr

1.4.3.1 *DMBT1* kodiert einen *Pattern Recognition Receptor*

Durch ihre 13 SRCR-Domänen, sind SAG und gp-340 in der Lage, ein breites Spektrum von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zu binden. Für SAG wurde bereits die antikariogene Wirkung durch die Agglutinierung des Keims *S. mutans* erwähnt. Jenkinson und Demuth konnten diese Funktion auf die Calcium-abhängige Bindung von SAG an das Antigen I/II (eine Polypeptidgruppe von Oberflächenrezeptoren von Streptokokken, auch Antigen B genannt) zurückführen (203). Ferner konnte beobachtet werden, dass andere Bakterien wie *Helicobacter pylori* und *Staphylococcus aureus*, die das Antigen I/II nicht besitzen, auch von SAG erkannt und gebunden werden (204-206). Für gp-340 ist ebenfalls eine SP-D-abhängige und SP-D-unabhängige Bindung an Gram-positive und Gram-negative Bakterien beschrieben worden (205). Basierend auf der Vorstellung, dass Bakterien primär Kohlenhydrate auf Schleimhautoberflächen erkennen, wurde für *DMBT1* initial auch Kohlenhydratketten für diese Bindung vermutet. Diese Hypothese wurde zum einen dadurch unterstützt, dass die SAG-vermittelte *S. mutans*-Agglutination durch eine hohe Konzentration an Fucose und Lactose verhindert werden konnte. Zum anderen konnten andere Studien eine Rolle von N-Acetylneuraminsäuren in dieser Bindung beweisen (207, 208). Dieser Vermutung steht entgegen, dass eine chemische Modifizierung der Kohlenhydratkette des SAG keine Beeinträchtigung der Liganden-Bindung verursacht, dafür aber diese Bindung durch eine Veränderung der Polypeptidkette komplett aufgehoben werden kann (208, 209). Im Einklang mit dieser Erkenntnis konnten Bikker et al. das Bakterienerkennungsmotiv als eine Polypeptidkette aus 11 Aminosäuren identifizieren; (GRVEVLYRGSW). Innerhalb dieser Polypeptidkette spielen die unterstrichenen Aminosäuren eine essentielle Rolle für die Bakterienbindung. Diese Sequenz repräsentiert eine Schleife innerhalb der SRCR-Domäne und ist zu 87-100% homolog in allen 14 SRCR-Domänen (210).

Es konnte ebenfalls bewiesen werden, dass SAG/*DMBT1*/gp-340 Interaktionen mit HIV-1 und Influenza A-Viren einhergehen (211, 212).

Als Mitglied der SRCR-Superfamilie mit breitem Bakterienbindungs-Spektrum gehört *DMBT1* zur großen Gruppe der PRRs. Ligand der PRRs sind hochkonservierte Strukturen der Bakterienzellwand oder der bakteriellen DNA, die für das bakterielle Überleben essentiell

sind. PRRs kommen entweder in membranständiger Form, intrazellulär, als gelöste Form in Körperflüssigkeiten oder an Schleimhautoberflächen vor (95). Diese Eigenschaften treffen auf DMBT1 zu, wodurch dieses Protein eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität insbesondere auf Schleimhautoberflächen hat. Zusätzlich stimuliert gp-340 die Migration alveolärer Makrophagen (192, 213, 214).

1.4.3.2 Interaktion von DMBT1 mit endogenen Proteinen

Neben der Bindung an exogene Liganden besitzt DMBT1 auch die Fähigkeit, körpereigene Proteine zu binden, wodurch antientzündliche Prozesse eingeleitet werden können (192). Beispielsweise resultiert aus der Bindung von SAG an IgA eine verstärkte Bakterien-Aggregation. Ferner aktiviert die Bindung an den C1q-Faktor des Komplementsystems die Entzündungskaskade über den klassischen Weg (215, 216). Bemerkenswert ist ebenfalls die Bindung an SP-D und SP-A und die dadurch bedingte virale Neutralisation, das Abtöten von Pilzen und Bakterien und die Beseitigung von apoptotischen und nekrotischen Zellbestandteilen (187, 213). Außerdem bindet DMBT1 an humanes und tierisches Laktoferrin. Laktoferrin spielt eine Rolle in der angeborenen Abwehr, indem es freies Eisen sequestriert und somit das Bakterienwachstum hemmt. (217, 218). Ferner interagiert DMBT1 mit MUC5, ein Bestandteil des Schleimfilms, der eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion des Schleims ausübt (219).

1.4.4 Rolle von *DMBT1* bei Regenerierungs-, Differenzierungs- und Tumorsuppressionsprozessen

Eine Vielzahl von Studien deutet daraufhin, dass *DMBT1* neben seiner Rolle im Immunsystem auch an Regenerations-, Differenzierungs- und Tumorsuppressionsprozessen beteiligt ist. Evidenz hierfür liefern folgende Beobachtungen: zum einen konnte für das Hasen-*DMBT1* Hensin gezeigt werden, dass das Protein vermutlich durch eine Änderung der Zellpolarität in der extrazellulären Matrix (EZM) sezerniert wird und die Differenzierung von Epithel- und Stammzellen triggert (220). Ferner zeigen *DMBT1*-defiziente Mäuse eine frühe embryonale Letalität durch gravierende Entwicklungsschäden (221). Zum anderen wurde eine Hochregulierung des Eberins in Leberstammzellen als Antwort auf eine Schädigung verzeichnet (222). Bei Mäusen wurde eine bevorzugte Expression des *CRP*-Ductin in Darmkrypten beschrieben, wo sich der Stammzellpool befindet (223, 224). Außerdem zeigen Tumorzellen aus unterschiedlichen Geweben ein niedrigeres *DMBT1*-Expressionsniveau verglichen mit den angrenzenden gesunden Zellen (192). Obwohl verschiedene Tumoren mit

einer Deletion im *DMBT1*-Gen assoziiert wurden, bleiben die ursächlichen Mechanismen unklar. Tatsache ist aber, dass die genomischen Alterationen des *DMBT1*-Gens untypisch für ein klassisches Tumorsuppressorgen sind, da sie nicht in einer biallelischen Inaktivierung mit kompletter Aufhebung der Protein-Expression resultieren. Basis für die genetische Variabilität in Tumoren bieten wahrscheinlich die SRCR/SiDs-Regionen, die ein Multi-Allel-System definieren (188). Neben einer möglichen Rolle von *DMBT1* als „Tumor-Überwacher“, z.B. durch die Aktivierung von Gewebsmakrophagen, könnte eine Störung der Zelldifferenzierung zur Tumorgenese beitragen. Übereinstimmend mit letzterer Hypothese weisen Tumoren mit erhaltener *DMBT1*-Expression während der Tumorgenese einen differenzierteren Phänotyp auf. Dies steht im Gegensatz zu Tumoren mit stattgehabtem *DMBT1*-Verlust, welche undifferenziertere Zellen beinhalten (185, 223).

1.4.5 Rolle des *DMBT1*-Gens bei der CED-Pathogenese

Eine Vielzahl von Studien zur Assoziation des *NOD2*-Gens und des humanen β -Defensin 2-Gens (*HBD2*) mit CED unterstützen die Schlüsselrolle der angeborenen Immunabwehr in der Pathogenese dieser Erkrankung (92, 225). Wegen seiner Bindungseigenschaften an ein breites Spektrum von Bakterienspezies und seiner hauptsächlichen Expression in intestinalen Epithelzellen ist eine Rolle von *DMBT1* bei der CED-Pathogenese wahrscheinlich.

1.4.5.1 Einfluß von *DMBT1* auf die Schleimhaut-Homöostase

Die Parallele zwischen die Rolle des *NOD2*-Proteins als Bakterienerkennungsmolekül für die Erhaltung der Schleimhautintegrität und die oben erläuterte Funktionen des *DMBT1*-Proteins hat die Arbeitsgruppen von P. Rosenstiel und M. Renner veranlasst, die Regulation und die Funktion des *DMBT1*-Gens in intestinalen Epithelzellen näher zu untersuchen (226, 227). Immunhistochemische Untersuchungen von Schleimhautbiopsien von M. Crohn- und C. ulcerosa-Patienten zeigten in den entzündeten Bereichen eine stark hochregulierte Expression von *DMBT1* in der gesamten Epitheloberfläche verglichen mit Schleimhautbiopsien gesunder Kontrollen. Zusätzlich korrelierte die Höhe der *DMBT1*-Expression in beiden Studien positiv mit dem Grad der Krankheitsaktivität (226, 227). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die *DMBT1*-Expression nach Stimulation mit proinflammatorischen Faktoren hochreguliert wird. Dies sagt jedoch nicht aus, ob *DMBT1* Teil einer proinflammatorischer Antwort ist oder im Gegenteil als antiinflammatorischer Faktor einer Entzündung entgegensteuert. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass

DMBT1 selbst die LPS-vermittelte TLR4-Aktivierung inhibieren kann. Somit scheint *DMBT1* Teil einer autoregulatorischen Rückkoppelungsschleife zu sein, die zum Ziel hat, durch Bakterienabwehr und antientzündliche Eigenschaften die mukosale Homöostase aufrechtzuerhalten. In beiden Studien zeigten Tierexperimente, dass *DMBT1*-defiziente Mäuse, bei denen eine Kolitis durch *dextran sodium sulfate* (DSS) induziert wurde, im Vergleich zu Wildtyp-*DMBT1*-Mäusen schwerer erkrankten. Diese zeigten nach Behandlung mit DSS eine Hochregulierung der *DMBT1*-Expression. Rosenstiel et al. fanden heraus, dass bei homozygoten Trägern der mit M. Crohn assoziierten *NOD2*-L1007fsinsC-Mutation, im Vergleich zu *NOD2*-Wildtyp-Patienten, eine deutlich reduzierte *DMBT1*-Expression in den Epithelzellen zu messen war (227). Diese Beobachtung konnte somit die Frage aufwerfen, ob die *DMBT1*-Hochregulation bei CED-Patienten Folge einer Dysregulierung im *NOD2*-Signalweg darstellt oder im Gegenteil als ein Versuch bewertet werden sollte, die gestörte Schleimhautintegrität bei CED-Patienten wiederherzustellen. Um bestimmen zu können, ob *DMBT1* als Zielgen des gestörten *NOD2*-Signalweges oder allein durch Mutationen eine Rolle bei der CED-Entstehung spielt, ist es wichtig, Polymorphismen im *DMBT1*-Gen zu untersuchen.

1.4.5.2 Assoziation eines *Copy Number Polymorphismus* mit M. Crohn

Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe von Renner einen Deletionspolymorphismus im *DMBT1*-Gen signifikant mit M. Crohn assoziieren (OR= 1,75; 95% CI [1,27-2,41]), wobei diese in 22% der Erkrankten und 14% der Kontrollen beobachtet wurde (226). Allerdings zeigte sich die Deletion bei *C. ulcerosa*-Patienten nur in 16% der Fälle und erreichte somit keinen Signifikanzwert. Das durch diese Deletion verkürzte Allel, SR47-Allel genannt, besitzt im Vergleich zum längsten *DMBT1*-Allel SR47+ nur noch 5 von 13 SRCR Regionen. Alle diese Ergebnisse liefern wertvolle Hinweise für die Rolle des *DMBT1*-Gens bei der CED-Pathogenese. Erstens erscheint es in Anbetracht der *DMBT1*-Hochregulierung in *DMBT1* Wildtyp-Mäusen nach DSS-induzierter Kolitis und der Hochregulierung in entzündeten Epithelzellen von CED-Patienten denkbar, dass die Induktion von *DMBT1* eine schützende Reaktion der Schleimhaut auf einen Entzündungsreiz darstellt. Zweitens wäre eine reduzierte Anzahl von SRCR-Regionen durch den Verlust von Bakterienbindungsdomänen eher mit einer quantitativen als qualitativen Funktionsänderung zu vereinbaren. Dies würde in einem reduzierten Schutz der Schleimhaut gegen Pathogene oder Kommensale resultieren.

In der Arbeitsgruppe um Renner wurden zusätzlich 3 flankierende SNPs (SNP-93; SNP54, SNP2348) untersucht, die keine Assoziation mit CED zeigten. Eine Haplotypkonstellation

aus SNP93 und SNP54 wurde allerdings mit einer Suszeptibilität für *C. ulcerosa* signifikant assoziiert (226).

Durch seine Funktionen als PRR in der angeborenen Immunabwehr und bei der Zelldifferenzierung sowie durch die vorbeschriebene signifikante Assoziation einer Deletionsmutation mit M. Crohn stellt *DMBT1* ein potentiell funktionelles Kandidatengen für die Erforschung der CED-Pathophysiologie dar. Durch das häufige Vorkommen des intragenischen *copy number polymorphismus* in der Normalpopulation ist eine präzise Untersuchung der *DMBT1*-Genvarianten in einem großen CED-Patienten-Kollektiv notwendig, um das Vorliegen von Assoziationen mit CED zu untersuchen. Dies stellt das wesentliche Untersuchungsziel dieser Arbeit dar.

2 Zielsetzung der Arbeit

CED haben in den letzten Jahren durch die wachsende Inzidenz an Bedeutung zugenommen. Die Ätiologie der CED ist bisher nicht geklärt, jedoch ist eine multifaktorielle Genese anzunehmen. Genetische Faktoren scheinen dabei eine zentrale Rolle zu spielen. *NOD2*-, *IL23-R*- und *ATG16L1* sind Beispiele für Gene die mit *C. ulcerosa* assoziiert wurden (131, 132, 157, 169, 228). *DMBT1* kodiert wie *NOD2* ein Bakterienerkennungsmolekül und scheint eine Rolle bei der epithelialen Differenzierung zu spielen, so dass Mutationen in diesem Gen möglicherweise mit der CED-Entstehung assoziiert sein könnten. Bisher konnte eine Arbeitsgruppe (Renner et al. (226)), einen Deletionspolymorphismus im *DMBT1*-Gen mit einer erhöhten Suszeptibilität für M. Crohn assoziieren. Weitere drei von Renner untersuchte *DMBT1*-SNPs zeigten keine Assoziationen, jedoch wurde ein Haplotypblock aus zwei *DMBT1*-SNPs signifikant mit *C. ulcerosa* assoziiert.

Ziel unserer Arbeit war es, die Rolle des *DMBT1*-Gens als Suszeptibilitäts-gen für CED in einer größeren deutschen Studienpopulation bestehend aus 824 Patienten mit M. Crohn, 283 Patienten mit *C. ulcerosa* und 981 Kontrollindividuen zu untersuchen. Dabei sollten die folgenden vier Ziele untersucht werden:

1. **Untersuchung von genetischen Polymorphismen im *DMBT1*-Gen:** In diesem Arbeitsschritt haben wir die von Renner et al. untersuchten drei SNPs in einer unabhängigen Replikationsstudie überprüft (SNPs rs2981745 (SNP-93), rs3013236 (SNP54) und rs1052715 (SNP2348) (226). Zusätzlich wurden weitere vier Polymorphismen untersucht, welche unter Berücksichtigung der im internationalen HapMap-Projekt ermittelten Haplotypblöcke ausgewählt wurden (rs2981778, rs11523871=Thr42Pro, rs2981804 und rs2277244=p.His585Thr). Es war uns somit möglich, die gesamte Haplotypblockorganisation des Gens abzudecken. Dazu wurden diese sieben SNPs von *DMBT1* mittels *real-time* PCR (RT-PCR) mit anschließender Schmelzkurvenanalyse genotypisiert. Mittels statistischer Verfahren wurden anschließend die Allel- und Genotypfrequenzen zwischen beiden Patientengruppen und der Kontrollkohorte verglichen.
2. **Untersuchung der Haplotypfrequenzen und des Kopplungsungleichgewichtes für die sieben ausgesuchten Polymorphismen im *DMBT1*-Gen**
3. **Untersuchung der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für alle sieben Polymorphismen des *DMBT1*-Gens.** Für diesen Arbeitsschritt war bereits eine umfangreiche Genotypisierungs- und Phänotypisierungsdatenbank verfügbar, welche für diese Analysen entsprechend erweitert wurde.

-
4. **Untersuchung von Interaktionen zwischen dem *DMBT1*-Gen und weiteren Suszeptibilitätsgenen für CED.** Im folgenden Arbeitsschritt wurden die einzelnen SNPs auf Interaktionen mit bereits in früheren Studien untersuchten und mit CED signifikant assoziierten Gen-Polymorphismen von *NOD2*, *IL23R* und *IL27* hin untersucht. Es wird angenommen, dass diese drei Gene einen Einfluss auf die *DMBT1*-Expression besitzen und möglicherweise *DMBT1* zum Zielgen haben (115, 227). Im Einzelnen sind dies SNPs rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026=p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032 und rs1495965 im *IL23R*-Gen, die SNPs rs2066844=p.Arg702Trp rs2066845=p.Gly908Arg und rs2066847=p.Leu100fsX1008 im *NOD2*-Gen und SNP rs151181 im *IL27* Gen. Die notwendigen Daten waren aus verfügbare Vorstudien erhältlich (122, 169, 225)

3 Material

3.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation umfasst insgesamt 2088 Individuen, wobei 824 M. Crohn-, 283 C. ulcerosa-Patienten und 981 gesunde Kontrollindividuen eingeschlossen wurden. Die Patienten stammen aus dem Münchner Universitätszentrum für chronische entzündliche Darmerkrankung im Klinikum Großhadern und Klinikum-Innenstadt. Einschlusskriterium war die eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Erkrankungen anhand klinischer, radiologischer und endoskopischer Kriterien der Montreal-Klassifikation (14).

Patienten mit einem unklaren Krankheitsbild wurden von der Studie ausgeschlossen. Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie waren schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten und eine ausführliche Aufklärung über Abläufe und Ziele dieser Studie. Die Studienpopulation stammt aus Deutschland, so dass ethnische Variationen minimiert werden konnten. Die Kontrollgruppe umfasst gesunde, nicht-verwandte Blutspender, welche unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht den Patientengruppen angepasst wurden. Die demographischen Daten wurden mittels Fragebogen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses erhoben. Diese Daten wurden ohne Vorkenntnisse der Genotypen ermittelt. Die demographischen Daten werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

Die Durchführung dieser Studie wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt und stimmte mit den Prinzipien für medizinisch-klinische Forschungen nach der Helsinki-Deklaration überein (229).

	M. Crohn (n= 824)	C. ulcerosa (n= 283)	Kontrollen (n= 981)
männlich	46.0	53.0	63.8
weiblich	54.0	47.0	36.2
Alter	40.7 ±13.3 (15-81)	43.8 ±14.8 (17-88)	46.0 ±10.3 (19-68)
Body mass index	23.0 ± 4.2 (13-41)	23.9 ± 4.5 (15-54)	
Alter bei Diagnose	27.9 ±12.0 (6;78)	31.3 ±13.7 (4-81)	
Dauer der Erkrankung	13.1 ± 8.8 (0-46)	11.9 ± 8.43 (1-50)	
Positive Familienanamnese für CED	16.6 %	17.4 %	

Tabelle 5: Demographische Daten der Studienpopulation

Anm.: Altersangaben in Jahren mit Standardabweichung, Minimum und Maximum

3.2 Material für molekularbiologische Experimente

3.2.1 Material für die PCR

3.2.1.1 PCR-Material, PCR-Kits, Sequenzierungs-Kits

Die Tabelle 6 zeigt die verwendeten Materialien zur Durchführung der PCRs.

QIAGEN, HotStarTaq® DNA Polymerase 1000 units	Qiagen, Hilden
Coral Load PCR Buffer, 10x, containing 15 mM MgCl ₂	Qiagen, Hilden
HotStarTaq® Plus, DNA Polymerase, 5 units/µl	Qiagen, Hilden
MgCl ₂ 25mM	Qiagen, Hilden
SIGMA, Deoxynucleotide Mix, 10mM	SIGMA, Steinheim
QIAGEN, QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden
Buffer PBI, Binding buffer	Qiagen, Hilden
Buffer PE, Wash buffer (55ml Buffer + 220 ml Ethanol)	Qiagen, Hilden
Buffer EB, Elution buffer	Qiagen, Hilden
QIAquick® Spin Columns	Qiagen, Hilden
Polymerase Mix, Light Cycler®480 Genotyping Master 5x konzentriert	Roche, Mannheim

Tabelle 6: PCR-Reagenzen und Hersteller

3.2.1.2 Verwendete Primer für die Durchführung der Sequenzierung

Alle Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) geliefert. (F): Vorwärtsprimer, aus dem englischem *forward-Primer*. (R): Rückwärtsprimer, aus dem englischem *reverse-primer*. Die folgende Tabelle 7 gibt die Primer-Sequenzen der sieben Einzelnukleotidpolymorphismen wider, die zur Durchführung der Sequenzierung verwendet wurden.

Polymorphismus	Primer-Sequenzen
rs2981745	ATTTCAAGGATGACTGTGGAGAT (F) TTTCCACATATTAGCCATCGAC (R)
rs2981778	CCCTTGACTTGCATCCCTAC (F) GGTCTTCTGGAAAGTTCTCAGAGTAC (R)
rs11523871	GCTGAGGAAGCCAGGGAC (F) GAATGCCAGAGTTGCTAGAAGTATG (R)
rs3013236	AGGTTGCCCTTAGGATCTGTGTTT (F) CCAGCACCCCTACCTTCTATGCC (R)
rs2981804	TGATGCCCATGAGCTGAA (F) AGCTGTGCTCATCCGTG (R)
rs2277244	GGGTTGTTTGAGTTTGGTC (U) GTCCTGGATGATGTGCG (B)
rs1052715	AACTGAGTCATGAAGGAAGAATC (F) GGTCATACGCTCTGCACA (R)

Tabelle 7: Primer-Sequenzen für die Sequenzierung

3.2.2 Material für die RT-PCR

3.2.2.1 RT-PCR-Material und RT-PCR-Kits

Für die Durchführung der RT-PCR wurden folgende Materialien verwendet:

Polymerase Mix, Light Cycler®480 Genotyping Master 5x konzentriert	Roche, Mannheim
LightCycler480, Color compensation Kit	Roche, Mannheim

Tabelle 8: RT-PCR-Materialien

3.2.2.2 Verwendete Primer und FRET-Sonden für die RT-PCR

Alle Primer und Sonden stammen von der Firma TIB Molbiol (Berlin). Die Tabelle 9 zeigt die verwendeten Primer-Sequenzen und FRET-Proben-Sequenzen, die zur Durchführung der Genotypisierung verwendet wurden.

SNP	Primer Sequenz	FRET-Proben Sequenzen
rs2981745	F: CAATTGAATAGAAAATCCTGGACATT R: TTTCCACATATTAGCCATCGAC	CAGCAG <u>C</u> AGAAATATACCACCC-FL LC610-AGAGGACACACCTCCTTTTAGCTAGGTACC
rs2981778	F: CCCTTGACTTGCATCCCTAC R: GGTTCTCCAGGGGAA	GGATCTTAAGTATCCCTGTTCTTCC-FL LC610-TGTTCTCTCTTTGCCCTCTTCTCATTCT
rs11523871	F: CAATGAGCTCTTCCTTTCCAC R: GAATGCCAGAGTTGCTAGAAGTATG	CTTCTGCTACAGTTG <u>T</u> ATCCAAGG-FL LC640-CACCTCCGAGGGAATCAGTGAAG
rs3013236	F: CCCAAACAAGGGCTACCATCAAT R: CCAGCACCTACCTTCTATGCC	LC640-GGGTC <u>A</u> ACTCCGAGGGAA AGACGTTACCTTCTGCTACAGTTGACTCC-FL
rs2981804	F: TGATGCCCATGAGCTGAA R: AGCTGTGCTCATCCGTG	LC670-GTCCTAGCAATTTGG <u>C</u> TACGTTA AGGGCAAGGGCAAGGATGC-FL
rs2277244	F: TGAGTGAGGAGATCAGAATGTAA R: ACACCAATGATGCCAATG	CAGCGTCTTCACTAT <u>A</u> GCCAC-FL LC640-GTTGTGGGAGAGCCAGCCA
rs1052715	F: GGCTACTGTTCTCTCCAGA R: CATTTTACAACGCAGGTACA	ATGCGAAGAGAC <u>G</u> GGCGAG-FL LC670-AGTAGGGTCCGTAGGTGTCATCCCTCA

Tabelle 9: Primer-Sequenzen und FRET-Proben-Sequenzen für die Genotypisierung

Anm.: F: Vorwärts-Primer; R: Rückwärts-Primer; FL: Fluorescein; LC610: LightCycler-Red 610; LC640: LightCycler-Red 640. Die polymorphe Sequenz in der Sensor-Sonde ist unterstrichen. Die Akzeptor-Sonde wird mit einem Phosphat am 3'-Ende gekoppelt, um eine ungewollte Verlängerung durch die DNA-Polymerase zu verhindern.

3.2.3 Material für die Gelelektrophorese

Tabelle 10 zeigt die verwendeten Materialien zur Durchführung der Gelelektrophorese.

LE-Agarose	Biozym, Wien, Österreich
TBE-Puffer	Apotheke Innenstadt, LMU München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Auftragspuffer	Apotheke Innenstadt, LMU München
DNA-Leiter 100bp	Lonza

Tabelle 10: Materialien für die Gelelektrophorese

3.3 Verbrauchsmaterial und Geräte

Tabellen 11 und 12 listen die verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie die benötigten Geräten auf.

Light Cycler®480 Multiwell Plate 384	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 Multiwell Plate 96	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 Sealing Foil	Roche, Mannheim
Versiegelungsfolie Microseal B	Biozym, Wien, Österreich
Handschuhe, Naturkautschuklatex	Meditrade, Kiefersfelden
Handschuhe Vinyl 2000	Meditrade, Kiefersfelden
Handschuhe Nitril	Semperit, Wien, Österreich
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
Pipettenspitzen (12,5µl)	Matrix, Thermo Scientific, New Hampshire, USA
Reaktionsgefäße 1,6ml, 2,0ml	Biozym, Oldendorf
Steriles Wasser für Injektionszwecke 50ml	Delta Select, Pfullingen
LightCycler® 480, H ₂ O, PCR grade	Roche, Mannheim

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

Light Cycler®480 Instrument 384	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 Block Kit 384	Roche, Mannheim
Pipettierroboter Freedom EVO	Tecan, Männedorf, Schweiz
ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop, Wilmington, USA
Allegra™25R Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Microfuge®18 Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Schüttler Vortex	Thermo Electron Corporation
Sterilbank LaminAir	Holten, Allerød, Dänemark
Pipetten (2,5, 10, 20, 100,200, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Biohit, Köln
8-fach Pipette (12,5 µl)	Matrix, Thermo Scientific, New Hampshire, USA
PCR-Gerät	MJ Research
Gelelektrophoresekammer Sub Cell GT	Biorad, München
Elektrophoresegerät Power Pac	Biorad, München
Feinwaage	ADAM, UK
Variomag Elektronikrührer	Monotherm, Neolab, Heidelberg
Videodokumentationssystem Infinity 3000	Vilber Lourmat
Eismaschine	Thermo Electron Corporation
Abzugskammer	Waldner, Wangen
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Brutschrank 37°C	Thermo Electron Corporation

Tabelle 12: Geräte

3.4 Verwendete Computer-Programme

Folgende Tabelle zeigt den verwendeten Computer-Programmen.

Nano Drop, Photometer	Nano Drop, Wilmington, USA
Light Cycler®480 Basic Software	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 1,5 version Genotyping Software	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 Quantification Software	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 LIMS/Bar-Code Module	Roche, Mannheim
Freedom EVOware, Pipettierroboter	Tecan, Männedorf, Schweiz
PCR-Programm Dyad und Tetrad	Peltier Thermal Cyclers 2003
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond
Microsoft Word	Microsoft, Redmond

Tabelle 13: Computer-Programme

4 Methode

4.1 Übersicht über die Arbeitsschritte

Ziel dieser Arbeit war es, insgesamt sieben *DMBT1*-SNPs bei M. Crohn- und C. ulcerosa-Patienten und bei gesunden Individuen zu genotypisieren und deren Genotypfrequenzen mittels statistischer Verfahren miteinander zu vergleichen. Erster Arbeitsschritt bestand darin, für die jeweiligen *DMBT1*-SNPs das richtige Primerpaar zu bestimmen. Anschließend erfolgte die eigentliche Genotypisierung mittels RT-PCR mit anschließenden Schmelzkurvenanalysen. Diese wurde in dem LightCycler480 von Roche durchgeführt und benötigte für jeden SNP den Einsatz so genannte FRET-Sonden, um bei jeder DNA-Probe den Genotyp der sieben *DMBT1*-SNPs festzustellen. Um die eigenen Ergebnisse zu validieren, erfolgte für jeden SNP eine zusätzliche Sequenzierung der drei möglichen Genotypen. Die Vorarbeit hierfür erfolgte im eigenen Labor, die eigentliche Sequenzierung nach Sanger wurde durch ein externes Labor übernommen.

4.2 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte aus peripheren Leukozyten nach venöser Blutentnahme der Studienpopulation. Die Isolierung wurde mit dem Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerempfehlungen.

4.3 Genotypisierungsmethode: der Light Cycler 480 von Roche

4.3.1 *Real-Time*-PCR: Prinzipien

Die RT-PCR läuft wie bei der PCR in drei Schritten ab (1. Denaturierung, 2. Primerhybridisierung, 3. Elongation) und ermöglicht zusätzlich eine relative oder absolute direkte Quantifizierung der DNA-Produkte. Die Quantifizierung wird mittels Fluoreszenz-Messungen nach jedem Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional zur amplifizierten DANN-Menge zu. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt entweder mit unspezifischen interkalierenden DNA-Farbstoffen oder als fluoreszenz-markierte Oligonukleotide, die sequenzspezifisch an dem DNA-Zielfragment hybridisieren können und somit die Mitamplifizierung ungewollter DNA-Fragmente verhindern.

Die unterschiedlichen Typen von Fluoreszenz-Sonden beruhen auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET). FRET ist ein spektroskopischer Prozess, der die Energieübertragung durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Sonden mit überlappendem Absorptionsspektren beschreibt (230). Dabei wird die strahlungsfreie Energie der Donator-Sonde auf der Akzeptor-Sonde weitergegeben, um dort entweder durch

Minderung der Fluoreszenzinhibition oder durch Zunahme des Resonanzenergie transfers eine Zunahme des Fluoreszenzsignals während der DNA-Amplifizierung zu bewirken. FRET hängt mit der Entfernung der zwei Sonden zusammen: je näher die Sonden an der Zielsequenz aneinander binden, desto stärker wird das FRET-Signal (Optimum: 1-5 Nukleotide).

Einer der wichtigsten Vorteile von Echtzeit-Detektion ist die direkte Quantifizierung des PCR-Produktes ohne anschließende DNA-Gelelektrophorese, so dass eine Kontamination der PCR-Produkte nahezu ausgeschlossen werden kann.

In der vorliegenden Studie wurde mit dem LightCycler®480 Instrument von Roche sowie den mitgelieferten Reagenzien-Sets gearbeitet.

Verwendete RT-PCR-Programme in dieser Arbeit

Die RT-PCR Reaktionen sind ausnahmslos mit dem gleichen Programm gelaufen:

Vorgang	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (Sek.)
Denaturierung	1	95	600
Amplifizierung	45	95 60 72	10 10 15
Schmelzen	1	95 40 95	60 120 15
Kühlen	1	40	∞

Verwendetes Programm für die Schmelzkurvenanalyse

Vorgang	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (Sek.)
Denaturierung	1	95	60
Kühlen	1	40	2
Schmelzen	1	bis 95°C erreicht wird	

Verwendete RT-PCR Protokolle in dieser Arbeit

Das Endvolumen für die RT-PCR betrug 5 µl bestehend aus 2,5 pmol von jedem Primer, 0,75 pmol von jeder FRET-Sonde (TIB MOLBIOL, Berlin), einen LightCycler480® Genotyping- Master (Roche Diagnostics), 25 ng genomischer DNA und destilliertes Wasser. Die Primerkonzentrationen des Vorwärtsprimer für die SNPs rs2981778 und rs2981804 und des Rückwärtsprimer für rs1052715 wurde zweifach reduziert, wodurch sich ein Volumen

von 1,25 µl ergab. Die Primerkonzentration der Rückwärtsprimer für rs2981745, rs3012230 und rs11523871 wurde auf das Fünffache reduziert, wodurch sich ein Endvolumen von 0,5 µl ergab. Durch diese Asymmetrien entstand einen Volumenmangel, der mit destilliertem Wasser ausgeglichen wurde. In dieser Arbeit wurde mit 384-well Platten gearbeitet, so dass 384 DNA-Proben gleichzeitig ausgetestet werden konnten. Hierfür benötigte man einen Mix (insgesamt 1080 µl) der aus Primerpaaren, Sonden, Genotyping Master und destilliertem Wasser bestand.

Mit dem LightCycler®480 ist es möglich, mehrere SNPs, deren Sonden verschiedene Wellenlängen emittieren, gleichzeitig zu genotypisieren. Ein doppelter Ansatz wird als Duplex-Ansatz bezeichnet. Dafür muss zuerst mit dem so genannten *color compensation set* eine Eichung vorgenommen werden, um Wechselwirkungen zwischen den drei Kanälen verschiedener Wellenlänge auszugleichen. In dieser Arbeit wurden folgende Duplex-Ansätze durchgeführt: (rs2981745 + rs11523871), (rs3013236 + rs10523871) und (rs2981778 + rs2981804). Der SNP rs2277244 wurde allein genotypisiert.

4.3.2 Die FRET-Sonden und Primern

Die einfachste Möglichkeit der Nutzung des FRET zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, die auch in dieser Studie verwendet wurde, sind Hybridisierungssonden, auch FRET-Sonden genannt. Hybridisierungssonden binden hochspezifisch an ihre komplementären Sequenzen innerhalb des PCR-Produkts, wodurch ein FRET entsteht. Die resultierende Emissionsfluoreszenz der Akzeptor-Sonde wird je nach verwendetem Format im Kanal des jeweiligen Absorptionsspektrums gemessen. In dieser Studie werden ausschließlich LC Reds mit 610, 640 und 670 nm verwendet. Die Abbildung 12 veranschaulicht die Funktionsmechanismen der Hybridisierungssonden. Für die Übertragung des FRET müssen drei Prinzipien erfüllt werden. Die Sonden dürfen höchstens ca. 1-5 Nukleotide auf der Zielsequenz entfernt liegen, die Absorptionsspektren der Sonden müssen sich überlappen und die Positionierung auf der DNA muss annähernd parallel sein. Nach Vollendung aller PCR-Zyklen kann zur Genotypisierung eine Schmelzkurvenanalyse durch langsame Temperaturerhöhung vorgenommen werden.

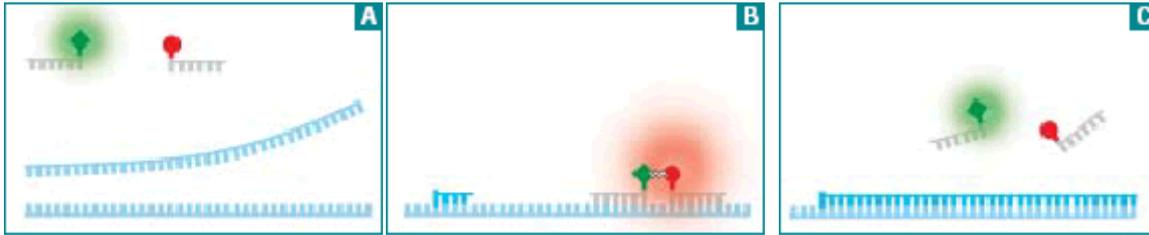


Abbildung 12: Das Prinzip der Hybridisierungssonden. Originalabbildung aus Roche Diagnostics® (231)

Anm: A: Die Donor-Sonde ist mit Fluorescein am 3'-Ende, die Akzeptor-Sonde ist mit dem LightCycler® Red am 5'-Ende markiert. Während der Denaturierung findet keine Hybridisierung an der DNA-Zielssequenz statt, da die Distanz zwischen beiden Sonden zu groß ist, um einen FRET zu generieren. B: Während der Annealing-Phase hybridisieren die Sonden mit der zu amplifizierenden DNA und sind dicht nebeneinander platziert. Durch Erregung des Fluoreszins mit der Blau-Licht emittierenden Diode des LC480 bei einer Wellenlänge von 470 nm, kommt es zur FRET-Übertragung auf der Akzeptor-Sonde. Das LC Red der Akzeptor-Sonde emittiert rotes Licht in einer bestimmten Wellenlänge. Dieses rote Licht wird nach jeder Annealing-Phase gemessen. C: Im Anschluss an die Annealing-Phase wird die Temperatur für die Elongationsphase erhöht, wodurch die Sonden von der DNA-Sequenz dissoziieren. Erneut sind die Sonden weit voneinander entfernt, sodass keinen FRET stattfinden kann.

Auswahl von Primern für die Analyse des DMBT1-Gens

Für jeden SNP standen jeweils zwei Vorwärts- und zwei Rückwärtsprimer zur Auswahl und jeweils nur ein Sondenpaar. Die Primerpaare wurden entsprechend dem Ergebnis im LightCycler®480 und in der Gelelektrophorese ausgesucht. Bei der Durchführung so genannter Asymmetrien werden durch Konzentrationserniedrigung des Vorwärts- oder des Rückwärtsprimers die Effizienz der PCR-Reaktion optimiert. Dies geschieht, indem die Synthese des Stranges an den die Sonden binden, bevorzugt wird.

Optimierungsstrategien bei der Herstellung von Primer und Sonde

Es gibt folgende Optimierungsstrategien bei der Primer- und Sondenherstellung:

1. Primerpaare dürfen keine zueinander komplementären Sequenzen enthalten und dürfen nicht in der variablen Sequenz binden, da dort die Hybridisierungssonden zur Mutationsanalyse binden müssen. Um die Effektivität der PCR-Reaktion nicht zu beeinträchtigen, müssen die ausgesuchten Primerpaare ähnliche T_m -Werte (s. unten) besitzen.
2. Die Funktion der Sensor-Sonde ist die Erkennung der Mutation. Die Natur der Fehlpaarung zwischen der Sensor-Sonde und der Einzelbasenmutation legt den T_m -Wert der Schmelzkurve fest und ist somit entscheidend für eine sensitive Erkennung der Mutation. Bei dem als T_m bezeichneten Zeitpunkt liegen beim Aufschmelzen der DNA 50% der DNA in Einzelsträngen vor. Die instabilste Basenpaarung führt zu dem deutlichsten T_m -Wert-Unterschied zwischen Sensor- und Anker-Sonde und erhöht somit die Sensibilität der Mutationserkennung. Ob die Sensor-Sonde nun am Wildtyp-Strang oder am mutierten

Strang, am kodierenden oder am komplementären Strang bindet, ist abhängig von der Basenpaarung und muss also so gewählt werden, dass die instabilste Paarung zustande kommt.

4.3.3 Schmelzkurventechnologie: die Mutationsanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht eine Genotypisierung genetischer Varianten mittels FRET-Sonden. Die Schmelzkurvenanalyse kann nach Vollendung aller PCR-Zyklen durchgeführt werden, da die Sonden durch hintereinander folgenden Hybridisierungs- und Dissoziationszyklen nicht geschädigt werden. Durch Erhitzen der DNA werden Doppelstränge zu Einzelsträngen geschmolzen. Eine kontinuierliche Messung des Fluoreszenzsignals bei langsamer Temperaturerhöhung ergibt eine Schmelzkurve. Das erreichte Temperaturmaximum der erhaltenen Schmelzkurve ergibt durch die unterschiedlichen Schmelzeigenschaften der Basenpaare einen direkten Rückschluss auf die Nukleotidabfolge der DNA-Zielsequenz.

Die SNPs werden je nach Basenaustausch in vier verschiedene Klassen unterteilt. Diese Klassifizierung ist sinnvoll, da jede SNP-Klasse von I-IV einen unterschiedlichen T_m -Wert aufweist, was sich durch einen Unterschied in der Stabilität der Basenpaarung erklären lässt. Dieser unterschiedliche T_m -Wert wirkt sich bei der Schmelzkurvenanalyse in der Spezifität der Genotypen-Zuordnung aus, so dass Basenpaare mit einem höheren T_m -Wert leichter identifiziert werden als die mit einem niedrigeren T_m -Wert. T_m wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, hauptsächlich durch den Homologie-Grad des Hybridkomplexes „Sonden-Zielsequenz“, aber auch durch die Anzahl von GC-Nukleotidbindungen und durch die Länge des zu amplifizierenden DNA-Segments, ferner noch durch die Ionenkonzentration. Dies erklärt sich durch die unterschiedliche Stabilität der Basenpaarung. Somit steigt z.B. der Schmelzpunkt der DNA, wenn mehr GC- als AT-Basenpaarungen vorhanden sind, da mehr Energie angewendet werden muss, um GC-Bindungen aufzutrennen.

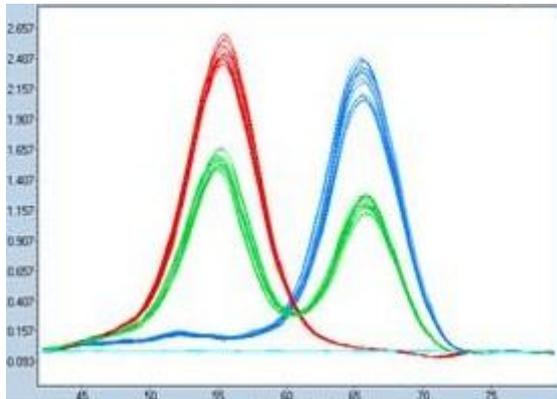
Stabilität der Basenpaarungen

$G:C > A:T > G:G > G:T = G:A > T:T = A:A > T:C > A:C > C:C$

Aus dieser Aufzeichnung lässt sich somit ablesen, dass eine GC-Basenpaarung stabiler als eine AT-Basenpaarung ist. Alle anderen hier aufgezeichnete Basenpaarungen (GG, GT, GA, TT, AA, TC, AC, CC) sind Fehlpaarungen und somit hitzelabiler als die GC- und AT-Paarungen.

Nach dem Annealing der Sonden erfolgt die Dissoziation durch die steigende Temperaturerhöhung in Abhängigkeit von der Sequenzhomologie. Somit verringert sich das

Fluoreszenzsignal. Einzelbasenmutationen in der Zielsequenz, wie die untersuchten SNPs, führen zur thermischen Destabilisierung des Hybrid-Komplexes Sonden-Zielsequenz. Mutationen in den Zielsequenzen führen somit zu abweichenden T_m -Werten. Diese Abweichung wird als Schmelzkurve mit unterschiedlichen Temperaturmaxima registriert und liefert somit die vorliegenden Genotypen, siehe Abbildung 13.



*Anm: Die x-Achse gibt die Temperatur in °C wider. Die y-Achse gibt die Fluroszenzintensität (-dF/dT) in %/°C wider.
Rote Kurve: Homozygoter Genotyp-Wildtyp.
Blaue Kurve: Homozygoter Genotyp-Mutation.
Grüne Kurve: Heterozygoter Genotyp*

Abbildung 13: Beispiel für eine Darstellung der Schmelzkurven-Maxima mit dem LightCycler®480 von Roche. Originalabbildung von Roche Diagnostics® (231).

Der Donor-Sonde oder der Akzeptor-Sonde wird je nach Konstellation der Name Anker-Sonde oder Sensor-Sonde gegeben, je nachdem welche Funktion sie besitzt:

Die Anker-Sonde ist zu 100% homolog zum Wild-Typ-Allel und bindet an ihm. Die als Sensor benannte Sonde ist zwar auch 100% homolog zum Wild-Typ-Allel, hybridisiert aber mit dem mutierten Strang. Im Falle eines SNP resultiert dies in einer um eine Basenpaarung nicht komplementären Bindung. Sowohl die Donor-Sonde als auch die Akzeptor-Sonden können die Sensor-Funktion übernehmen. Bei der Schmelzkurvenanalyse handelt es sich ausschließlich um die Registrierung des Schmelzverhaltens der Sensor-Sonde. Dafür muss die Sensor-Sonde bestimmte Eigenschaften besitzen: Der T_m -Wert der Sensor-Sonde sowie die Sequenzlänge und der GC-Gehalt müssen niedriger sein als bei der Anker-Sonde. Bindet die Sensor-Sonde an den mutierten Einzelstrang, so wird bei der Schmelzkurvenanalyse die Sonde bei einem niedrigeren T_m -Wert von der mutierten Zielsequenz dissoziieren, da die Bindung infolge einer Fehlpaarung thermisch labiler wird. Das Fluoreszenz-Signal nimmt ab. Dementsprechend wird die Sensor-Sonde, die am Wildtypstrang gebunden hat (sprich am nicht-mutiertem Strang), einen höheren T_m -Wert haben und somit einen höheren Temperaturübergang aufweisen.

4.3.4 Fertigstellung der 384er Platten

Auf eine LightCycler® Multiwell Platte werden 384 verschiedene DNAs mit dem zuvor hergestellten Mix aus Primerpaar, Sonden, Genotyping-Master-Mix und sterilem Wasser vermischt. Dieser Schritt wird mit Hilfe des Pipettierroboters Freedom EVOware durchgeführt. Dieser Roboter pipettiert innerhalb von 20 Minuten den Mix der Reihe nach in die 384 well-Platte und setzt in einer festgelegten Reihenfolge die DNAs hinzu. Der Roboter pipettiert dabei 4,5 µl Mix und fügt 0,5 µl DNA hinzu.

4.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um eine einheitliche DNA-Konzentration zur Genotypisierung zu haben, wurde eine photometrische Messung der DNA-Konzentration vorgenommen. Dabei wird bei einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 230 nm die Extinktion der Lösung gemessen. Daraus wird nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz die DNA-Konzentration der Lösung errechnet. Als Maß für die Reinheit der DNA diente der bei 260 und 280 nm gemessene optische Quotient (232).

4.5 Durchführung der Gelelektrophoresen

Das Durchführen einer DNA-Gelelektrophorese wurde sowohl bei der Etablierung der Genotypisierungsansätze als auch bei der Sequenzierung der sieben SNPs eingesetzt. Die Gelelektrophorese ermöglicht es zum einen zu kontrollieren, ob die amplifizierenden DNA-Stücke die gewünschte Länge besitzen und somit die gewollte Sequenz darstellen, zum anderen wird sichtbar gemacht, ob eine PCR-Reaktion spezifisch abgelaufen ist oder ob unspezifische Sequenzen durch Kontamination mit amplifiziert wurden.

Die Gelelektrophorese ist eine breit angewendete molekularbiologische Methode, um elektrisch geladene Moleküle aufzutrennen und sichtbar zu machen. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Feldes in einem Gel, das in einer ionisierten Pufferlösung liegt. Die Moleküle wandern in Abhängigkeit ihrer Größe, ihres Molekulargewichts und ihrer Ladung mehr oder weniger schnell von der Kathode zur Anode. Um die Molekülgröße der Moleküle festzustellen, wandert ein so genannter Größenstandard mit, der in je 100 bp, 200 bp und 300bp aufgetrennt wird und somit als Größenmarker dient.

Hierfür wurden 5 µl PCR-Amplifikat mit 3 µl Auftragspuffer vermischt und in einem 2,5%igem Agarosegel, der mit 4 µl Ethidiumbromid angereichert war, aufgetragen. Das Gel wurde in einer mit Pufferlösung gefüllten Gelkammer unter eine konstante Spannung von 120V/cm

Gellänge für 90 Minuten gebracht. Zur Größenermittlung wurden gleichzeitig 8 µl eines 100 bp Marker mit auf das Gel pipettiert (siehe Tabelle 14)

Die Produkte werden durch das interkalierende fluoreszierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht und anschließend in einem Transluminator mittels Gammakamera digital fotografiert.

Gel	Pufferlösung für 2 Liter
* 50 ml TBE Puffer (10x konz.) * 6,25 g Agarosepulver * 4 µl Ethidiumbromid * 225 ml destilliertes Wasser	* 1800 ml destilliertes Wasser * 200 ml TBE Puffer * 30 µl Ethidiumbromid

Tabelle 14 Zusammensetzung des Gels und der Pufferlösung

4.6 Sequenzierung der PCR-Produkte

4.6.1 Schritte der Sequenzierung

Eine Sequenzierung wurde durchgeführt, um für jeden SNP die Nukleotidsequenz der jeweiligen Genotypen zu verifizieren. Es wurden somit für jeden SNP drei DNA-Proben anhand der Schmelzkurvenanalyse im LightCycler480 ausgewählt, die den drei Genotypen sprich Homozygot für den Wildtyp, Heterozygot und Homozygot für die Mutation entsprechen. Für jeden SNP wurde das Primerpaar so ausgesucht, dass die variable Sequenz sicher durch die Begrenzung der Primers mit eingeschlossen wurde.

Die Sequenzierung läuft in mehreren Schritten ab:

1. Durchführung einer PCR
2. Durchführung einer Gelelektrophorese der amplifizierten DNA-Segmenten mit dem Ziel, eine Kontaminierung auszuschließen
3. Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden)
4. Sequenzierung der eingeschickten DNA-Fragmente von der externen Firma Sequiserve in Vaterstetten. Diese arbeitet mit der enzymatischen Didesoxymethode nach Sanger, auch Kettenabbruchsmethoden genannt.

4.6.2 PCR: Protokolle und Programme

Für die PCR wurden für alle SNPs die *forward*- (F) und *reverse*- (R) Primern eingesetzt (aus dem Englischem Vorwärts- (F) und Rückwärts- (R) Primern). Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden in einem 1:1 Verhältnis angewendet.

Um für jeden SNP optimale PCR-Bedingungen zu erreichen, wurde zuerst die optimal benötigte Magnesiumkonzentration durch eine Magnesiumverdünnungsreihe bestimmt. Nach abschließender Durchführung einer Gelelektrophorese wurde die Magnesiumkonzentration ausgewählt, die zu den deutlichsten und spezifischsten Banden geführt hatte, und somit als optimal angesehen wurde.

Außerdem wurde die Annealing-Temperatur für das jeweilige Primerpaar angepasst, um eine bestmögliche Hybridisierung der Primern an die DNA-Zielsequenz zu erreichen.

Nachfolgend werden die PCR-Protokolle und Ablaufprogramme dargestellt.

Die Tabelle 15 zeigt das Mischprotokoll der PCR. Es wurden 100 µl-Ansätze für jeden SNP angefertigt, die für eine maximale Stabilisierung der PCR-Reaktion auf 5 x 20 µl Ansätze verteilt wurden. Die Tabelle 16 gibt die Magnesium-Konzentration sowie die spezifische Annealing-Temperatur für jeden SNP wieder. Die Tabelle 17 stellt die Ablaufprogramme der PCR dar, die für jeden SNP bis auf die Annealing-Temperatur stets gleich verliefen.

Substanz	Menge (in µl)
PCR-Reaktionspuffer, 10x konz. (beinhaltet 15mM MgCl ₂)	40 µl
dNTP	8,0 µl
5'-Primer 5,0 nmol (F)	10 µl
3'-Primer 5,0 nmol (R)	10
Taq-DNA-Polymerase	2
Magnesium (Konzentration variiert)	X
steriles destilliertes Wasser	310-(X µl Mg ²⁺)
DNA (für jeden SNP nach Genotype ausgewählt)	5,0

Tabelle 15 Mischprotokoll für eine PCR.

SNP	Endkonzentration H ₂ O/ Mg ²⁺ (µl)	Annealing-Temperatur (°C)
rs2981745	65,5 / 12	60
rs3013236	73,3 / 4	65
rs1052715	73,3 / 4	65
rs2981778	71,5 / 6	60
rs11523871	77,5 / 0	65
rs2981804	77,5 / 0	60
rs2277244	57,5 / 0 Q-Lösung: 20	60

Tabelle 16: Spezifische Mg²⁺-Konzentration und Annealing-Temperatur für jeden SNP. Für SNP rs2277244 wurde zusätzlich eine stabilisierende Q-Lösung verwendet.

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit (Sek.)
1. Denaturierung	95	300
2. Denaturierung	95	30
3. Primer-Anneling	60	30
4. Elongation		30
35-fache Wiederholung der Punkte 2-4		
5. Terminale Elongation	72	10
6. Kühlung	8	∞

Tabelle 17: Ablaufprogramme für die PCR

4.6.3 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden anschließend durch eine Gelelektrophorese sichtbar gemacht, um eine Kontamination auszuschließen. Methode siehe 4.5.

4.6.4 Aufreinigung und Sequenzierung

Nach der DNA-Amplifizierung durch die PCR erfolgte die Aufreinigung der Produkte, die dazu dient, Primer, Polymerase und Nukleotide von den DNA-Produkten zu trennen. Diese erfolgte durch das QIAquick PCR-Purification-Kit nach Angaben des Herstellers Qiagen.

Die daraus gewonnenen PCR-Produkte wurden durch das externe Labor (Sequiserie, Vaterstetten) durchgeführt.

4.7 Kopplungsungleichgewicht und Haplotypberechnungen

Zusätzlich wurden die Stärke des Kopplungsungleichgewichts und die Haplotypfrequenzen der sieben *DMBT1*-SNPs berechnet. Hierfür wurden die zuvor errechneten Allelfrequenzen verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem PLINK v 1.07-Programm (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

4.8 Epistasis

Zuletzt wurde die Gen-Gen-Interaktion zwischen den sieben DMBT1-SNPs und bereits vorbeschriebenen, mit CED assoziierten *NOD2*-, *IL23R*- und *IL27*-Genvarianten analysiert. Die hierfür notwendigen Allelfrequenzen der jeweiligen Genvarianten waren aus den jeweiligen Publikationen verfügbar (122, 169, 225). Auch hierfür wurde das oben genannte Computerprogramm PLINK v 1.07 angewendet (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

4.9 Statistische Analysen

Die Polymorphismen wurden auf das Vorhandensein des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in den drei Studienpopulationen getestet. Die kategorischen Variablen wurden mittels *Fisher's Exact-test* miteinander verglichen, die quantitativen Variablen wurden mittels *student's-t-test* ausgewertet. Die Genotyp- und Allelfrequenzen in den drei Studienpopulationen wurden ausgerechnet und mittels Chi-Quadrat-Test miteinander verglichen. Alle statistischen Tests waren zweiseitig. Der Signifikanzwert wurde auf p-Wert < 0,05 festgelegt. Die Odds-Ratio wurde jeweils für das seltenere Allel bei jedem SNP mit 95%-igem Konfidenzintervall ausgerechnet. Die statistischen Daten wurden mit dem SPSS 13.0-Programm erfasst (SPSS Inc., Chicago, USA). P-Werte, Haplotypanalysen und Kopplungsungleichgewicht-Analysen wurden mit dem Programm PLINK v 1.07 durchgeführt (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

Der exakte Test auf HWE wurde mit PLINK-Option „-hardy“ durchgeführt. Die Kopplungsungleichgewichts-Werte wurden mit PLINK „-ld“ berechnet. Die Haplotyp-Analysen basieren auf dem „-hap-logistic“ Test. Epistasis zwischen den SNPs wurden mit der PLINK-Option „-epistasis“ berechnet, was einer logistischen Regression entspricht. Einzelassoziationen wurden mit PLINK über „-assoc“ berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Allgemeine Anmerkungen

Bei der hier vorgestellten genetischen Assoziationsstudie handelt es sich um eine Kandidatengenanalyse.

Das untersuchte *DMBT1*-Gen kodiert ein Bakterienbindungsprotein, welches eine wichtige Rolle in der mukosalen Immunabwehr zu spielen scheint. Dieses wurde auf sieben SNPs hin untersucht. Für jeden einzelnen SNP existieren jeweils zwei Allele (z.B. A und a), dementsprechend sind drei verschiedene Genotypen möglich (AA, aa, Aa).

Voraussetzung für die Durchführung der statistischen Auswertung dieser genetischen Analyse ist eine Normalverteilung der Allelfrequenz nach dem Hardy-Weinberg-Prinzip. Dieses Prinzip besagt, dass unter bestimmten Voraussetzungen bei einem biallelischen Locus mit den Allelen A und a und den jeweiligen Allelfrequenzen p und q folgendes Gleichgewicht für die Allel- und Genotypverteilung erreicht wird: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Für unsere zwei Patientenkollektive sowie für unser Kontrollkollektiv stimmten die beobachteten Allel- und Genotypfrequenzen mit den nach dem Hardy-Weinberg-Prinzip erwarteten Frequenzen nach Bonferroni-Korrektur (P-Werte $> 0,05$) überein. Somit ist davon auszugehen, dass sich alle drei Studienpopulationen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden, was systemische Fehler bei der Populationsstratifikation und bei der Genotypisierung weitgehend ausschließt. Zur Sicherung der richtigen Zuordnung der Genotypen mittels Schmelzkurvenanalysen wurde für jeden SNP jeweils eine Stichprobe für jeden möglichen Genotyp zusätzlich sequenziert.

Die Häufigkeit des selteneren Allels wird im Folgenden als *minor allele frequency* (MAF) bezeichnet.

Anhand verschiedener statistischer Verfahren wurden die Allel- und Genotypfrequenzen in beiden Patientenkollektiven (M. Crohn und C. ulcerosa) mit den Frequenzen der Kontrollgruppen verglichen. Eine statistisch signifikante Assoziation wurde als ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ definiert. Bestehen statistisch signifikante Assoziationen zwischen einem Polymorphismus und einem Krankheitsbild, werden die MAF der jeweiligen Gruppen verglichen. Bei signifikanten Assoziationen sprechen höhere MAF in der Patientengruppe als in der Kontrollgruppe mit einer OR (95% KI) > 1 für einen krankheitsprädisponierenden Effekt des untersuchten Polymorphismus. Umgekehrt deutet eine niedrigere MAF in der Patientengruppe als in der Kontrollgruppe mit einer OR (95% CI) < 1 auf einen schützenden Effekt des untersuchten Polymorphismus hin.

5.2 *DMBT1*-Polymorphismen sind signifikant mit *M. Crohn* und *C. ulcerosa* assoziiert

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Genotypfrequenzen für alle drei Kohorten (Tabelle 18) sowie der Allelfrequenzen für das *minor allele* samt statische Auswertung (Tabelle 19). Die Tabelle 20 zeigt die Ergebnisse zum Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit Angabe der P-Werte.

Anschließend werden für jeden SNP die Ergebnisse detaillierter beschrieben.

	Morbus Crohn	C. ulcerosa	Kontrollen
rs2981745	n= 823 TT 125; 0,15 TC 363; 0,44 CC 335; 0,41	n= 283 TT 49; 0,17 TC 137; 0,48 CC 97; 0,34	n= 978 TT 118; 0,12 TC 407; 0,42 CC 453; 0,46
rs2981778	n= 818 AA 63; 0,08 AG 361; 0,44 GG 394; 0,48	n= 282 AA 19; 0,067 AG 138; 0,49 GG 125; 0,44	n= 980 AA 114; 0,12 AG 420; 0,43 GG 446; 0,46
rs11523871	n= 818 CC 59; 0,07 CA 368; 0,45 AA 391; 0,48	n= 281 CC 23; 0,08 CA 137; 0,49 AA 121; 0,43	n= 980 CC 115; 0,12 CA 415; 0,42 AA 450; 0,46
rs3013236	n= 823 CC 63; 0,08 CT 354; 0,43 TT 406; 0,49	n= 283 CC 19; 0,07 CT 136; 0,48 TT 128; 0,45	n= 976 CC 116; 0,12 CT 408; 0,42 TT 452; 0,46
rs2981804	n= 821 AA 259; 0,32 AG 406; 0,49 GG 156; 0,19	n= 280 AA 78; 0,28 AG 148; 0,53 GG 54; 0,19	n= 977 AA 238; 0,24 AG 452; 0,46 GG 287; 0,29
rs2277244	n= 823 TT 0; 0 TC 40; 0,05 CC 783; 0,95	n= 283 TT 0; 0 TC 21; 0,07 CC 262; 0,93	n=974 TT 0; 0 TC 66; 0,07 CC 908; 0,93
rs1052715	n= 824 GG 161; 0,20 GA 378; 0,46 AA 285; 0,35	n= 283 GG 52; 0,18 GA 124; 0,44 AA 107; 0,38	n=981 GG 221; 0,23 GA 446; 0,45 AA 314; 0,32

Tabelle 18: Genotypfrequenzen in absolute Zahlen der drei untersuchten Kohorten, *M. Crohn*-Patienten, *C. ulcerosa*-Patienten und Kontrollen.

SNP	minor Allel	M. Crohn n= 824			C. ulcerosa n=283			K n=981
		MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF
rs2981745	T	0.372	$7,7 \times 10^{-3}$	1.21 [1.05-1.39]	0.415	$2,5 \times 10^{-4}$	1.50 [1.24-1,82]	0.329
rs2981778	A	0.298	0.037	0.86 [0.74-0.99]	0.312	0.407	0.918 [0,75-1.12]	0.331
rs11523871 = p.Pro42Thr	C	0.297	0.043	0.86 [0.75-0.99]	0.325	0.880	0,98 [0.80-1.20]	0.329
rs3013236 = p.Leu54Ser	C	0.292	0.015	0.84 [0.73-0.97]	0.307	0.359	0.90 [0.74-1.11]	0.330
rs2981804	A	0.563	$3,0 \times 10^{-7}$	1,42 [1,24-1,63]	0,541	$2,5 \times 10^{-3}$	1,31 [1,08-1,58]	0,475
rs2277244 = p.His585Tyr	T	0.024	0.093	0.71 [0.47-1.08]	0.037	0.70	1,10 [0.66-1,81]	0.034
rs1052715 = p.Pro1707Pro	G	0.425	0.09	0,89 [0.78-1.02]	0.401	0.036	0.82 [0.67-0,99]	0.453

Tabelle 19: Allelfrequenzen des *minor allele* bei Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa verglichen mit dem Kontrollkollektiv (=K). Die p-Werte (Patienten gegenüber Kontrollindividuen) und die Odds Ratio mit einem Konfidenzintervall von 95% werden für das *minor allele* gezeigt.

SNP	Kontrollen P-Werte	Männlich P-Werte	Weiblich P-Werte
rs2981745	0.490	0.140	1.000
rs2981778	1.000	0.114	1.000
rs11523871 =p.Pro42Thr	1.000	0.266	1.000
rs3013236 =p.Leu54Ser	1.000	0.231	1.000
rs2981804	0.168	0.063	1.000
rs2277244 =p.His585Tyr	1.000	1.000	1.000
rs1052715 =p.Pro1707Pro	0.070	0.336	0.714

Tabelle 20: Ergebnisse des Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der Kontrollgruppe, Die P-Werte wurden für multiple Testung nach der Bonferroni-Methode korrigiert (n=7 Teste; signifikante P-Werte Schwelle $0.05/7=0.007$).

5.2.1 Genotyp- und Allelfrequenzen für den *DMBT1*-SNP rs2981745

Sowohl für das M. Crohn-Patientenkollektiv als auch für die C. ulcerosa- und die Kontrollgruppe ist T das *minor allele* (37,2%, 41,5% und 32,9%). Das T-Allel kommt im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant seltener vor als in der M. Crohn- und in der C. ulcerosa-Gruppe ($p= 7,7 \times 10^{-3}$, OR 1,21 [1,05-1,39] bzw. $p= 2,5 \times 10^{-4}$, OR 1,50 [1,24-1,82]).

Wir konnten somit eine signifikante Assoziation des SNP rs2981745 (SNP-93) sowohl mit M. Crohn als auch mit C. ulcerosa nachweisen. Diese ist in beiden Fällen mit einer erhöhten Empfänglichkeit für die Erkrankung verbunden (OR > 1,0, s. Tabelle 18).

5.2.2 Genotyp- und Allelfrequenzen für den *DMBT1*-SNP rs2981778

Das A-Allel konnte in den drei Gruppen als das *minor allele* identifiziert werden. Das seltenere Auftreten in den Patientengruppen ist allerdings statistisch nicht mehr signifikant. (M. Crohn: 29,8%, $p=0,037$, OR 0,86 [0,74-0,99]; C. ulcerosa: 31,2%, $p=0,407$, OR 0,918 [0,75-1,12] und Kontrollgruppe: 33,1%).

Diese p -Werte deuten lediglich einen Trend an, welcher das Auftreten des *minor allele* A als möglicherweise schützenden Faktor gegen chronisch entzündliche Darmerkrankungen anzeigt (OR < 1,0, s. Tabelle 19).

5.2.3 Genotyp- und Allelfrequenzen für den *DMBT1*-SNP rs11523871=p.Pro42Thr

Bei allen drei Gruppen wird das C-Allel als *minor allele* beobachtet. Dieses ist sowohl für C. ulcerosa- als auch für M. Crohn-Patienten seltener vorhanden als in der Kontrollgruppe, jedoch zeigte sich nur für das M. Crohn-Kollektiv eine statistische Signifikanz (32,5% (C. ulcerosa) bzw. 29,7% (M. Crohn) gegenüber 32,9% (Kontrollen), $p=0,043$, OR 0,86 [0,75-0,99] (M. Crohn) bzw. $p=0,880$, OR 0,98 [0,80-1,20] (C. ulcerosa)).

Es zeigt sich somit eine statistisch signifikante Assoziationen von M. Crohn mit dem SNP rs11523871 = p.Pro42Thr. Die niedrigere *minor allele frequency* in der Patientengruppe lässt auf einen schwach protektiven Effekt des C-*minor allele* schließen (OR < 1,0, s. Tabelle 20).

5.2.4 Genotyp- und Allelfrequenzen für den *DMBT1*-SNP rs3013236 =p.Leu54Ser (SNP54)

Wie bei den drei vorherigen SNPs kann in den zwei Patientengruppen M. Crohn und C. ulcerosa sowie in der Kontrollgruppe das gleiche Allel, hier das C-Allel als *minor allele* mit einer Frequenz von je 29,2%, 30,7% und 33,0% identifiziert werden. Im M. Crohn-Kollektiv zeigt sich ein signifikant geringeres Auftreten des C-Allels ($p=0,015$, OR 0,84 [0,73-0,97]). Diese Ergebnisse zeigen somit eine signifikante Assoziation des SNP rs3013236 = p.Leu54Ser (SNP54) mit M. Crohn, während sich in der C. ulcerosa-Gruppe keine Signifikanz erzielen ließ. Bei niedrigerer *minor allele frequency* in der M. Crohn-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe kann die Aussage getroffen werden, dass das C-Allel einen protektiven Effekt für das Auftreten von M. Crohn bietet (OR<1,0, s. Tabelle 21).

5.2.5 Genotyp- und Allelfrequenzen für den *DMBT1*-SNP rs2981804

Während in der Kontrollgruppe das A-Allel mit einer Frequenz von 47,5% das *minor allele* ist, zeigt sich im M. Crohn-Kollektiv als auch im C. ulcerosa-Kollektiv das G-Allel als *minor allele*. Das A-Allel ist sowohl in der M. Crohn-Gruppe (56,3%) als auch in der C. ulcerosa-Gruppe (54,3%) das häufigere Allel. Somit ist in der M. Crohn-Gruppe und in der C. ulcerosa-Gruppe die Frequenz des A-Allels signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe ($p=3,0 \times 10^{-7}$, OR 1,42 [1,24-1,63] bzw. $p=2,5 \times 10^{-3}$, OR 1,31 [1,09-1,59]) und somit kann Allel A als *risk allele* betrachtet werden.

Der SNP rs2981804 zeigt somit die stärkste Assoziation mit M. Crohn unter den sieben in dieser Studie untersuchten SNPs. Zudem besteht eine hohe Assoziation mit C. ulcerosa. In beiden Fällen lässt sich daraus schließen, dass das Vorkommen des A-Allels für das Auftreten des M. Crohn und der C. ulcerosa prädisponiert ($OR > 1,0$). Umgekehrt lässt sich daraus schließen, dass das G-Allel eine protektive Wirkung hat.

5.2.6 Genotyp- und Allelfrequenzen für den *DMBT1*-SNP rs2277244 =p.His585Tyr

Die *minor allele frequency* für das T-Allel zeigt weder für die Gruppe der M. Crohn-Patienten noch für die Gruppe der C. ulcerosa-Patienten signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ($p=0,093$, OR 0,71 [0,47-1,08] bzw. $p=0,70$, OR 1,11 [0,66-1,81]), obwohl die Frequenz des T-Allels in der Gruppe mit C. ulcerosa-Patienten höher ist als in der Gruppe der Patienten mit M. Crohn und der Kontrollgruppe (3,7% gegenüber 2,4% gegenüber 3,4%).

Somit können wir feststellen, dass der SNP rs2277244 =p.His585Tyr keine Assoziation mit den Erkrankungen M. Crohn und C. ulcerosa aufweist.

5.2.7 Genotyp- und Allelfrequenzen für den *DMBT1*-SNP rs1052715 =p.Pro1707Pro (SNP 2348)

Die Frequenz des G-Allels in der Gruppe der Patienten mit C. ulcerosa ist im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt (40,1% gegenüber 45,3%, $p=0,036$, OR 0,82 [0,67-0,99]). In der Gruppe der Patienten mit M. Crohn ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,09$).

Die Mutation rs1052715 =p.Pro1707Pro (SNP 2348) zeigt keine signifikante Assoziation mit C. ulcerosa und M. Crohn.

5.2.8 Berechnung des Kopplungsungleichgewichts der *DMBT1*-Varianten

Zusätzlich wurden die sieben Polymorphismen im *DMBT1*-Gen hinsichtlich des Kopplungsungleichgewichtes untersucht. Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei SNPs besteht, wenn Allelkombinationen dieser zwei SNPs in einem Haplotyp in der untersuchten Population häufiger vorkommen, als man es von einer unabhängiger Kombination der Allele entsprechend ihren Allelhäufigkeiten erwarten würde. Das Kopplungsungleichgewicht hängt maßgeblich von der Rekombinationsrate zwischen zwei Loci und der Generationszeit ab. So wird z.B. ein Kopplungsungleichgewicht über Generationen hindurch durch Rekombination der Loci geringer. Betrachtet man zwei Genloci 1 und 2 (z.B. SNP 1 und SNP 2) mit jeweils zwei Allelen A und a sowie B und b mit den entsprechenden Allelfrequenzen p_A , p_a , p_B und p_b , so ergeben sich vier mögliche Allelkombinationen, dessen Frequenzen in Tabelle 25 dargestellt werden (120):

		SNP 1	
		Allel A	Allel a
SNP 2	Allel B	p_{AB}	p_{aB}
	Allel b	p_{Ab}	p_{ab}

Tabelle 21: Allelhäufigkeiten für zwei diallelische Genloci

Sind diese Allelkombinationen unabhängig voneinander vererbt, gilt $p_{AB} = p_A p_B$, das heißt, dass ein Kopplungsgleichgewicht vorliegt. Gleiches gilt für die drei anderen Kombinationen. Ist $p_{AB} \neq p_A p_B$, sind diese Allele voneinander abhängig; es liegt ein Kopplungsungleichgewicht vor. Ein Parameter für das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes ist der Ungleichgewichtskoeffizient D , welcher als

$$D = p_{AB} - p_A p_B \neq 0$$

definiert ist. Allerdings hängt D nicht nur vom Kopplungsungleichgewicht sondern auch von den Allelfrequenzen ab, so dass die theoretisch möglichen Maximal- und Minimalwerte von D nur erreicht werden, wenn beide Allele die gleichen Frequenzen haben. Um diesen Fehler entgegen zu wirken, wurden zwei weitere Parameter entwickelt: Einerseits wird das von Lewontin (233, 234) definierte D' als

$$D' = D/D_{max}$$

verwendet. Andererseits nutzt man das Quadrat des Korrelationskoeffizienten, welches von Hill and Robertson (235) und Devlin und Ritsch (236) wie folgt definiert wurde:

$$r^2 = D^2 / (p_A p_a p_B p_b)$$

D' und r^2 nehmen Werte zwischen 0 und $|1|$ an. Es werden die relativen Werte angegeben. Ein D' bzw. $r^2 = |1|$ heißt, dass die zwei untersuchten SNPs im vollkommenen Kopplungsungleichgewicht sind, dem entsprechend bedeutet D' bzw. $r^2 = 0$ ein Kopplungsgleichgewicht (237-239).

Die Parameter r^2 und D' bilden die Kopplungsungleichgewichte meistens in gleicher Richtung ab. Dass heißt, wenn D' hoch ist, ist r^2 ebenfalls hoch, und es besteht ein Kopplungsungleichgewicht. Haben allerdings beide Loci seltene Allele welche nicht zusammen auf einem Haplotyp auftreten oder sehr unterschiedliche Allelfrequenzen, kann es passieren, dass D' hoch ist während r^2 niedrig ist (240). Dieses ist für mehrere DMBT1-SNPs der Fall (siehe Tabelle 26).

Die Analysen des Kopplungsungleichgewichts sind in Tabelle 26 dargestellt.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Verteilung des Kopplungsungleichgewichtes in den beiden Patientenpopulationen und in der Kontrollpopulation ähnlich ist. Bis auf den SNP rs1052715 stehen alle anderen sechs SNPs im Kopplungsungleichgewicht zueinander. Der SNP rs2277244 ist sowohl in der *C. ulcerosa*-Gruppe als auch in der Kontrolle im kompletten Ungleichgewicht mit den SNPs rs11523871 und rs3013236 ($D'=1$). In der *M. Crohn*-Gruppe besteht zusätzlich ein komplettes Kopplungsungleichgewicht von SNP rs2277244 mit 2981778 ($D'=1$).

DMBT1 SNPs	rs2981745	rs2981778	rs11523871	rs3013236	rs2981804	rs2277244	rs1052715
M. Crohn-Patienten							
rs2981745	*	0.87/0.54	0.90/0.57	0.86/0.52	0.56/0.24	0.49/<0.01	0.07/<0.01
rs2981778	*	*	0.94/0.88	1.00/0.97	1.00/0.55	1.00/0.01	0.03/<0.01
rs11523871	*	*	*	0.94/0.85	0.96/0.50	1.00/0.01	0.04/<0.01
rs3013236	*	*	*	*	1.00/0.53	1.00/0.01	0.01/<0.01
rs2981804	*	*	*	*	*	0.45/<0.01	0.28/0.08
rs2277244	*	*	*	*	*	*	0.71/0.02
rs1052715	*	*	*	*	*	*	*
C. ulcerosa-Patienten							
rs2981745	*	0.83/0.44	0.82/0.46	0.83/0.43	0.46/0.18	0.27/<0.01	0.09/0.01
rs2981778	*	*	0.97/0.87	1.00/0.98	0.99/0.53	0.96/0.02	0.03/<0.01
rs11523871	*	*	*	0.96/0.85	0.88/0.45	1.00/0.02	0.08/<0.01

rs3013236	*	*	*	*	0.99/0.51	1.00/0.02	0.02/<0.01
rs2981804	*	*	*	*	*	0.52/0.01	0.35/0.10
rs2277244	*	*	*	*	*	*	0.71/0.03
rs1052715	*	*	*	*	*	*	*
Kontrollen							
rs2981745	*	0.98/0.95	0.98/0.96	0.97/0.95	0.63/0.17	1.00/0.02	0.15/<0.01
rs2981778	*	*	0.99/0.98	0.99/0.97	0.65/0.19	1.00/0.02	0.16/0.01
rs11523871	*	*	*	0.99/0.97	0.64/0.18	1.00/0.02	0.15/<0.01
rs3013236	*	*	*	*	0.64/0.18	1.00/0.02	0.18/0.01
rs2981804	*	*	*	*	*	0.51/<0.01	0.03/<0.01
rs2277244	*	*	*	*	*	*	0.63/0.02
rs1052715	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 22: Kopplungsungleichgewichtsanalysen für die *DMBT1*-SNPs beim M. Crohn-Patienten, bei der *C. ulcerosa*-Patienten und bei Kontrollen. Die Werte werden als D'/r^2 angegeben: je näher sind D' und r^2 an 1, desto stärker ist das Kopplungsungleichgewicht.

5.3 Die Haplotypen im *DMBT1*-Gen sind signifikant mit der Suszeptibilität für M. Crohn und für die *C. ulcerosa* assoziiert

Nachdem starke Kopplungsungleichgewichte im *DMBT1*-Gen nachgewiesen wurden, führten wir Haplotypenanalysen durch. Die Vergleiche der Allel- und Genotypfrequenzen der Polymorphismen des *DMBT1*-Gens zwischen den Patientenkollektiven mit M. Crohn und *C. ulcerosa* und der Kontrollgruppe ergaben mehrere signifikante Assoziationen. Weiterer Schritt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Haplotypfrequenzen der sieben SNPs im *DMBT1*-Gen zwischen den Patientenkollektiven und den Kontrollgruppen zu vergleichen, um eventuelle Assoziationen mit CED zu untersuchen. Insgesamt wurden jeweils für die M. Crohn-Gruppe und die *C. ulcerosa*-Gruppe 20 Haplotypen untersucht. Dabei waren die Frequenzen der Haplotypen sowohl in der M. Crohn-Gruppe als auch in der *C. ulcerosa*-Gruppe verglichen mit den Frequenzen der Kontrollgruppe ausnahmslos hochsignifikant mit M. Crohn bzw. *C. ulcerosa* assoziiert. Insgesamt zeigten sich höhere Signifikanzwerte für Assoziationen mit M. Crohn als mit der *C. ulcerosa* (M. Crohn, p-Wert zwischen 2.04×10^{-3} und 6.14×10^{-18} ; *C. ulcerosa*, p-Wert zwischen $1,67 \times 10^{-2}$ und 1.37×10^{-11}).

5.3.1 Haplotypenfrequenzen im *DMBT1*-Gen bei M. Crohn

Signifikante Assoziationen der *DMBT1*-Haplotypen mit M. Crohn zeigen sich insgesamt mit p-Werten zwischen 2.04×10^{-3} und 6.14×10^{-18} . Die Tabelle 27 stellt die Haplotyp-Analysen für die sieben SNPs im *DMBT1*-Gen bei Patienten mit M. Crohn dar. Die stärkste Assoziation wurde für den Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2381778-rs11523871-rs3013236-rs2981804-rs2277244-rs1052715 mit einem p-Wert von 6.14×10^{-18} gefunden. Darunter ist die Allelkombination CGATGCA am stärksten mit einer Haplotypfrequenz von 2% in der M. Crohn-Gruppe gegenüber 13% in der Kontrollgruppe und einem p-Wert von 4.04×10^{-13} (OR= 0.25, 95% KI= [0.17-0.36]) assoziiert. Die schwächste Assoziationen im Haplotyp rs2981745-rs2381778-rs11523871-rs3013236-rs2981804-rs2277244-rs1052715 zeigte sich für die Allele CGATACG mit eine Haplotypfrequenz von 13% in der M. Crohn-Gruppe gegenüber 23% in der Kontrollgruppe und einem p-Wert von 7.33×10^{-3} (OR=0.77, 95%KI= [0.64-.093]). Die Allelkombinationen CGATCTG, TACCGCA, TACCACA und TACCGCG sind nicht signifikant assoziiert. Die schwächste Assoziation mit M. Crohn wurde für den Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981778-rs11523871-rs3013236 gefunden mit einem p-Wert von 2.04×10^{-3} .

Haplotypen	M. Crohn			Kontrollen
	HF	P-Wert	OR [95 % CI]	HF
rs2981745-rs2981778		1.28×10^{-10}		
TA	0.27	1.47×10^{-3}	0.79 [0.68-0.91]	0.32
CA	0.03	8.07×10^{-3}	1.92 [1.19-3.11]	0.01
TG	0.10	3.01×10^{-10}	5.36 [3.18-9.04]	<0.01
CG	0.60	5.47×10^{-4}	0.79 [0.69-0.90]	0.66
rs2981778-rs11523871		7.45×10^{-5}		
AC	0.28	5.49×10^{-3}	0.82 [0.71-0.94]	0.33
GC	0.01	1.89×10^{-3}	6.76 [2.02-22.57]	<0.01
AA	0.01	8.40×10^{-3}	3.02 [1.33-6.87]	<0.01
GA	0.69	1.37×10^{-1}	1.11 [0.97-1.27]	0.67
rs11523871-rs3013236		4.63×10^{-4}		

CC	0.28	3.15×10^{-3}	0.80 [0.70-0.93]	0.32
CT	0.02	5.11×10^{-4}	3.71 [1.77-7.77]	<0.01
AT	0.69	1.60×10^{-1}	1.11 [0.96-1.28]	0.67
rs3013236-rs2981804		1.58×10^{-14}		
CG	0.29	9.80×10^{-1}	1.00 [0.85-1.17]	0.27
TG	0.15	2.33×10^{-8}	0.65 [0.56-0.76]	0.25
CA	<0.01	2.15×10^{-2}	<0.01 [<0.01-0.29]	0.06
TA	0.56	9.87×10^{-13}	1.62 [1.42-1.85]	0.42
rs2981804-rs2277244		8.37×10^{-7}		
GT	0.02	5.05×10^{-2}	0.61 [0.37-1.01]	0.03
GC	0.42	2.64×10^{-6}	0.73 [0.64-0.83]	0.50
AC	0.56	1.68×10^{-7}	1.42 [1.25-1.62]	0.47
rs2981745-rs2981778- rs11523871		1.41×10^{-8}		
TAC	0.27	4.92×10^{-4}	0.77 [0.66-0.89]	0.32
CAC	0.02	1.90×10^{-2}	1.97 [1.18-3.47]	<0.01
TGC	0.01	2.24×10^{-3}	6.19 [1.92-19.92]	<0.01
TGA	0.09	1.87×10^{-8}	8.35 [3.98-17.50]	<0.01
CGA	0.60	4.05×10^{-4}	0.79 [0.69-0.90]	0.66
rs2981778-rs11523871- rs3013236		2.04×10^{-3}		
ACC	0.28	4.42×10^{-3}	0.81 [0.70-0.94]	0.32
GCT	0.01	2.67×10^{-3}	23.10 [2.98-179.27]	<0.01
GAT	0.69	1.35×10^{-1}	1.11 [0.97-1.27]	0.67
rs11523871-rs3013236- rs2981804		3.02×10^{-16}		
CCG	0.28	5.00×10^{-1}	0.95 [0.82-1.10]	0.27
ATG	0.13	1.75×10^{-9}	0.62 [0.54-0.73]	0.25

CCA	<0.01	1.18×10^{-2}	<0.01 [$<0.01-0.13$]	0.05
ATA	0.56	2.46×10^{-11}	1.57 [1.38-1.79]	0.42
rs3013236-rs2981804 - rs2277244		6.61×10^{-12}		
TGT	0.01	1.22×10^{-1}	0.67 [0.40-1.11]	0.02
CGC	0.29	9.68×10^{-1}	1.00 [0.86-1.16]	0.27
TGC	0.13	8.38×10^{-8}	0.65 [0.56-0.76]	0.23
CAC	<0.01	2.25×10^{-2}	<0.01[$<0.01-0.39$]	0.06
TAC	0.56	2.30×10^{-13}	1.64 [1.44-1.87]	0.41
rs2981804 -rs2277244- rs1052715		1.16×10^{-13}		
GTG	0.01	1.48×10^{-1}	0.64 [0.35-1.17]	0.02
GCG	0.24	6.53×10^{-1}	0.96 [0.81-1.14]	0.21
ACG	0.17	1.94×10^{-1}	0.89 [0.75-1.06]	0.22
GCA	0.18	7.80×10^{-8}	0.63 [0.53-0.74]	0.29
ACA	0.39	7.60×10^{-12}	1.68 [1.45-1.95]	0.25
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236		7.35×10^{-6}		
TACC	0.26	2.39×10^{-4}	0.76 [0.66-0.88]	0.32
CACC	0.02	1.47×10^{-2}	2.07 [1.15-3.71]	<0.01
TGAT	0.09	1.53×10^{-6}	13.40 [4.65-38.61]	<0.01
CGAT	0.60	3.74×10^{-4}	0.79 [0.69-0.90]	0.66
rs2981778-rs11523871- rs3013236-rs2981804		4.39×10^{-16}		
ACCG	0.28	4.62×10^{-1}	0.95 [0.82-1.10]	0.27
GATG	0.13	1.93×10^{-9}	0.63 [0.54-0.73]	0.25
ACCA	<0.01	9.26×10^{-3}	<0.01[$<0.01-0.08$]	0.05
GATA	0.56	1.15×10^{-11}	1.58 [1.38-1.80]	0.42

rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244		1.92×10^{-13}		
ATGT	0.02	1.23×10^{-1}	0.67 [0.40-1.11]	0.02
CCGC	0.28	4.82×10^{-1}	0.95 [0.82-1.10]	0.27
ATGC	0.12	6.93×10^{-9}	0.62 [0.53-0.73]	0.23
ATAC	0.55	6.80×10^{-12}	1.59 [1.39-1.82]	0.41
rs3013236-rs2981804- rs2277244-rs1052715		3.60×10^{-13}		
TGTG	0.01	2.88×10^{-1}	0.72 [0.39-1.32]	0.02
CGCG	0.13	4.67×10^{-1}	1.09 [0.86-1.37]	0.09
TGCG	0.11	3.00×10^{-1}	0.89 [0.72-1.11]	0.11
TACG	0.17	9.94×10^{-1}	1.00 [0.99-1.01]	0.20
CGCA	0.16	5.52×10^{-1}	0.94 [0.78-1.14]	0.18
TGCA	0.02	1.55×10^{-11}	0.33 [0.23-0.45]	0.12
CACA	<0.01	7.27×10^{-2}	<0.01 [<0.01-2.05]	0.03
TACA	0.39	1.95×10^{-16}	1.90 [1.63-2.21]	0.21
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236- rs2981804		1.38×10^{-15}		
TACCG	0.26	1.33×10^{-1}	0.89 [0.76-1.04]	0.27
CACCG	0.02	1.56×10^{-2}	2.06 [1.15-3.70]	<0.01
TGATG	0.02	2.40×10^{-3}	74.70 [18.05-309.22]	<0.01
CGATG	0.12	1.89×10^{-12}	0.57 [0.48-0.66]	0.25
TACCA	<0.01	2.59×10^{-2}	<0.01 [<0.01-0.39]	0.05
TGATA	0.07	6.71×10^{-6}	32.2 [7.11-145.81]	<0.01
CGATA	0.48	4.01×10^{-3}	1.21 [1.06-1.38]	0.42
rs2981778-rs11523871- rs3013236-rs2981804-		4.52×10^{-13}		

rs2277244				
GATGT	0.02	1.26×10^{-1}	0.67 [0.40-1.12]	0.02
ACCGC	0.28	4.85×10^{-1}	0.95 [0.82-1.10]	0.27
GATGC	0.12	5.65×10^{-9}	0.62 [0.53-0.73]	0.23
ACCAC	<0.01	2.36×10^{-2}	<0.01 [<0.01-0.39]	0.05
GATAC	0.55	3.78×10^{-12}	1.60 [1.40-1.83]	0.41
rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244- rs1052715		8.92×10^{-18}		
ATGTG	0.01	2.84×10^{-1}	0.72 [0.39-1.32]	0.02
CCGCG	0.12	9.09×10^{-1}	1.01 [0.85-1.20]	0.09
ATGCG	0.10	1.05×10^{-1}	0.83 [0.66-1.04]	0.11
CCACG	<0.01	4.58×10^{-2}	<0.01 [<0.01-0.87]	0.03
ATACG	0.16	7.04×10^{-1}	0.97 [0.80-1.16]	0.20
CCGCA	0.16	3.14×10^{-1}	0.91 [0.75-1.10]	0.18
ATGCA	0.02	9.87×10^{-12}	0.32 [0.23-0.44]	0.12
CCACA	<0.01	9.45×10^{-2}	<0.01 [<0.01-3.18]	0.03
ATACA	0.38	9.26×10^{-16}	1.87 [1.61-2.18]	0.21
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244		1.17×10^{-13}		
CGATGT	0.01	5.29×10^{-2}	0.60 [0.35-1.00]	0.02
TACCGC	0.26	1.29×10^{-1}	0.89 [0.76-1.04]	0.27
CACCGC	0.02	1.52×10^{-2}	2.07 [1.15-3.73]	<0.01
CGATGC	0.10	1.32×10^{-11}	0.53 [0.48-0.66]	0.22
TACCAC	<0.01	4.60×10^{-2}	<0.01 [<0.01-0.91]	0.05
TGATAC	0.07	1.02×10^{-5}	37.90 [7.55-190.25]	<0.01
CGATAC	0.48	2.09×10^{-3}	1.22 [1.07-1.38]	0.41

rs2981778-rs11523871- rs3013236-rs2981804- rs2277244-rs1052715		1.80×10^{-17}		
GATGTG	0.01	2.90×10^{-1}	0.72 [0.39-1.32]	0.02
ACCGCG	0.12	9.18×10^{-1}	1.01 [0.84-1.22]	0.09
GATGCG	0.10	1.08×10^{-1}	0.83 [0.67-1.04]	0.11
GATACG	0.16	6.83×10^{-1}	0.96 [0.80-1.15]	0.20
ACCGCA	0.16	3.20×10^{-1}	0.91 [0.75-1.10]	0.18
GATGCA	0.02	8.32×10^{-12}	0.32 [0.23-0.44]	0.12
ACCACA	<0.01	1.23×10^{-1}	<0.01 [<0.01-6.77]	0.03
GATACA	0.38	3.32×10^{-16}	1.89 [1.62-2.20]	0.21
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244- rs1052715		6.14×10^{-18}		
CGATGTG	0.01	9.88×10^{-2}	0.62 [0.33-1.14]	0.02
CGATACG	0.13	7.33×10^{-3}	0.77 [0.64-0.93]	0.23
CGATGCG	0.09	2.81×10^{-2}	0.78 [0.63-0.97]	0.10
TACCGCA	0.15	1.17×10^{-1}	0.85 [0.70-1.04]	0.20
TACCACA	<0.01	6.85×10^{-2}	<0.01 [<0.01-1.50]	0.03
TACCGCG	0.11	6.57×10^{-1}	0.95 [0.74-1.21]	0.06
CGATGCA	0.02	4.04×10^{-13}	0.25 [0.17-0.36]	0.13
CGATACA	0.34	1.53×10^{-8}	1.54 [1.33-1.79]	0.17
TGATACG	0.03	2.92×10^{-5}	29.40 [6.03-143.3]	<0.01

Tabelle 23: *DMBT1*-Polymorphismen beim M. Crohn: Haplotyp-Frequenzen-Analysen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. (HF): Haplotypfrequenz, p-Werte, (OR): Odds ratios mit einem 95% Konfidenzintervall (KI). Signifikante p-Werte sind fett markiert.

5.3.2 Haplotypenfrequenzen im *DMBT1*-Gen bei der *C. ulcerosa*

Bei allen 20 untersuchten Haplotypen im *DMBT1*-Gen zeigen sich signifikante Assoziationen mit der *C. ulcerosa*. Dabei wurden p-Werte zwischen 1.67×10^{-2} und 1.37×10^{-11} berechnet. Tabelle 28 stellt die Haplotyp-Analysen für die sieben SNPs im *DMBT1*-Gen bei Patienten mit *C. ulcerosa* dar. Die stärkste Assoziation wurde für den Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2981778 mit einem p-Wert von 1.37×10^{-11} gefunden. Dabei ist die Allelkombination TG mit einer Haplotyffrequenz in der Patientengruppe von 13% gegenüber einer Haplotyffrequenz in der Kontrollgruppe von <1% und einem entsprechendem p-Wert von 2.39×10^{-11} am stärksten mit der *C. ulcerosa* assoziiert (OR=6.23, 95% KI= [3.64-10.66]). In diesem Haplotyp zeigte sich die Allelkombination CA mit einem p-Wert von 7.31×10^{-3} am schwächsten assoziiert. Die Allelkombination TA zeigte keine Assoziation mit der *C. ulcerosa* (p-Wert= 9.56×10^{-2} , OR=0.84, 95% KI [0.68-1.03]). Die schwächste, noch knapp signifikante Assoziation zeigte sich für das Haplotyp rs2981804-rs2277244 mit einem p-Wert von 1.67×10^{-2} .

Haplotypen	C. ulcerosa			Kontrollen
	HF	P-Wert	OR [95 % CI]	HF
rs2981745-rs2981778		1.37×10^{-11}		
TA	0.28	9.56×10^{-2}	0.84 [0.68-1.03]	0.32
CA	0.03	7.31×10^{-3}	2.44 [1.27-4.68]	0.01
TG	0.13	2.39×10^{-11}	6.23 [3.64-10.66]	<0.01
CG	0.55	1.11×10^{-5}	0.65 [0.54-0.79]	0.66
rs2981778-rs11523871		5.35×10^{-3}		
AC	0.30	2.92×10^{-1}	0.90 [0.74-1.09]	0.33
GC	0.02	9.52×10^{-4}	8.33 [2.37-29.32]	<0.01
GA	0.67	9.91×10^{-1}	1.00 [0.99-1.01]	0.67
rs11523871-rs3013236		1.26×10^{-3}		
CC	0.30	2.53×10^{-1}	0.89 [0.72-1.09]	0.32
CT	0.03	3.02×10^{-4}	4.43 [1.98-9.92]	<0.01
AT	0.67	9.67×10^{-1}	1.00 [0.83-1.20]	0.67

rs3013236-rs2981804		1.70×10^{-4}		
CG	0.31	5.51×10^{-1}	1.07 [0.86-1.34]	0.27
TG	0.15	9.45×10^{-4}	0.70 [0.57-0.87]	0.25
CA	<0.01	3.27×10^{-2}	0.21 [0.04-0.88]	0.06
TA	0.54	3.66×10^{-5}	1.48 [1.23-1.78]	0.42
rs2981804-rs2277244		1.67×10^{-2}		
GT	0.03	9.94×10^{-1}	1.00 [0.99-1.01]	0.03
GC	0.43	4.37×10^{-3}	0.76 [0.63-0.92]	0.50
AC	0.53	5.75×10^{-3}	1.30 [1.08-1.57]	0.47
rs2981745-rs2981778- rs11523871		2.10×10^{-11}		
TAC	0.27	5.39×10^{-2}	0.82 [0.66-1.00]	0.32
CAC	0.03	1.15×10^{-3}	3.32 [1.61-6.84]	<0.01
TGC	0.02	2.08×10^{-3}	7.87 [2.12-29.26]	<0.01
TGA	0.12	4.93×10^{-9}	8.56 [4.17-17.58]	<0.01
CGA	0.55	3.67×10^{-6}	0.64 [0.53-0.77]	0.66
rs2981778-rs11523871- rs3013236		5.07×10^{-3}		
ACC	0.30	2.98×10^{-1}	0.90 [0.73-1.10]	0.32
GCT	0.02	1.42×10^{-3}	31.3 [3.78-259.04]	<0.01
GAT	0.67	9.93×10^{-1}	1.00 [0.97-1.02]	0.67
rs11523871-rs3013236- rs2981804		5.41×10^{-6}		
CCG	0.30	7.18×10^{-1}	1.04 [0.84-1.29]	0.27
ATG	0.14	3.21×10^{-4}	0.67 [0.54-0.84]	0.25
CCA	<0.01	3.25×10^{-2}	0.21 [0.05-0.88]	0.05
CTA	0.02	8.03×10^{-4}	11.10 [2.71-45.45]	<0.01
ATA	0.52	4.29×10^{-4}	1.40 [1.16-1.69]	0.42

rs3013236-rs2981804- rs2277244		2.35×10^{-4}		
TGT	0.02	8.06×10^{-1}	1.08 [0.59-1.99]	0.02
CGC	0.29	5.55×10^{-1}	1.07 [0.85-1.34]	0.27
TGC	0.13	4.93×10^{-4}	0.67 [0.54-0.84]	0.23
CAC	<0.01	2.83×10^{-2}	0.22 [0.55-0.85]	0.06
TAC	0.56	4.82×10^{-5}	1.47 [1.77-1.22]	0.41
rs2981804-rs2277244- rs1052715		3.45×10^{-7}		
GTG	0.01	7.08×10^{-1}	1.16 [0.53-2.52]	0.02
GCG	0.24	5.77×10^{-1}	0.93 [0.73-1.19]	0.21
ACG	0.17	1.72×10^{-2}	0.72 [0.55-0.94]	0.22
GCA	0.18	3.03×10^{-3}	0.69 [0.54-0.88]	0.29
ACA	0.39	2.45×10^{-7}	1.71 [1.39-2.10]	0.25
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236		2.73×10^{-7}		
TACC	0.27	4.36×10^{-2}	0.81 [0.66-0.99]	0.32
CACC	0.03	9.59×10^{-4}	3.52 [1.67-7.43]	<0.01
TGAT	0.12	5.57×10^{-7}	12.50 [4.65-33.58]	<0.01
CGAT	0.55	3.40×10^{-6}	0.64 [0.53-0.77]	0.66
rs2981778-rs11523871- rs3013236-rs2981804		2.34×10^{-4}		
ACCG	0.30	7.40×10^{-1}	1.04 [0.82-1.31]	0.27
GATG	0.14	3.62×10^{-4}	0.68 [0.55-0.84]	0.25
ACCA	<0.01	3.73×10^{-2}	0.21 [0.05-0.91]	0.05
GATA	0.52	3.49×10^{-4}	1.40 [1.16-1.68]	0.42
rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244		3.83×10^{-6}		

ATGT	0.02	9.89×10^{-1}	1.00 [0.99-1.01]	0.02
CCGC	0.30	7.42×10^{-1}	1.04 [0.83-1.31]	0.27
ATGC	0.12	1.90×10^{-4}	0.64 [0.51-0.81]	0.23
CCAC	<0.01	2.95×10^{-2}	0.21 [0.05-0.86]	0.05
CTAC	0.02	8.13×10^{-4}	11.10 [2.71-45.45]	<0.01
ATAC	0.51	4.55×10^{-4}	1.40 [1.16-1.69]	0.41
rs3013236-rs2981804- rs2277244-rs1052715		6.20×10^{-8}		
TGTG	0.02	5.15×10^{-1}	1.29 [0.60-2.78]	0.02
CGCG	0.12	9.04×10^{-1}	1.02 [0.74-1.41]	0.09
TGCG	0.12	5.89×10^{-1}	0.92 [0.68-1.24]	0.11
CACG	<0.01	1.69×10^{-1}	0.01 [<0.01-6.93]	0.03
TACG	0.14	9.02×10^{-2}	0.79 [0.60-1.04]	0.20
CGCA	0.18	5.57×10^{-1}	1.08 [0.84-1.40]	0.19
TGCA	<0.01	1.46×10^{-5}	0.30 [0.17-0.52]	0.12
CACA	<0.01	5.93×10^{-2}	0.19 [0.03-1.07]	0.03
TACA	0.39	7.24×10^{-10}	1.91 [1.56-2.35]	0.21
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236- rs2981804		3.53×10^{-10}		
TACCG	0.27	5.57×10^{-1}	0.94 [0.91-0.96]	0.27
CACCG	0.03	1.31×10^{-3}	3.41 [1.61-7.21]	<0.01
TGATG	0.03	5.01×10^{-4}	61.10 [6.02-620.02]	<0.01
CGATG	0.11	2.73×10^{-6}	0.57 [0.45-0.72]	0.25
TACCA	<0.01	3.58×10^{-2}	0.21 [0.05-0.90]	0.05
TGATA	0.09	3.42×10^{-6}	32.60 [7.50-141.70]	<0.01
CGATA	0.44	8.65×10^{-1}	1.02 [0.81-1.28]	0.42
rs2981778-rs11523871-		1.82×10^{-5}		

rs3013236-rs2981804- rs2277244				
GATGT	0.02	7.77×10^{-1}	1.10 [0.57-2.13]	0.02
ACCGC	0.30	7.13×10^{-1}	1.04 [0.84-1.28]	0.27
GATGC	0.12	1.61×10^{-4}	0.64 [0.51-0.81]	0.23
ACCAC	<0.01	3.28×10^{-2}	0.22 [0.06-0.88]	0.05
GATAC	0.51	5.17×10^{-4}	01.39 [1.15-1.67]	0.41
rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244- rs1052715		6.96×10^{-9}		
ATGTG	0.02	5.83×10^{-1}	1.24 [0.58-2.67]	0.02
CCGCG	0.12	3.06×10^{-2}	1.03 [0.74-1.43]	0.09
ATGCG	0.11	3.25×10^{-1}	0.85 [0.62-1.17]	0.11
CCACG	<0.01	1.68×10^{-1}	0.01 [<0.01-6.71]	0.03
ATACG	0.13	4.65×10^{-2}	0.76 [0.57-0.99]	0.20
CCGCA	0.18	7.85×10^{-1}	1.04 [0.78-1.38]	0.18
ATGCA	<0.01	1.50×10^{-5}	0.30 [0.18-0.52]	0.12
CCACA	<0.01	6.19×10^{-2}	0.23 [0.05-1.08]	0.03
ATACA	0.38	1.58×10^{-8}	1.81 [1.47-2.22]	0.21
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244		1.39×10^{-10}		
CGATGT	0.02	8.70×10^{-1}	0.95 [0.49-1.84]	0.02
TACCGC	0.27	5.42×10^{-1}	0.94 [0.75-1.16]	0.27
CACCGC	0.03	1.30×10^{-3}	3.44 [1.62-7.32]	<0.01
CGATGC	0.09	1.89×10^{-6}	0.54 [0.42-0.69]	0.22
TACCAC	<0.01	3.19×10^{-2}	0.22 [0.06-0.88]	0.05
TGATAC	0.08	3.65×10^{-6}	37.50 [8.07-174.15]	<0.01

CGATAC	0.43	8.79×10^{-1}	1.01 [0.89-1.15]	0.41
rs2981778-rs11523871- rs3013236-rs2981804- rs2277244-rs1052715		1.21×10^{-8}		
GATGTG	0.02	5.05×10^{-1}	1.29 [0.61-2.73]	0.02
ACCGCG	0.12	8.84×10^{-1}	1.03 [0.69-1.53]	0.09
GATGCG	0.12	3.30×10^{-1}	0.85 [0.62-1.17]	0.11
GATACG	0.13	4.60×10^{-2}	0.76 [0.57-0.99]	0.20
ACCGCA	0.18	3.30×10^{-1}	1.04 [0.78-1.39]	0.18
GATGCA	<0.01	1.43×10^{-5}	0.30 [0.18-0.52]	0.12
ACCACA	<0.01	6.44×10^{-2}	0.23 [0.05-1.09]	0.03
GATACA	0.39	9.36×10^{-9}	0.31 [0.21-0.46]	0.20
rs2981745-rs2981778- rs11523871-rs3013236- rs2981804-rs2277244- rs1052715		5.63×10^{-10}		
CGATGTG	0.02	9.62×10^{-1}	0.98 [0.42-2.27]	0.02
CGATACG	0.01	3.23×10^{-4}	0.57 [0.42-0.77]	0.23
CGATGCG	0.09	7.96×10^{-2}	0.75 [0.54-1.03]	0.10
TACCGCA	0.15	6.04×10^{-1}	0.93 [0.70-1.23]	0.20
TACCACA	<0.01	7.63×10^{-2}	0.32 [0.09-1.13]	0.03
TACCGCG	0.11	7.88×10^{-1}	0.95 [0.68-1.34]	0.06
CGATGCA	<0.01	6.50×10^{-6}	0.16 [0.07-0.36]	0.13
CGATACA	0.33	1.03×10^{-3}	1.42 [1.15-1.75]	0.17
TGATACG	0.02	5.94×10^{-4}	22.00 [3.77-128.35]	<0.01

Tabelle 24: *DMBT1*-Polymorphismen bei der *C. ulcerosa*: Haplotyp-Frequenzen-Analysen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. (HF): Haplotypfrequenz, p-Werte, (OR): Odds ratios mit einem 95% Konfidenzintervall (KI). Signifikante p-Werte sind fett markiert.

5.4 Die *DMBT1*-Polymorphismen haben einen Einfluss auf die phänotypischen Eigenschaften bei M. Crohn und C. ulcerosa

Ein weiterer Arbeitsschritt dieser Arbeit bestand darin, in einer detaillierten Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalyse mögliche Assoziationen zwischen signifikant assoziierten SNPs und bestimmte Krankheitscharakteristika von M. Crohn und C. ulcerosa zu untersuchen. Wie bereits unter 5.2 erläutert, konnten wir zum ersten Mal signifikante Assoziationen von vier *DMBT1*-SNPs mit M. Crohn und zwei *DMBT1*-SNPs mit der C. ulcerosa nachweisen. Insbesondere SNP rs2981804 zeigte eine hochsignifikante Assoziation mit M. Crohn mit einem p-Wert von 1.54×10^{-7} und einer OR von 0,70 mit einem 95% KI [0,62-0,80]. Zudem zeigte sich für diesen SNP rs2981804 eine starke Assoziation mit C. ulcerosa mit einem p-Wert von $4,6 \times 10^{-3}$ (OR 0,76 95% KI [0,63-0,92]). Außerdem zeigte SNP rs2981745 die stärkste statistische Signifikanz mit einem p-Wert von $1,4 \times 10^{-4}$ (OR= 1.45, 95% KI [1.20-1.76]) und wurde somit mit der C. ulcerosa hochgradig assoziiert. Für M. Crohn zeigte dieser SNP ebenfalls eine signifikante Assoziation mit einem p-Wert von $6,13 \times 10^{-3}$ (OR=1.21, 95% KI [1.06-1.39]). Somit wurden Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen für die SNPs rs2981745 und rs2981804 durchgeführt.

5.4.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation des *DMBT1*-Gens mit M. Crohn

Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für den *DMBT1*-SNP rs2981745

Insgesamt ist zu vermerken, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen TT, CT und CC hinsichtlich des Alters bei Diagnose, Lokalisation der Entzündung, Krankheitsverhalt, Einsatz von Immunsuppressiva, operativen Eingriffen, Fisteln oder Stenosen beobachtet wurde. Schwache Unterschiede zeigten sich für ein Alter bei Diagnose unter 16 Jahren zwischen T-Allelträger (Genotypen TT oder CT) und Nicht-T-Allelträger (Genotyp CC) mit einem p-Wert von $2,9 \times 10^{-2}$ (OR=0,57 95% KI [0.35-0,94]). Dabei waren 8,60% der TT-Träger und 9,80% der CT-Träger unter 16 Jahren bei Erstdiagnose gegenüber 15,42% der CC-Träger und waren somit signifikant jünger. Ebenso konnte eine schwache Assoziation zwischen T-Allelträger und einer Lokalisation der Entzündung im Ileokolon im Vergleich zu Nicht-T-Allelträger festgestellt werden (p-Wert= 2.6×10^{-2} , OR=0,65 95% KI [0,44-0,95]). Für homozygote TT-Träger war eine Lokalisation der Entzündung im Ileocolon signifikant seltener mit einer Frequenz von 65.09% gegenüber 68.44% bei heterozygoten CT-Träger und 76.21% der homozygoten CC-Träger. Letztendlich konnte eine weitere Assoziation zwischen T-Allelträgern und M. Crohn vom nicht-strikturierenden, nicht-penetrierenden Typ im Vergleich zu Nicht-T-Allelträgern gesehen werden. Homozygote T-Allelträger hatten mit einer Frequenz von 32.14% für TT-Träger und 28.12% für heterozygote CT-Träger häufiger einen klinischen nicht-strikturierenden, nicht-

fibrosierendem Subphänotyp gegenüber 19.34% der homozygoten CC-Allelträger, $p=0,013$, $OR= 1,72$ 95% KI [1,13-2,62].

DMBT1 rs2981745	(1) n=115	(2) n=276	(3) n=237	P_T	OR_T [95% KI]
Genotyp	TT	CT	CC		
Alter bei Diagnose (n=600)	29.88 ± 13.95 6–78	27.83 ±12.10 7–71	27.35 ±11.47 9 – 71	0.206	1.25 [0.88–1.77]
Alter bei Diagnose (n=600)	n=105	n=255	n=240		
< = 16 (A1)	9 (8.60%)	25 (9.80%)	37 (15.42%)	0.029	0.57 [0.35–0,94]
17–40 (A2)	76 (72.40%)	195 (76.47%)	175 (72.92%)	0.567	1,13 [0.78-1,64]
> 40 (A3)	20 (19.00%)	35 (13.73%)	28 (11.66%)	0.229	1,36 [0.83-2,22]
Lokalisation der Entzündung (n=596)	n=106	n=263	n=227		
Terminales Ileum (L1)	18 (16.98%)	41 (15.59%)	29 (12.78%)	0.342	1,30 [0.80-2,10]
Kolon (L2)	17 (16.04%)	38 (14.45%)	21 (9.25%)	0.057	1,72 [1,01-2,93]
Ileokolon (L3)	69 (65.09)	180 (68.44%)	173 (76.21%)	0.026	0,65 [0,44-0,95]
Oberes GIT (L4)	2 (1.89%)	4 (1.52%)	4 (1.76%)	1.00	0,92 [0.26-3,30]
Krankheitsverhalt¹ (n=520)	n=84	n=224	n=212		
Nicht- strikturierend, nicht-penetrierend (B1)	27 (32.14%)	63 (28.12%)	41 (19.34%)	0.013	1,72 [1,13-2,62]
strikturierend (B2)	27 (32.14%)	54 (24.11%)	64 (30.19%)	0.371	0,83 [0,55-1,23]
Penetrierend (B3)	30 (35.72%)	107 (47.77%)	107 (50.47%)	0.181	0,79 [0.54-1.14]
Immunsuppressiva² (n=482)	88 (18.26%)	208 (43.15%)	186 (38.59%)	1.00	1.01 [0.64-1.60]
OP (n=348)	57 (16.38%)	155 (44.54%)	136 (39.08%)	0.858	0.96 [0.66-1.38]

Fisteln (n=301)	46 (15.28%)	133 (44.19%)	122 (40.53%)	0.607	1.10 [0.77-1.56]
Stenosen (n=380)	67 (17.63%)	162 (42.63%)	151 (39.74%)	0.928	0.98 [0.67-1.42]

Tabelle 25: Assoziationen zwischen *DMBT1*-SNP rs2981745 und Phänotypen bei M. Crohn-Patienten.

Anm.: Die detaillierten Phänotypierungsdaten, basierend auf der Montreal-Klassifikation waren verfügbar. P_T = p-Wert zwischen T-Allelträger und nicht T-Allelträger. OR_T = korrespondierende Odds-Ratio mit einem 95% Konfidenzintervall (KI). Das Alter bei Diagnose ist in Jahren angegeben, mit Standardabweichung, Minimum und Maximum. OP= operativer Eingriff. ¹ Das Krankheitsverhalten wurde anhand der Montreal-Klassifikation festgelegt. Ein strikturierender Krankheitstyp ist definiert als eine Stenose ohne penetrierenden-fistulierenden Verlauf. Die Diagnose einer Stenose beruhte auf endoskopischen, chirurgischen und radiologischen Befunden. ² Bei den immunsuppressiven Medikamenten handelt es sich um Azathioprine, 6-Mercaptopurine, 6-thioguanine, Methotrexat und/oder Infliximab. ³ Nur operative Eingriffe, die aufgrund des M. Crohns indiziert waren (z.B. Ileozökumresektion, Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie) wurden berücksichtigt.

Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für den *DMBT1*-SNP rs2981804

Für den SNP rs2981804 zeigten sich hinsichtlich Alter bei Erstdiagnose, Lokalisation der Entzündung, Krankheitsverhalt, Einsatz von Immunsuppressiva, operative Eingriffe, Fisteln und Stenosen keine signifikante Assoziationen mit einem der drei Genotypen AA, GA und GG bei der C. ulcerosa.

<i>DMBT1</i> rs2981804	(1) n=197	(2) n=307	(3) n=122	P_A	OR_A [95% CI]
Genotyp	AA	GA	GG		
Alter bei Diagnose (n=598)	27.56 ± 11.91 11–73	28.09 ± 12.33 7–78	28.46 ± 12.61 6–71	0.659	1.09 [0.76-1.57]
Alter bei Diagnose (n=598)	n=190	n=291	n=117		
≤16 (A1)	19 (10.00%)	38 (13.06%)	14 (11.97%)	1,000	0,98 [0.53-1,84]
17-40 (A2)	149 (78.42%)	212 (72.85%)	83 (70.94%)	0,409	1,23 [0.79-1.93]
> 40 (A3)	22 (11.58%)	41 (14.09%)	20 (17.09%)	0.296	0.73 [0.42-1.27]
Lokalisation (n= 594)	n=188	n=290	n=116		
Terminales Ileum	26	41	21	0.307	0.73

(L1)	(13.83%)	(14.14%)	(18.10%)		[0.43-1.26]
Kolon	21	37	18	0.356	0.75
(L2)	(11.17%)	(12.76%)	(15.52%)		[0.42-1.33]
Ileokolon	137	208	75	0.113	1.42
(L3)	(72.87%)	(71.72%)	(64.66%)		[0.92-2,18]
Oberes GIT	4	4	2	1,000	0,97
(L4)	(2.13%)	(1.38%)	(1.72%)		[0.20-4,63]
Krankheits- verhalt¹	n=167	n=249	n=103		
(n= 519)					
Nicht- strikturie- rend, nicht stenosierend	41 (24.55%)	65 (26.21%)	25 (24.27%)	0.899	1,07 [0.65-1.76]
(B1)					
Strikturierend	44 (26.35%)	75 (29.84%)	25 (24.27%)	0.461	1,25 [0.76-2,06]
(B2)					
Penetrierend	82 (49.10%)	109 (43.95%)	53 (51.46%)	0.323	0,80 [0.52-1.23]
(B3)					
Immunsup- pressiva²	152 (77,2%)	235 (76,5%)	93 (76,2%)	0,905	1,03 [0.65-1.65]
(n= 480)					
OP	113 (57,4%)	172 (56,0%)	62 (50,8%)	0.265	1,26 [0.85-1.87]
(n= 347)					
Fisteln	102 (51,8)	138 (45,0)	61 (50,0)	0.687	0,90 [0.61.1,35]
(n= 301)					
Stenosen	121 (61,4%)	179 (58,3%)	78 (63,9%)	0.410	0.83 [0.55-1,25]
(n= 378)					

Tabelle 26: Assoziationen zwischen *DMBT1*-SNP rs2981804 Genotypen und Phänotypen bei M. Crohn-Patienten.

Anm.: Die detaillierten Phänotypierungsdaten, basierend auf der Montreal-Klassifikation waren verfügbar. P_A = p-Wert zwischen T-Allelträger und nicht T-Allelträger. OR_A = korrespondierende Odds-Ratio mit einem 95% Konfidenzintervall (KI). Das Alter bei Diagnose ist in Jahren angegeben, mit Standardabweichung, Minimum und Maximum. OP= operativer Eingriff. ¹ Das Krankheitsverhalten wurde anhand der Montreal-Klassifikation festgelegt. Ein strikturierender Krankheitstyp ist definiert als eine Stenose ohne penetrierenden-fistulierenden Verlauf. Die Diagnose einer Stenose beruhte auf endoskopischen, chirurgischen und radiologischen Befunden. ² Bei den immunsuppressiven Medikamenten handelt es sich um Azathioprine, 6-Mercaptopurine, 6-thioguanine, Methotrexat und/oder Infliximab. ³ Nur operative Eingriffe, die aufgrund des M. Crohns indiziert waren (z.B. Ileozökumresektion, Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie) wurden berücksichtigt.

5.4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen des *DMBT1*-Gens mit der *C. ulcerosa*

*Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für den *DMBT1*-SNP rs2981745*

Analog zu den Genotyp-Phänotyp-Analysen für den SNP rs2981745 bei M. Crohn-Patienten, zeigen sich einzelne Assoziation bei T-Allelträger hinsichtlich Alter des Patienten bei Erstdiagnose und Lokalisation der Entzündung (linksseitige Kolitis und extensive Kolitis) in der *C. ulcerosa*-Gruppe. Im Einzelnen handelt es sich um folgende Assoziationen: eine statistische Signifikanz (p -Wert= 0.4×10^{-2} , OR=0.46, 95% KI [0.26-0.79]) zeigte sich für das mittlere Alter bei Erstdiagnose, wobei sowohl TT-Träger als auch CT-Träger jünger waren als CC-Träger (Mittleres Alter +/- SD: 28.32 Jahren, 29.95 Jahren und 34.79 Jahren). Weitere Assoziationen wurden hinsichtlich der Lokalisation der Entzündung nachgewiesen. Für T-Allelträger zeigte sich seltener eine linksseitige Kolitis im Vergleich zu Nicht-T-Allelträger (p -Wert= 3×10^{-2} , OR=0,54, 95% KI [0,32-0,91]). Dafür waren mehr T-Allelträger von einer Pankolitis betroffen als Nicht-T-Allelträger (p -Wert= 3.5×10^{-2} , OR=1,79, 95% KI [1,06-3,00]). Andere phänotypische Kriterien wie Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Body-Mass-Index, extraintestinale Manifestationen, Einsatz von Immunsuppressiva und Abszesse zeigten keine Assoziationen mit den Genotypen von rs2981745. Die Tabelle 31 stellt die genaueren Analysen zu Genotyp-Phänotyp-Korrelationen mit p -Wert und Odds Ratio dar.

DMBT1 rs2981745	(1) n=49	(2) n=137	(3) n=97	P_T	OR_T [95% CI]
Genotypen	TT	CT	CC		
Geschlecht (n=283)					
Männlich	30 (61,20%)	73 (53.28%)	47 (48,45)	0.316	1,32 [0.81-2,15]
Weiblich	19 (38,80%)	64 (46.72%)	50 (51,55)		
Alter (n=283) Mittelwert ± SD Min. – Max.	39.67±11.43 21–68	43.34 ±15.15 18–82	49.07 ±14.88 24–89	0.001	0.44 [0.25-0.74]
Alter bei Diagnose (n=267)					
Mittelwert ± SD	28.32± 10.57	29.95± 13.08	34.79± 15.30	0.004	0,46 [0,26-0,79]
Min. – Max	12 – 58	4 – 73	9 – 81		
Alter bei Diagnose (n=267)					
≤16 (A1)	4 (8.51%)	13 (10.00%)	7 (7.78%)	0,821	1.26 [0.50-3,16]
17-40 (A2)	37 (78.72%)	95 (73.08%)	59 (65.56%)	0.151	1,54 [0.89-2,67]
> 40 (A3)	6 (12.77%)	22 (16.92%)	24 (26.66%)	0.049	0,52 [0.28-0,96]
BMI (kg/m²) (n=209)					
Mittelwert ± SD	24.29± 6.83	23.45± 3.73	24.31± 4.15	0.473	0.81

Min. – Max	15-54	15-37	16-41		[0.44-1.48]
Lokalisation (n=260)	n=44	n=128	n=88		
Proktitis (E1)	4 (9,09%)	12 (9,38%)	8 (9,09%)	0,829	1,02 [0.42-2.50]
Linksseitige Kolitis (E2)	11 (25%)	44 (34,38%)	41 (46,59%)	0.030	0,54 [0,32-0,91]
Extensive C. ulcerosa (E3)	29 (65,91%)	72 (56,25%)	39 (44,32%)	0.035	1,79 [1,06-3,00]
Extraintestinale manifestationen (n=55)	14 (28,6%)	23 (16,8%)	18 (18,6%)	0.872	1.09 [0.58-2,04]
Immunsuppressiva¹ (n=202)	38 (77,6%)	95 (69,3%)	69 (71,1%)	0,889	1.02 [0.59-1,75]
Abszesse (n=12)	3 (6,1%)	5 (3,6%)	4 (4,1%)	1.00	1,04 [0.31-3.56]

Tabelle 27: Assoziationen zwischen den *DMBT1*-SNP rs2981745 Genotypen und Phänotypen bei C. ulcerosa-Patienten.

Anm.: Die detaillierten Phänotypierungsdaten, basierend auf der Montreal-Klassifikation waren verfügbar. P_T = p-Wert zwischen T-Allelträger und Nicht-T-Allelträger. OR_T = korrespondierende Odds-Ratio mit einem 95% Konfidenzintervall (KI). Das Alter bei Diagnose ist in Jahren angegeben. ¹ Bei den immunsuppressiven Medikamenten handelt es sich um Azathioprine, 6-Mercaptopurine, 6-Thioguanine, Methotrexat und/oder Infliximab.

5.5 Epistasis: Untersuchung von Gen-Gen-Interaktionen zwischen den *DMBT1*-Gen und weiteren Suszeptibilitätsgenen für CED

Ziel dieser Untersuchung war es, Interaktionen zwischen *DMBT1*-Polymorphismen und Polymorphismen von Genen, die bereits mit der CED-Entstehung assoziiert wurden, zu untersuchen und zu analysieren, ob dadurch die Suszeptibilität für CED erhöht wird.

Nachdem die Arbeitsgruppe von Renner (226) die Rolle von *DMBT1* bei der CED-Pathogenese wahrscheinlich erschienen lies und wir signifikante Assoziationen von *DMBT1*-Polymorphismen sowohl mit M. Crohn als auch mit der C. ulcerosa nachgewiesen haben, stellte sich die Frage, ob diese genetischen Varianten möglicherweise auch mit Polymorphismen von bereits mit CED in Verbindung gebrachten Genen interagieren. Hierfür analysierten wir die Interaktion der *DMBT1*-Polymorphismen als Erstes mit den drei wesentlichen, mit M. Crohn assoziierten *NOD2*-Polymorphismen p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsinsC (225). Zweitens untersuchten wir die Interaktion der *DMBT1*-Polymorphismen mit den vor Kurzem von unserer Arbeitsgruppe assoziierten Varianten des *IL23R*-Gens rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026=p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965 (169). Drittens analysierten wir die Epistasis der *DMBT1*-Varianten mit Polymorphismen im *IL27*-Gen, welche als protektiver Faktor für die Schleimhautbarriere eine Rolle bei CED spielt und Einfluss auf die *DMBT1*-Expression hat (115, 122).

5.5.1 Epistasis-Analyse bezüglich dem *NOD2*-Gen

Rosenstiel et al. (227), haben bereits demonstriert, dass bei homozygoten Trägern der mit M. Crohn assoziierten *NOD2*-L1007fsinsC-Mutation im Vergleich zu *NOD2*-Wildtyp-Patienten eine deutlich reduzierte *DMBT1*-Expression in den Epithelzellen zu messen war. Somit ist es auch denkbar, dass Mutationen im *DMBT1*-Gen zusammen mit Mutationen im *NOD2*-Gen die Suszeptibilität für den M. Crohn erhöhen.

Die folgende Tabelle 32 macht allerdings deutlich, dass es keine signifikanten Assoziationen zwischen den SNPs rs2981745 und rs2981804 des *DMBT1*-Gens und den drei SNPs des *NOD2*-Gens gibt.

<i>NOD2</i> SNP	<i>DMBT1</i> rs2981745 Epistasis M. Crohn/C. Ulcerosa	<i>DMBT1</i> rs2981804 Epistasis M. Crohn/C. ulcerosa
rs2066844=p.Arg702Trp	0.9686/0.7862	0.1936/0.8109
rs2066845=p.Gly908Arg	0.0938/0.7779	0.0926/0.8890
rs2066847=p.Leu1007fsX1008	0.5842/0.7442	0.7476/0.8634

Tabelle 28: Analysen für die Epistasis zwischen *NOD2*-SNPs rs2066844=p.Arg702Trp, rs2066845=p.Gly908Arg und rs2066847=p.Leu1007fsX1008 und *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2381808 bezüglich der Suszeptibilität für M. Crohn bzw. für die C. ulcerosa

5.5.2 Epistasis-Analyse bezüglich dem *IL23R*-Gen

Auch für die Polymorphismen des *IL23R*-Gens zeigten sich von einer Ausnahme abgesehen keine Assoziationen mit den beiden *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804. *IL23R*-SNP rs1004819 zeigte eine schwache statistische Signifikanz bezüglich Suszeptibilität der C. ulcerosa für beide SNPs mit einem p-Wert von 4.15×10^{-2} und 3.13×10^{-2} für rs2981745 bzw. rs2981804. Diese Signifikanzen hielten allerdings der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen nicht stand.

<i>IL23R</i> SNP	<i>DMBT1</i> rs2981745 Epistasis M. Crohn/C. ulcerosa	<i>DMBT1</i> rs2981804 Epistasis M. Crohn/C. Ulcerosa
rs1004819	0.2764/ 0.0415	0.3253/ 0.0313
rs7517847	0.9675/0.9409	0.7367/0.6524
rs10489629	0.1165/0.3355	0.6489/0.8983
rs2201841	0.1846/0.4192	0.6615/0.7864

rs11465804	0.7368/0.3675	0.7950/0.5429
rs11209026= p.Arg381Gln	0.9027/0.3790	0.8225/0.6761
rs1343151	0.1977/0.5978	0.9198/0.7425
rs10889677	0.1381/0.3627	0.5891/0.6413
rs11209032	0.3867/0.8489	0.5732/0.3158
rs1495965	0.9098/0.8099	0.3833/0.5429

Tabelle 29: Analysen für die Epistasis zwischen den *IL23R*-SNPs rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026=p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965 und die zwei *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 bezüglich der Suszeptibilität für M. Crohn bzw. für die C. ulcerosa

5.5.3 Epistasis-Analyse bezüglich dem *IL27*-Gen

Auch mit dem mit M. Crohn assoziiertem Polymorphismus des *IL27*-Gens rs151181 zeigten sich keine signifikanten Assoziationen mit den *DMBT1*-Varianten.

<i>DMBT1</i> SNPs	<i>IL27</i> SNP rs151181: Epistasis M. Crohn/C. ulcerosa
rs2981745	0.8351/0.9995
rs2981778	0.5009/0.9995
rs11523871=p.Pro42Thr	0.5182/0.9995
rs3013236=p.Leu54Ser	0.7073/0.9996
rs2981804	0.1399/0.9998
rs2277244=p.His585Tyr	0.5023/0.9977
rs1052715=p.Pro1707Pro	0.3991/0.9911

Tabelle 30: Analysen für die Epistasis zwischen den *IL27*-SNP rs151181 und die sieben *DMBT1*-SNPs rs2981745, rs2981778, rs11523871=p.Pro42Thr, rs3013236=p.Leu54Ser, rs2981804, rs2277244=p.His585Tyr, rs1052715=p.Pro1707Pro bezüglich der Suszeptibilität für M. Crohn und für die C. ulcerosa.

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend können aus den durchgeführten genetischen Analysen folgende Aussagen getroffen werden:

- Von den insgesamt sieben untersuchten *DMBT1*-Polymorphismen (rs2981745; rs2981778; rs11523871; rs30132336; rs2981804; rs22772244 und rs1052715) zeigen vier SNPs (rs2981745; rs11523871; rs30132336; rs2981804) statistisch signifikante Assoziationen mit M. Crohn, davon einer ebenfalls mit C. ulcerosa (rs2981745). Zusätzlich zeigt ein SNP eine Assoziation ausschließlich mit C. ulcerosa (rs1052715) und ein SNP ausschließlich eine Assoziation mit M. Crohn (rs11523871).
- Assoziationen zeigen sich für M. Crohn mit p-Werten zwischen 0,015 und $3,0 \times 10^{-7}$ und zwischen $2,5 \times 10^{-3}$ und $2,5 \times 10^{-4}$ für die C. ulcerosa.
- Für den SNP rs2981804 kann die stärkste statistische Assoziation mit M. Crohn nachgewiesen werden ($p=3,0 \times 10^{-7}$ und OR 1,42, 95% KI [1,42-1,63]). Zudem zeigt sich eine starke Assoziation mit der C. ulcerosa ($p=2,5 \times 10^{-3}$ und OR 1,31 95% KI [1,08-1,58]). Die Assoziationen für diesen SNP rs2981804 zeigen, dass Allel A als *risk-allele* bezeichnet werden kann (OR >1,0).
- Stärkste statistische Assoziation für die C. ulcerosa wurde für den SNP rs2981745 mit $p=2,5 \times 10^{-4}$ und OR 1,50, 95% KI [1,24-1,82] erhoben. Für den M. Crohn zeigte diesen SNP ebenfalls eine signifikante Assoziation ($p=7,7 \times 10^{-3}$ und OR 1,21, 95% CI [1,05-1,39]). Für den SNP 2981745 zeigt sich eine höhere MAF (T) sowohl für die C. ulcerosa als auch für den M. Crohn, was für eine höhere Empfänglichkeit für beide Erkrankungen bei vorhandener Mutation spricht (OR>1,0)
- Die schwächste statistisch signifikante Assoziation mit dem M. Crohn zeigt sich für den SNP rs11523871 ($p=0,043$, OR 0,86, 95% KI [0,75-0,99]). Entsprechend dazu wurde bei der C. ulcerosa die schwächste signifikante Assoziation mit dem SNP rs2981804 nachgewiesen ($p=2,5 \times 10^{-3}$ und OR 1,31, 95% KI [1,08-1,58]).
- Für die Mutationen rs11523871 und rs3012236 wurden niedrigere MAF (jeweils C-Allel) im M. Crohn-Kollektiv, für SNP rs3013236 auch im C. ulcerosa-Kollektiv erhoben. Diese Unterschiede deuten auf einen schützenden Effekt dieser Mutationen für die Entstehung eines M. Crohns im Falle des SNP rs11523871 und für die Entstehung von M. Crohn und von der C. ulcerosa im Falle des SNP rs3013236 hin.
- SNP rs2277244 zeigt weder für M. Crohn noch für die C. ulcerosa Assoziationen ($p=0,093$ bzw. $p=0,70$).
- Die Berechnung des Kopplungsungleichgewichts der *DMBT1*-SNPs ergaben starke Kopplungsungleichgewichte für alle SNPs außer SNP rs1052715, welche insgesamt in den zwei Patientenpopulationen und in der Kontrollgruppe ähnlich ausfielen.

-
- Alle berechneten Haplotypen waren ausnahmslos hoch signifikant sowohl mit M. Crohn als auch mit der C. ulcerosa assoziiert. Es zeigten sich insgesamt höhere statistische Signifikanzen in der M. Crohn-Gruppe als in der C. ulcerosa-Gruppe. Die stärkste Assoziation zeigte sich für den Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2981778-rs11523871-rs3013236-rs2981804-rs2277244-rs1052715 für M. Crohn (p -Wert= 6.14×10^{-18}). In der Gruppe der C. ulcerosa-Patienten zeigte der Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2981778 mit einem p -Wert von 1.37×10^{-11} .
 - Es zeigten sich in der M. Crohn-Gruppe und in der C. ulcerosa-Gruppe für bestimmte Charakteristika (Alter bei Erstdiagnose, Entzündung vom nicht-strikturieren, nicht-fibrosierendem Typ, Lokalisation im Ileokolon bzw. Lokalisation im linksseitigem Kolon und extensive Kolitis) schwache Assoziationen zwischen SNP rs2981745 und M. Crohn bzw. C. ulcerosa. Der *DMBT1*-SNP rs2981745 ist assoziiert mit einem jüngeren Alter bei Erstdiagnose für T-Allelträger im Vergleich zu Nicht-T-Allelträger bei M. Crohn-Patienten (p -Wert= 2.9×10^{-2}). Weiterhin waren T-Allelträger signifikant seltener im Ileokolon erkrankt als Nicht-T-Allelträger (p -Wert= 2.6×10^{-2}). Auch zeigen T-Allelträger des rs2981745 häufiger einen klinisch nicht-strikturierenden, nicht-fibrosierenden Subphänotyp im Vergleich zu Nicht-T-Allelträger bei M. Crohn (p -Wert= 1.3×10^{-2}). Bei C. ulcerosa-Patienten waren für den *DMBT1*-SNP rs2981745 T-Allelträger signifikant jünger als Nicht-T-Allelträger bei Erstdiagnose (p -Wert= 0.1×10^{-2}). Bezüglich der Lokalisation der Entzündung waren T-Allelträger seltener an einer linksseitigen Kolitis erkrankt (p -Wert= 3×10^{-2}), während sie häufiger an einer Pankolitis erkrankt waren als Nicht-T-Allelträger (p -Wert= 3.5×10^{-2}). Diese Assoziationen haben sich allerdings nach Bonferroni-Korrektur als nicht-signifikant erwiesen. Für SNP rs2981804 wurden keine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp gefunden.
 - Es zeigten sich keine statistisch relevanten Interaktionen zwischen den drei *NOD2*-Gen-Varianten rs2066844=p.Arg702Trp, rs2066845=p.Gly908Arg und rs2066847=p.Leu1007fsX1008 und den *DMBT1*-Varianten rs2981745 und rs2981804.
 - Auch zwischen dem *IL27*-SNP rs151181 und den sieben *DMBT1*-SNPs zeigte sich keine Epistasie.
 - Allein zwischen dem *IL23R*-SNP rs1004819 und den *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 in der C. ulcerosa-Gruppe wurden schwach signifikante p -Werte berechnet bezüglich Krankheitssuszeptibilität. Diese konnten allerdings nach Bonferroni-Korrektur nicht bestätigt werden. Für alle weiteren 9 *IL23R*-SNPs zeigten sich keine Interaktion mit den zwei *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 sowohl für M. Crohn als auch für C. ulcerosa.

6 Diskussion

6.1 Kritische Evaluation des Studiendesigns und der Genotypisierungsmethode

Kritische Evaluation von Assoziationsstudien

Genetische Assoziationsanalysen sind wie Kopplungsanalysen Ansätze zur systematischen Suche nach Suszeptibilitätsgenen für die Entstehung komplexer Erkrankungen mit polygenem Erbgang. Diese werden dazu eingesetzt, statistische Zusammenhänge zwischen genetischen Variationen und definierten qualitativen oder quantitativen Merkmalen (z.B. einen Krankheitsbild) zu erforschen. Eine Kandidatengenanalyse ist eine Assoziationsstudie, bei der ausgesuchte Polymorphismen von Genen typisiert werden, von denen postuliert wird, dass sie durch ihre Funktion im Körper eine Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung spielen könnten.

SNPs sind die am häufigsten verwendeten Marker für die Untersuchung von Assoziationen. Bei der Auswahl der zu untersuchenden SNP wird üblicherweise auf die Bedeutung der Mutation im Gen geachtet, um entdeckte Assoziationen molekularbiologisch auch interpretieren zu können. Die Substitution eines Nukleotids kann verschiedene Auswirkungen auf die Funktion des Gens haben. Liegt die Mutation in einer nicht kodierenden Sequenz, kann die Mutation innerhalb regulatorischer Genbereiche, z.B. im Promoter, Auswirkungen über die Genregulation ausüben. Liegt hingegen die Mutation innerhalb eines kodierenden Abschnittes, kann durch Veränderungen der Proteinsequenz (z.B. Einbau falscher Aminosäuren, verkürzter Proteinsequenz) eine fehlerhafte Funktion des Proteins resultieren. Somit sind SNPs, die Einfluss auf Funktion oder Regulation des Gens ausüben, für die Durchführung von Assoziationsstudien gut geeignet, da signifikante Assoziationen durch pathophysiologische Zusammenhänge gestützt werden können.

Übliche Studiendesigns für genetische Assoziationsstudien sind Fallkontrollstudien, für die Kontrollen aus der Allgemeinpopulation ausgesucht werden. Durch die relativ einfache Anwendung der Hochdurchsatzuntersuchungen ist die Zahl der genetischen Assoziationsstudien in den letzten Jahren drastisch gestiegen. So wurden allein zwischen 2007 und 2009 durch GWAS annähernd 1000 SNPs identifiziert, die mit Erkrankungen assoziiert wurden (241). Die beispiellose Zunahme dieser genetischen Analysen, verbunden mit einer hohen Rate an nicht eindeutig replizierbaren Ergebnisse, hat Skepsis hinsichtlich der Validität solcher Assoziationsstudien aufkommen lassen. So konnte z.B. die Forschungsgruppe um Ioannidis in einer Metaanalyse mit 370 Assoziationsstudien (mit insgesamt 36 signifikante Assoziationen) zeigen, dass Ergebnisse der ersten Studien nur moderat mit Ergebnissen aus darauf folgenden Replikationsstudien korrelierten (242).

Die Inkonsistenz von Ergebnisse aus Assoziationsstudien beruht auf verschiedenen Einflussfaktoren. Finden sich statistisch signifikante Assoziationen des untersuchten Markers (z.B. einen SNP) mit der untersuchten Erkrankung, kommen zunächst drei mögliche Interpretationen in Frage.

1. Es besteht tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen SNP und Erkrankung.
2. Der untersuchte Polymorphismus befindet sich im Kopplungsungleichgewicht mit der tatsächlich kausalen genetischen Variation. In diesem Fall ist der untersuchte Polymorphismus lediglich mit dem im kausalem Zusammenhang stehenden Marker benachbart und wird durch genetische Kopplung zusammen mit diesem relevanten Marker vererbt. Diese Konstellation kann auch einen Vorteil darstellen und wird zunehmend zur Aufdeckung häufiger Kopienzahlpolymorphismen im Genom genutzt, da durch die Typisierung bekannter häufiger SNPs Kopienzahlpolymorphismen miterfasst werden können (243, 244).

3. Es handelt sich um falsch-positive Ergebnisse. In diesem Fall beruht die scheinbare Assoziation auf einem *Confounder*. Hierbei versteht man verschiedene, nicht erfasste Störfaktoren, die sowohl mit dem untersuchten Polymorphismus als auch mit der Erkrankung assoziiert sind. Man spricht von Populationsstratifizierung, wenn die Studienpopulation aus verschiedenen genetischen Subpopulationen besteht und somit Variationen in Krankheitsrisiko und Allelfrequenzen auftreten. Der tatsächliche Einfluss der Populationsstratifizierung für die Validität von Assoziationsstudien ist unter Forschern umstritten. Eine sorgfältige Zusammenstellung der Studienpopulation mit Kenntnissen über ethnische Herkunft sollte diesen *Confounder* allerdings gering halten. Andere Möglichkeit bieten Familien-Fallkontrollstudien, in der die Kontrollen Verwandte der Patienten sind. Somit wird die genetische Homogenität gewährleistet. Dieses Studiendesign ist allerdings kosten- und zeitaufwendig (245-248). Weitere Störfaktoren der Replizierbarkeit einer Assoziationsstudie entstehen durch Studiendesign mit ungenügender Power. So kann beispielsweise eine inadäquate Größe der Studienpopulationen kleine Assoziationen nicht ausreichend präzise detektieren und somit falsch-negative Ergebnisse liefern. Dahingegen kann eine zu große Kontrollgruppe zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Eine weitere Erklärung für die Variabilität der Ergebnisse ist eine inhomogen durchgeführte Genotypisierungsmethode, die zu einer systematisch falschen Zuordnung der Genotypen führt. Hierfür sollte die Genotypisierung unter gleiche Bedingungen mit standardisierten laborchemischen Prozeduren für alle Studiengruppen erfolgen.

Zuletzt sollte darauf geachtet werden, dass sich die Genotypverteilung in der Kontrollgruppe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet, um systematische Fehler bei der Populationszusammenstellung weitgehend ausschließen zu können (245).

Kritische Evaluation des eigenen Studiendesigns

Bei der hier vorgestellten Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Kandidatengenanalyse, bei der die Allel- und Genotypverteilung sieben ausgewählter SNPs des *DMBT1*-Gens zwischen Patientenpopulation und Kontrollgruppen miteinander verglichen wurden. Das *DMBT1*-Gen kodiert ein Protein mit Bakterienbindungseigenschaften, dessen Rolle in der mukosalen Immunabwehr bereits in einer vorherigen Studie mit der CED-Entstehung in Verbindung gebracht wurde (226).

Wie im Abschnitt 5.1.1 erwähnt, ist die Auswahl der untersuchten SNPs wichtig. In diese Studie wurde zum einen die drei von Renner et al. bereits untersuchten SNPs rs2981745, rs3013236 und rs1052175 ausgewählt. Zusätzlich wurden mittels Daten des internationalen HapMap Projektes vier weitere *DMBT1*-SNPs ausgesucht, um die Haplotypblockorganisation des gesamten *DMBT1*-Gens plus flankierenden 10kb-Region zur Abdeckung potentieller regulatorischer Sequenzen zu berücksichtigen.

Bei den SNPs rs3013236, rs2277244 und rs11523871 handelt es sich jeweils um so genannten *non-synonymous* Mutationen, da die Mutation jeweils zu einem Aminosäureaustausch in einer kodierenden Sequenz führt (rs3013236: T/C Substitution mit p.Leu54Ser-Austausch; rs2277244: C/T Substitution mit p.His585Tyr-Austausch; rs11523871: C/A Substitution mit p.Pro42Thr-Austausch). Die restlichen vier SNPs sind *silent* Mutationen. Dies bedeutet, dass sie keine Veränderung in der Aminosäuresequenz zur Folge haben. Die SNPs rs2981778 und rs2981804 (G/A-Substitution und G/A-Substitution) liegen jeweils in einem Intron. Die SNPs rs2981745 und rs1052715(=p.Pro1707Pro) sind zusätzlich *synonymous* Mutationen, da diese sich in Exons befinden. Ersterer, rs2981745, liegt in der UTR5'-Region im ersten Exon. UTR 5' steht für „untranslatierte Region am 5'-Ende“ der mRNA. Dabei handelt es sich um einen Randbereich der mRNA, der nicht translatiert wird, jedoch verschiedene regulatorische Sequenzen (z.B. Protein-Bindungsstellen für die Stabilität der mRNA und Sequenzen, welche die Initiation der Translation steuern) beinhaltet. Der zweite SNP, rs1052715 (A/G-Substitution mit p.Pro1707Pro) liegt im letzten Exon des Gens.

Bis jetzt sind keine funktionellen Auswirkungen dieser Mutationen beschrieben worden. Mutationen im *DMBT1*-Gen, die zu einer alterierten Aminosäuresequenz für das kodierende Protein führen oder Einfluss auf die Regulation des Gens bewirken, können Auswirkungen auf die Funktion des Proteins haben. Somit sind die ausgewählten SNPs für eine Untersuchung auf mögliche Assoziationen mit CED gut geeignet.

Wie in Abschnitt 5.1.1. dargestellt, sind sorgfältige Einschlusskriterien für die Zusammenstellung der Studienpopulation von großer Bedeutung, um genetische Variationen zu minimieren. Für diese hier vorliegende Kandidatengenanalyse wurden insgesamt 824 Patienten mit M. Crohn, 283 Patienten mit C. ulcerosa und 981 gesunde, nicht verwandte

Kontrollindividuen rekrutiert. Alle drei Populationen waren kaukasischer Herkunft und stammen aus Deutschland. Die demographischen Charakteristika (Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index, Alter bei Diagnosestellung, Dauer der Erkrankung und positive Familienanamnese für CED) wurden retrospektiv durch Analyse der Patientenakten unabhängig vom Genotyp erhoben. Zusätzlich füllten die Patienten vor Einschluss in die Studie einen detaillierten Fragebogen aus. Alter und Geschlecht der Kontrollindividuen fanden in den Patientengruppen Übereinstimmung. Die Diagnose von M. Crohn und C. ulcerosa wurden gemäß etablierter Richtlinien (basierend auf endoskopischen, radiologischen und histopathologischen Befunden) erhoben. Patienten mit einer indeterminierten Colitis wurden von der Studie ausgeschlossen.

Die erhobenen Allel- und Genotypfrequenzen für die Patientengruppe und die Kontrollgruppe waren nach Bonferroni-Korrektur (P-Werte $> 0,05$) in Übereinstimmung mit den berechneten und erwarteten Frequenzen entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Somit stehen die Studienpopulationen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, was systemische Genotypisierungsfehler und systemische Fehler bei der Populationszusammenstellung weitgehend ausschließt.

In der vorliegenden Studie wurden somit die oben beschriebenen möglichen Störfaktoren von Assoziationsstudien durch das Studiendesign so weit wie möglich minimiert, so dass die Ergebnisse als valide zu werten sind. Auch wurde eine relativ große Populationsgröße gewählt (s.o.), sodass die Validität der Daten erhöht wird.

Validität der Genotypisierungsmethode

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Genotypisierung mit dem LightCycler®480 Real-time-PCR-System (Roche® Diagnostics). Dieses Instrument besitzt die Eigenschaft, hochauflösende Schmelzkurvenanalysen durch den Einsatz von Fluoreszenzsonden durchzuführen. In dieser Arbeit wurden FRET-Hybridisierungssonden verwendet, da diese zur Genotypisierung am besten geeignet sind. (siehe Methoden, Absatz 4.3.3).

Die Schmelzkurvenanalyse basiert auf robusten physikalischen Prozessen, insbesondere der temperaturabhängigen DNA-Hybridisierung und Dissoziation von sequenzspezifischen Sonden. Das FRET-Prinzip mit Schmelzkurventechnologie zur Genotypisierung wurde erstmals 1997 von Lay und Wittwer beschrieben (249). Seitdem konnte die Spezifität und Validität dieser Genotypisierungsmethode in mehreren unabhängigen Studien nachgewiesen werden (250, 251). Die Spezifität wird in Studien mit mehr als 95% angegeben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Diskriminierungsquote der Genotypen höher ist als mit anderen Genotypisierungsmethoden, wie z.B. der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse oder der allelspezifischen PCR (252). Die Schmelzkurvenanalyse

wird im Anschluss an die RT-PCR im selben Ansatz durchgeführt. Somit werden DNA-Kontaminationen aus der Umwelt vermieden und die Spezifität der Genotypzuordnung erhöht (253).

Zur Überprüfung der richtigen Zuordnung der Genotypen wurden in dieser Arbeit für jeden SNP alle drei möglichen Genotypen zusätzlich sequenziert.

6.2 Evaluation der Genotypisierung

6.2.1 *DMBT1*-Polymorphismen sind mit CED assoziiert

***DMBT1*- ein Suszeptibilitätsgen für CED**

Unser gegenwärtiges Verständnis der CED-Pathogenese geht von einer Dysregulation des mukosalen Immunsystems in genetisch prädisponierten Individuen mit daraus resultierender anhaltender und inadäquater Entzündungsreaktion gegen Bakterien der Darmflora aus. Evidenz für die Rolle genetischer Faktoren in der CED-Pathophysiologie stammt ursprünglich aus epidemiologischen Daten und wurde bereits im Abschnitt 1.2.1 ausführlich dargestellt. GWAS haben mittlerweile um die 99 Loci identifiziert, denen eine mögliche Rolle bei der CED-Entstehung zugeschrieben wird (121-123, 125, 151). Die Mehrheit dieser Loci beherbergt Gene, die bei mehreren homöostatischen Mechanismen involviert sind: erstens bei Mechanismen der Antigenerkennung (*NOD2*, *TLR4*, *CARD9*), zweitens bei Mechanismen der Th17-Zell-Differenzierung und der adaptiven Abwehr (*IL23R*, *IL27*, *STAT3*, *CCR6*), drittens bei Mechanismen der Autophagie (*ATG16L1*, *IRGM*) und viertens bei Mechanismen für die Aufrechterhaltung der mukosalen Barrierefunktion (151). Zudem wurde *DMBT1* auf Chromosom 10 in der 10q26.13-Region von Renner et al. 2007 als Suszeptibilitätsgen für die Entstehung von M. Crohn identifiziert (226). In dieser Studie zeigte sich ein Deletionspolymorphismus in der SRCR-Domäne im *DMBT1*-Gen, der hochsignifikant mit M. Crohn jedoch nicht mit der *C. ulcerosa* assoziiert ist (226). Interessanterweise wurde das *DMBT1*-Gen bis jetzt nie durch eine GWAS entdeckt. Grund dafür könnte zum einen die besondere Struktur vom *DMBT1*-Gen sein, welche durch repetitive Sequenzen mit hoher genetischer Variabilität charakterisiert ist und dadurch für solche GWAS eventuell unzugänglich ist (226). Zweitens könnte es möglicherweise daran liegen, dass die von Renner gefundene Deletion nicht im Kopplungsungleichgewicht mit den untersuchten SNPs ist. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass Berechnungen zum Kopplungsungleichgewicht soweit nur für drei SNPs bestehen, die ebenfalls von Renner typisiert worden sind (rs2981745, rs3013236, rs1052715). Für die weiteren vier SNPs kann nur vermutet werden, dass diese sich nicht im Kopplungsungleichgewicht mit der Deletion

befinden. Eine ähnliche Situation zeigte sich für den humanen β -*Defensin 2*-Locus, welcher ebenfalls nicht durch GWAS entdeckt wurde, obwohl dieser einen Kopienzahlpolymorphismus ausweist, der hochsignifikant mit M. Crohn assoziiert ist. Der Grund hierfür wurde nicht eindeutig geklärt (254, 255).

DMBT1 wurde seit 1997 durch Studien in der Krebsforschung näher untersucht. Ursprünglich wurde eine Deletion im *DMBT1*-Gen von Mollenhauer et al. in Zusammenhang mit der Entstehung maligner Hirntumoren identifiziert (181). Daraufhin wurde diese Deletion in unabhängigen Studien auch in weiteren epithelialen Tumoren beschrieben. Die Rolle des *DMBT1*-Gens als Tumorsuppressor-Gen wird kontrovers diskutiert und ist bis heute nicht eindeutig geklärt worden (186, 256, 257).

Bereits 14 Jahre zuvor wurde von Ericson und Rundegren ein 300-400 kDA großes Molekül namens *salivary agglutinin* (SAG) aus den Speicheldrüsen isoliert, welches als agglutinierende Substanz für *Streptococcus mutans* im Speichel identifiziert wurde (180). 1997 konnte durch Holmskov das gp-340-Protein aus bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit alveolärer Proteinose identifiziert werden, welches am körpereigenen Surfactant A und D gebunden war. Diese zwei sogenannten Kollektine spielen eine Rolle in der angeborenen Immunantwort (258). Später stellte sich heraus, dass diese drei Proteine, *DMBT1*, SAG und gp-340 drei Isoformen des *DMBT1*-Gens darstellen (187, 206, 214, 258). *DMBT1* kodiert sezernierte Glykoproteine der SRCR-Superfamilie, welche durch das Vorhandensein einer oder mehrerer hochkonservierter cysteinreicher Proteindomänen, sogenannter SRCR-Domänen, charakterisiert werden und erstmals beim *makrophage scavenger receptor* Typ I beschrieben wurden (259). Studien zur Funktion des *DMBT1*-Gens zeigten, dass dieses Gen nicht nur die Fähigkeit besitzt, ein breites Spektrum Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien sowie Viren wie HIV und Influenza A zu erkennen, sondern ebenfalls mit körpereigenen Proteinen zu interagieren. Hauptexpressions- und Syntheseort sind für gp-340 der Respirationstrakt, für SAG die Speicheldrüsen und für *DMBT1* Haut, Magen und Dünndarm, also jeweils Organe, die direkt eine Grenzfläche zwischen Organismus und Umwelt darstellen.

Es wurde somit vermutet, dass *DMBT1* eine Rolle in der angeborenen Abwehr spielen könnte. Interessanterweise konnten Mollenhauer et al. bereits 1999 zeigen, dass bestimmte *DMBT1* Bereiche hoher genetischer Variabilität aufweisen. Dabei handelt es sich um einen, in der Normalpopulation vorkommenden Kopienzahlpolymorphismus bezüglich der Anzahl der vorhandenen SRCR-Domäne (188, 193). Es wurde daraufhin postuliert, dass eine Variabilität der SRCR-Domäne eine Beeinträchtigung der Bakterienbindungseigenschaften zu Folge haben könnte. Aufbauend auf diese oben genannten Charakteristika des *DMBT1*-Gens (die Bakterienbindungseigenschaften, den Hauptexpressionsort im Darm und die hohe genetische Variabilität des Gens mit bekanntem Kopienzahlpolymorphismus) waren Renner et

al. die Ersten, die einen Zusammenhang mit CED herstellten. In der 2007 publizierten Studie wurden *DMBT1*-knockt-out-Mausmodelle hergestellt, mRNA-Expressionsstudien durchgeführt und einen Deletionspolymorphismus bei CED-Patienten und Kontrollindividuen untersucht. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation des Deletionspolymorphismus SR47- mit M. Crohn ($p=5,6 \times 10^{-4}$, OR 1,75) jedoch nicht mit der *C. ulcerosa*. Dabei wurde diskutiert, dass eine Deletion im SRCR-Bereich mit daraus resultierender Beeinträchtigung für die Bakterienerkennung eine plausible Erklärung für eine Assoziation mit M. Crohn darstelle. Zusätzlich stellte sich heraus, dass ein Haplotyp, zusammengestellt aus den SNPs rs2981745 und rs3013236, signifikant mit der *C. ulcerosa* assoziiert ist ($p=0,022$ bzw. $0,0036$). Diese Daten sprachen somit dafür, dass *DMBT1* ein potentielles Suszeptibilitätsgen für den M. Crohn als auch für die *C. ulcerosa* darstellte. Weitere Hinweise für die potentielle Rolle des *DMBT1*-Gens in der Pathogenese CED stammen aus Tierexperimenten und aus Expressionsstudien. Diese werden im nächsten Abschnitt ausführlich aufgeschlüsselt.

Die *DMBT1*-SNPs rs2981804 und rs2981745 sind signifikant mit CED assoziiert

Nach dem Nachweis der von Renner et al. gefundenen starken Assoziation zwischen der Deletion SR47- und M. Crohn (226) stellt die hier vorliegende Kandidatenanalyse die bis zum jetzigen Zeitpunkt zweite Untersuchung von Polymorphismen im *DMBT1*-Gen dar. Darüber hinaus ist diese Analyse die erste Studie, die eine Assoziation des *DMBT1* mit *C. ulcerosa* nachweisen konnte.

Wichtigste Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind die statistisch hochsignifikante Assoziationen des SNP rs2981804 mit M. Crohn ($p= 3,0 \times 10^{-7}$) und des SNP rs2981745 mit *C. ulcerosa* ($p= 2,5 \times 10^{-4}$). Für den SNP rs2981804 kommt das *minor allele* A aus der Kontrollgruppe bei M. Crohn-Patienten signifikant häufiger vor als in der Kontrollgruppe (MAF 56,3% vs. 47,5%, OR 1,42 [1,24-1,63]). Somit kann die Aussage getroffen werden, dass rs2981804 mit M. Crohn assoziiert ist und das Allel A als *risk allele* einen prädisponierenden Faktor ist, bzw. Allel G ein schützenden Faktor ist. Parallel dazu kann für rs2981745 die Aussage getroffen werden, dass die signifikante Assoziation mit *C. ulcerosa* einen prädisponierenden Faktor für die Erkrankung darstellt (MAF 41,5% vs. 32,9%, OR 1.50 [1.24-1,82]).

Ebenso statistisch relevant waren für M. Crohn Assoziationen mit rs2981745 ($p=7,7 \times 10^{-3}$), rs3013236 ($p=0,015$) und rs11523871 ($p=0,043$); für *C. ulcerosa* rs2981804 ($p=2,5 \times 10^{-3}$).

SNP rs2981745 zeigt bei M. Crohn eine höhere MAF als in der Kontrollgruppe, sodass hier auch ein krankheitsfördernder Effekt vermutet werden kann (MAF 37,2% vs. 32,9%, OR 1.21 [1.05-1.39]). Für den SNP rs2981804 bei der *C. ulcerosa* zeigt wie bei M. Crohn Allel A die das häufigere Allel Vergleich zur Kontrollgruppe (MAF 54,1% vs. 47,5%, OR 1.31 [1.08-

1,58]), sodass Allel A als *risk allele* bezeichnet werden kann, bzw. ein schützender Effekt des *minor allele* G vermutet werden kann. Für alle anderen Assoziationen für M. Crohn sind die MAF in der Kontrollgruppe häufiger als in der M. Crohn-Gruppe (siehe Tabelle 5.3). Somit kann für diese statistisch relevanten, jedoch schwachen Assoziationen ein krankheitsschützender Effekt der SNPs rs3013236 und rs11523871 für M. Crohn vermutet werden.

Diese hier erhobenen Daten stimmen nicht mit den Daten aus der Assoziationsstudie von Renner et al. überein. Diese Forscher konnten zwar für das Deletionspolymorphismus SR47- im *DMBT1* eine statistisch hoch signifikante Assoziation mit M. Crohn finden ($p=5,6 \times 10^{-4}$), jedoch konnte für rs2981745, rs3013236 und rs1052715 weder eine Assoziation mit M. Crohn noch mit *C. ulcerosa* nachgewiesen werden. Allerdings stellte sich heraus, dass ein Haplotyp bestehend aus SNP rs2981745 und SNP3013236 signifikant häufiger in der *C. ulcerosa*-Gruppe auftrat. Diese Autoren haben diese fehlenden Assoziationen auf einen Mangel an Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Deletionspolymorphismus und den drei oben genannten SNPs interpretiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die sieben untersuchten SNPs unabhängig von diesem Deletionspolymorphismus untersucht. Somit können diese Daten nur unabhängig von diesem interpretiert werden. Für die vier weiteren, von Renner et al. nicht untersuchten SNPs (rs2981804, rs11523871, rs2277244 und rs2981778) liegen noch keine Berechnungen zum Kopplungsungleichgewicht mit dem Deletionspolymorphismus vor. Beim Vergleich der Allelfrequenzen dieser vier SNPs mit den von Renner et al. angegebenen Allelfrequenzen für den Deletionspolymorphismus (M. Crohn: 22%, *C. ulcerosa* 16%, Kontrollen 14%) fällt jedoch auf, dass sich die Allelfrequenzen sehr unterscheiden. Es ist also nicht von einem Kopplungsungleichgewicht zwischen diesen vier SNPs und dem Deletionspolymorphismus auszugehen. Es ist allerdings anzumerken, dass Renner et al. deutlich kleinere Studienpopulationen untersuchten als in der vorliegenden Arbeit (346 Kontrollen, 367 *C. ulcerosa*-Patienten und 368 M. Crohn-Patienten) (226).

Vergleicht man weiterhin die Allelverteilung für den SNP rs2981804 aus unserer Kontrollgruppe mit den erhältlichen Allelfrequenzen aus der dbSNP-Datenbank fällt eine Abweichung auf: In der dbSNP-Datenbank, bestehend aus gesunden amerikanische Probanden nordwesteuropäischer Abstammung (CEU-Cohort), ist Allel G das *minor allele* (Allelfrequenz G 56%) im Gegensatz zu unsere Kontrollgruppe, in der Allel A das *minor allele* ist (Allelfrequenz A 47,5%). Es ist allerdings anzumerken, dass die CEU-Gruppe lediglich aus insgesamt 112 Probanden besteht, während unsere Kontrollgruppe 981 Probanden einschließt, sodass einen Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. Auch fällt auf, dass unsere Kontrollgruppe eine männliche Prädominanz aufweist (63,8%) verglichen mit der dbSNP-Datenbank CEU-Population (49,48%). Dies könnte ebenfalls Einfluß auf die

Allelverteilung ausüben. Somit müssen unsere erzielten Ergebnisse vor diesem Hintergrund kritisch bewertet werden.

Einige DMBT1-Polymorphismen sind im Kopplungsungleichgewicht

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zum ersten Mal starke Kopplungsungleichgewichte zwischen sechs *DMBT1*-SNPs (rs2981745, rs2981778, rs11523871, rs3013236, rs2981804 und rs2277244) sowohl für beide Patientengruppen als auch für die Kontrollgruppe nachweisen, mit Ausnahme vom *DMBT1*-SNP rs1052715, welches nicht im Kopplungsungleichgewicht mit den anderen SNPs steht.

Interessanterweise zeigte sich nur ein schwaches Kopplungsungleichgewicht zwischen SNP rs2981745 und SNP rs2981804 ($r^2=0.24$, 0.18 und 0.17 jeweils für M. Crohn, C. Ulcerosa und Kontrollen), welches eine unabhängige Assoziation beider SNPs mit CED suggeriert.

Interessanterweise findet man in der Hap-Map-Kohorte kein Kopplungsungleichgewicht für den SNP rs2981804 im Gegensatz zu unseren Ergebnisse in der Kontrollgruppe. Möglichweise ist dies auf die leicht abweichende Allelverteilung in unsere Kontrollgruppe zurückzuführen.

Die Bedeutung der DMBT1-Polymorphismen

Der Versuch, eine genauere Charakterisierung der *DMBT1*-SNPs abzugeben, kann Hinweise auf potentielle Konsequenzen dieser Mutation hinsichtlich Transkription und Translation des Gens liefern.

Wichtigste Ergebnisse dieser Studie sind die Assoziationen von rs2981804 mit M. Crohn ($p=3,0 \times 10^{-7}$) und von rs2981745 mit C. ulcerosa ($p=2,5 \times 10^{-4}$).

SNP rs2981804 ist ein G/A-Basenaustausch und liegt in einem Intron. Introns sind nicht kodierende DNA-Abschnitte innerhalb eines Gens, die transkribiert aber nicht translatiert werden. Die Funktion der Introns wird bis jetzt nicht ausreichend verstanden. Forschung der letzten Jahren deuten immer mehr darauf hin, dass Introns eine Schlüsselrolle für die Genregulation und bei der Regulation des alternativen Spleißens spielen (260-262). Das alternative Spleißen ist ein Mechanismus, der sich im Zellkern abspielt und eine komplexe Restrukturierung der prä-mRNA ermöglicht. Die transkribierten Introns werden entfernt, und die Exonabfolge kann durch spezifische Signale bestimmt und reorganisiert werden. Aktuell wird davon ausgegangen, dass aus mindestens 70% der Gene durch alternatives Spleißen multiple mRNAs gebildet werden, was weitgehend zur genetischen Vielfalt beiträgt. In den letzten Jahren wurden mehrere Erkrankungen mit SNPs assoziiert, die sich in regulatorische Sequenzen für das alternative Spleißen befinden und somit einen Einfluss auf die Expression, die Länge und die Funktion des Proteins ausüben (260-262).

Der *DMBT1*-SNP rs2981745 befindet sich in einer so genannten 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) im Exon 1. 5'-UTR sind Bereiche der mRNA, die wie Introns zwar transkribiert, aber nicht translatiert werden. Diese Bereiche, auf der mRNA auch als 5'-*Cap* bezeichnet, beinhalten verschiedene Strukturen, die eine entscheidende Rolle für die Initiation der Translation besitzen und somit eine vorherrschende Rolle für die Regulation der Proteinsynthese spielen. Bei einer Reihe von Erkrankungen wurde entdeckt, dass die zugrunde liegende Mutation (meistens SNPs) durch Beeinträchtigung einer dieser regulatorischen Strukturen die Proteinexpression beeinflusst und somit zur Erkrankung führt (263, 264).

Weitere Assoziationen wurden in der vorliegenden Arbeit für SNP rs3013236 ($p=0,015$) und für SNP rs11523871 mit M. Crohn ($p=0,043$) nachgewiesen.

SNP rs3013236 ist eine C/T-Substitution auf Exon 4. Zurzeit ist nicht vollständig geklärt, für welche Domäne dieses Exon 4 kodiert. Der Basenaustausch resultiert in einer *non-synonymous*-Mutation mit einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Serin. Eine solche Mutation kann durch Einbau einer falschen Aminosäure die Funktion des Proteins direkt beeinflussen. Jedoch scheint es wahrscheinlicher zu sein, dass *non-synonymous*-Mutationen in einem kodierenden Bereich eher zu Abnormalitäten im Prozess des alternativen Spleißens führen (260, 262, 265).

Analog zum SNP rs3013236 führt SNP rs11523871 mit einem A/C-Basenaustausch auf Exon 3 zu einer *non-synonymous*-Mutation mit Threonin- zu Prolin-Austausch. Die Funktion des Exon 3 ist ebenfalls noch nicht bekannt.

Zuletzt handelt es sich bei SNP rs1052715 auf Exon 54 um einer A/G-Substitution, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat und somit als *silent*-Mutation bezeichnet wird (Prolin/Prolin-Austausch). Exon 54 kodiert für die sogenannte Zona Pellucida-Domäne (ZP) des *DMBT1*-Gens. ZP-Domäne sind Sequenzen mit hochkonservierten Cysteinresten, die meistens extrazellulär im C-terminalen Proteinanteil zu finden sind und eine Rolle für die Oligomerisation von extrazellulären Proteinen ausüben (266). Beim *DMBT1*-Gen wird vermutet, dass diese Funktion für die Agglutinierung von Bakterien eine Rolle spielen könnte (192). Anders als früher gedacht, können *silent*-Mutationen möglicherweise auch einen Einfluss auf die Funktion des Proteins ausüben, nicht durch Alteration der kodierenden Sequenzen, sondern auch über Modifikationen im Prozess des alternativen Spleißens.

Es ist wichtig nochmals zu vermerken, dass es sich hierbei trotz statistisch signifikanter Assoziationen wahrscheinlich um Mutationen handelt, die einzeln betrachtet, einen eher schwachen Einfluss für die Entstehung der Erkrankung haben.

M. Crohn und C. ulcerosa: Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich der Risikogene

Aus der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass bestimmte genetische Variationen sowohl mit M. Crohn als auch mit der C. ulcerosa assoziiert sind (rs2981745 und rs2981804). Dagegen zeigen andere SNPs ausschließlich Assoziationen mit M. Crohn (rs115238714, rs2981778, rs3013236). Dies deckt sich mit der allgemeinen Hypothese, dass beide Erkrankungen sowohl durch gemeinsame als auch durch unterschiedliche genetische Faktoren bestimmt werden (168, 267). Zusätzlich zeigen diese sieben hier untersuchten *DMBT1*-SNPs insgesamt stärkere statistische Assoziationen für den M. Crohn als für die C. ulcerosa mit p-Werten zwischen $2,5 \times 10^{-3}$ und $2,5 \times 10^{-4}$ für C. ulcerosa und 0,043 und $3,0 \times 10^{-7}$ für M. Crohn. Diese Beobachtungen spiegeln ebenfalls Ergebnisse der vielen genetischen Studien zur CED-Pathogenese wider, in denen dem M. Crohn ein insgesamt größerer genetischer Einfluss als der C. ulcerosa zugeschrieben wird (4, 49).

Kandidaten-Genanalysen zeigen häufig Assoziationen mit schwachem Einfluss auf die Krankheitspathogenese

Die reelle Bedeutung von Assoziationen ist bei Assoziationsstudien schwierig einzuschätzen, da es sich meistens um genetische Mutationen handelt, die allein nur einen schwachen Einfluss auf die Entstehung von Erkrankungen ausüben. Diese Aussage lässt sich mit dem Beispiel der hochsignifikanten drei Hauptmutationen für den M. Crohn im *NOD2*-Gen (c.2104C>T [p.R702W], c.2722G>C [p.G908R] und c.3020insC [p.Leu1007fsX1008]) beschreiben. Die Assoziationen dieser Mutationen mit M. Crohn konnten in verschiedenen, unabhängigen Studien repliziert werden (268-272). Allerdings konnten Assoziationen nur in Studien mit Populationen europäischer Herkunft nachgewiesen werden. Studien mit Populationen aus Japan, China und Afrika zeigten keine Assoziationen mit diesen drei Hauptmutationen (133-136). Somit wird verständlich, dass statistisch hochsignifikante Assoziationen zum Teil nur in ausgewählten Bevölkerungsgruppen für die Entstehung einer Erkrankung relevant sein können. Dies verdeutlicht, dass bei multifaktoriellen Erkrankungen wie den CED trotz hoher Signifikanz von einem eingeschränkten Effekt einzelner Mutationen auf die gesamte Pathophysiologie auszugehen ist.

Daher ist es notwendig, diese hier gefundenen Assoziationen mit M. Crohn und C. ulcerosa in mindestens einer weiteren unabhängigen Studie zu replizieren. Darüber hinaus ist es sinnvoll, die *DMBT1*-Polymorphismen mit Assoziationen zu CED in Populationen unterschiedlicher Herkunft zu untersuchen, um das Ausmaß dieser Suszeptibilitätsfaktoren besser einschätzen zu können.

6.2.2 Haplotypen im *DMBT1*-Gen zeigen Assoziationen mit CED

Unsere Arbeitsgruppe konnte zum ersten Mal hochsignifikante Assoziationen von Haplotypen im *DMBT1*-Gen mit einer erhöhten Suszeptibilität sowohl für M. Crohn als auch für *C. ulcerosa* nachweisen. Diese Assoziationen waren statistisch hochsignifikant mit p-Werten zwischen $2,04 \times 10^{-3}$ und $6,14 \times 10^{-18}$ (Patientenpopulation vs. Kontrollpopulation) für M. Crohn und p-Werten zwischen $1,67 \times 10^{-2}$ und $1,37 \times 10^{-11}$ für die *C. ulcerosa*. Die stärkste Assoziation mit M. Crohn wurde für den Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2381778-rs11523871-rs3013236-rs2981804-rs2277244-rs1052715 mit einem p-Wert von $6,14 \times 10^{-18}$ gefunden. In der Gruppe der *C. ulcerosa* war der Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2981778 am stärksten assoziiert mit einem p-Wert von $1,37 \times 10^{-11}$.

Starke Assoziationen zeigte auch ein Haplotyp aus den SNP rs2981745 und rs2981804, wodurch die ätiologische Rolle dieser beiden SNPs weiterhin unterstützt wird.

Die Haplotypblockorganisation des gesamten *DMBT1*-Gen konnte somit erfasst werden.

6.2.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zwischen *DMBT1*-Polymorphismen und CED

Für einige der Suszeptibilitätsgene der CED konnte eine Genotyp-Phänotyp-Abhängigkeit gezeigt werden. Prominentestes Beispiel hierfür ist das Suszeptibilitätsgen *NOD2*, bei dem Assoziationen für einige SNPs mit bestimmten klinischen Erscheinungsbildern und Verlaufsformen nachgewiesen wurden (133, 137, 269-271, 273). Als weiteres Beispiel für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation kann der M. Crohn-assoziierte *STAT4*-Polymorphismus rs7574865 erwähnt werden, welcher durch unsere Arbeitsgruppe signifikant mit einem frühen Krankheitsbeginn assoziiert wurde (274).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalyse in den zwei Patientenpopulationen M. Crohn und *C. ulcerosa* für die zwei *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 durchgeführt, basierend auf einer bereits verfügbaren Phänotypisierungsdatenbank. Die Erstellung dieser Datenbank basierte sowohl für M. Crohn als auch für die *C. ulcerosa* auf den Kriterien der Montreal-Klassifikation (14).

Für den *DMBT1*-SNP rs2981745 wurde eine schwache Assoziation mit M. Crohn hinsichtlich des Alters bei Diagnose zwischen T-Allelträgern (Genotypen TT oder CT) und Nicht-T-Allelträgern (Genotyp CC) für die Altersgruppe der unter 16-jährigen nachgewiesen, mit einem jüngeres Alter bei Erstdiagnose (8,6% und 9,8% vs. 15,42% für den CC-Genotyp; p-Wert= $2,9 \times 10^{-2}$, OR=0.57, 95% KI [0.35-0.94]) Ebenso konnte eine schwache Assoziation zwischen T-Allelträgern und einer selteneren Lokalisation der Entzündung im Ileokolon im Vergleich zu Nicht-T-Allelträgern festgestellt werden (p-Wert= $2,6 \times 10^{-2}$, OR=0.65, 95% KI [0.44-0.95]). Letztendlich konnte eine weitere Assoziation zwischen T-Allelträgern und M.

Crohn vom nicht-strikurierendem, nicht-fistulierendem Typ im Vergleich zu Nicht-T-Allelträgern gesehen werden (p-Wert= 0.013, OR= 1.72, 95% KI [1.13-2.62]).

Analog dazu wurden zwischen dem SNP rs2981745 und der *C. ulcerosa* einzelne schwach signifikante Assoziationen nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ein jüngeres Erkrankungsalter bei T-Allelträgern im Vergleich zu Nicht-T-Allelträgern (p-Wert= 0.4×10^{-2} , OR=0,46, 95% KI [0,26-0,79]) und um einen möglichen protektiven Effekt des T-Allels bezüglich der linksseitigen Kolitis (p-Wert= 3×10^{-2} mit OR=0,54, 95% KI [0,32-0,91]). Allerdings waren mehr T-Allelträgern an einer Pankolitis im Vergleich zu Nicht-T-Allelträgern erkrankt (p-Wert= 3.5×10^{-2} mit OR=1,79, 95% KI [1.06-3.00]).

Für den SNP rs2981804 zeigten sich für alle drei Genotypen keine Assoziationen mit M. Crohn hinsichtlich der phänotypischen Eigenschaften.

Es konnten somit einzelne schwach signifikante Genotyp-Phänotyp-Assoziationen nachgewiesen, welche sich aber nach Korrektur nach Bonferroni nicht bestätigten und hiermit nicht als aussagekräftig zu bewerten sind.

6.2.4 Epistasis: Gen-Gen-Interaktionen von *DMBT1* mit *NOD2*, *IL23* und *IL27*

Angesichts der wachsenden Evidenz für die Rolle des *DMBT1*-Gens bei der CED-Pathogenese (151, 214, 226, 227) sind Gen-Gen-Interaktionen mit bereits bestätigten Suszeptibilitätsgenen für CED denkbar. *DMBT1* kodiert wie *NOD2* ein PRRs und spielt daher eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Abwehr (93, 151, 226, 227, 275). Rosenstiel et al. konnten bereits nachweisen, dass *DMBT1* ein mögliches Zielgen von *NOD2* ist, und dass bei homozygoten Trägern der mit M. Crohn assoziierten *NOD2*-L1007fsinsC-Mutation im Vergleich zu *NOD2*-Wildtyp-Patienten eine deutlich reduzierte *DMBT1*-Expression in den Epithelzellen zu messen war (227). Wir untersuchten somit die Epistasis zwischen zwei *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 und den drei *NOD2*-SNPs rs2066844=p.Arg702Trp, rs2066845=Gly908Arg und rs2066847=p.Leu1007fsX1008, welche bereits mehrfach mit CED assoziiert wurden (127, 131, 132, 137, 151). Die Analyse der Epistasis ergab jedoch keine Assoziationen zwischen *DMBT1* und *NOD2*.

Wie bereits unter 1.2.3 besprochen, ist die Rolle der Th17-Zellen in der CED-Pathogenese seit Kurzem in den Mittelpunkt der Forschung gerückt (101, 122, 151, 169). Zwei Zytokine, IL-23 und IL-27, spielen eine besondere Rolle in Prozessen der Th17-Zell-Differenzierung und wurden bereits mit der CED-Pathogenese in Verbindung gebracht (115, 122, 167, 169, 170, 172). Angesichts dieser Tatsache führten wir Epistasis-Analysen zwischen zwei *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 und zehn *IL23R*-SNPs (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026=p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965) durch, welche bis auf eine schwache Assoziation keine statistisch relevante Assoziationen zeigten. Die gefundene Assoziation zeigte sich für den *IL23R*-SNP

rs1004819 mit den zwei *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 sowohl für M. Crohn als auch mit der C. ulcerosa (p-Werte jeweils 0,041 und 0,031). Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe schon 2007 nachweisen, dass es sich bei dem SNP rs1004819 um den am stärksten assoziierten *IL23R*-SNP in der deutschen CED-Population handelt (169). Es ist allerdings zu beachten, dass diese hier nachgewiesene schwache Assoziation nach mehrfacher Testung nicht repliziert werden konnte, so dass erst weitere unabhängige Replikationsstudien nötig sind, um diese Assoziation entweder nachzuweisen oder zu widerlegen.

Es folgte eine Epistasis-Analyse zwischen dem *IL27*-SNP rs151181 und unseren sieben *DMBT1*-SNPs (rs2981745, rs2981778, rs11523871, rs3013236, rs2981804, rs2277244 und rs1052715), welche keine statistisch relevante Assoziationen in beiden Patientenpopulationen ergab. Unsere Arbeitsgruppe konnte allerdings kürzlich neueste Erkenntnisse über die Funktion, die Expression und die Signaltransduktion von IL-27 und seinen Rezeptor in epithelialen Zellen liefern (115). Wir konnten unter anderem zeigen, dass *DMBT1* ein Zielgen von IL27 ist und über die Transkriptionsfaktoren STAT3 und p38 gesteuert wird (115). Es ist somit durchaus vorstellbar, dass *DMBT1*-Polymorphismen die *IL27*-Signalwege beeinflussen und die Suszeptibilität für CED auf diesem Wege erhöhen. Daher ist es von großer Bedeutung, die Epistasis zwischen *DMBT1* und *IL27* in weiteren Studien detaillierter zu untersuchen.

6.3 Hypothesen zur Rolle der *DMBT1*-Polymorphismen in der CED-Pathogenese

6.3.1 Mutationen im *DMBT1*-Gen beeinflussen die Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere

***DMBT1* erkennt Pathogene und verhindert die Invasion von Bakterien**

Die Rolle der PRRs bei der CED-Pathogenese hat sich bereits durch den Zusammenhang von *NOD2*, *CARD9*- und *TLR4*-Mutationen mit CED gezeigt (131, 132, 145, 146). Wie *NOD2* und *TLR4* zählt auch *DMBT1* als Mitglied der SRCR-Superfamilie zu den PRRs und spielt somit eine Rolle für die Immunantwort gegen Pathogene (181). *NOD2* ist ein intrazellulärer PRR, während *TLR4* membrangebunden und *DMBT1* in gelöster Form vorkommt. Beweise für die Interaktionen von SAG mit Bakterien stammen ursprünglich aus der Arbeit von Rundegren und Ericson, in der gezeigt wurde, dass SAG mit *Streptococcus mutans* calciumabhängig agglutiniert und somit eine primordiale Rolle für die Kariesprophylaxe spielt (180, 276-278). Daraufhin wurde durch weitere Studien die Interaktion von SAG mit weiteren Streptokokken und Gram-negativen Bakterien wie *Helicobacter pylori* und *E. coli*

nachgewiesen (204, 206, 210). Für das Maus-Homolog von DMBT1, das CRP-Ductin, wurde zusätzlich eine Interaktion mit *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca* und *Streptococcus pneumoniae* gefunden (205). DMBT1 bindet und agglutiniert nicht nur Bakterien, sondern ist auch fähig, die bakterielle Zellinvasion mit *Salmonella enterica* zu verhindern, wie in einer Studie mit funktionellen Zelllinien (SW480) von Rosenstiel et al. gezeigt werden konnte (227). Bikker und Ligtenberg haben 2004 die bakterielle Bindungsstelle innerhalb der repetitiven SCRC-Domäne des DMBT1-Proteins charakterisiert. Es handelt sich um die GRVEVLYRGSW Aminosäuresequenz, die in allen 14 SCRC-Domänen bis zu 100% Homologie zeigt. Dabei interagieren die einfach-unterstrichenen Aminosäuren unspezifisch mit verschiedenen Bakterien, während die doppelt-unterstrichenen Aminosäuren eher spezifische Bindungen je nach Bakteriengattung einzugehen scheinen (279). Welche Bakterienmuster durch diese Aminosäuresequenz erkannt wird, wurde kürzlich von End et al. entdeckt. Während NOD2 mit MDP interagiert und TLR4 LPS erkennt, handelt es sich für DMBT1/SAG/gp-340 um polysulfatierte und polyphosphorilierte Liganden. Solche Liganden sind beispielsweise Lipoteichonsäuren aus der Zellwand Gram-positiver Bakterien, LPS aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien, oder DNA und Nukleotide. Es handelt sich also insgesamt um Liganden, die auf einem breiten Spektrum von Antigenen vorkommen, sowohl Pathogene als auch körpereigene Strukturen. Dies liefert eine Erklärung für die spezifische Bindung an viele verschiedene Bakterienspezies (280). Ferner wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass die Bakterienbindung mit DMBT1 abhängig von der Erreichbarkeit und der Verfügbarkeit der Phosphatgruppen ist. Die Autoren konnten somit postulieren, dass eine absichtliche Maskierung dieser Phosphatgruppen, wie bereits für verschiedene Salmonellen-Chemotypen nachgewiesen wurde, eine effiziente Methode darstellt, um sowohl die DMBT1-schützende Wirkung zu „überlisten“, als auch um eine Toleranz für apathogene Keime zu induzieren (280). Es ist bereits bekannt, dass Patienten mit M. Crohn einen Verlust der Immuntoleranz gegenüber Bakterien der physiologischen Darmflora aufweisen, wodurch eine inadäquate Immunantwort generiert wird. CED werden allgemein als eine abnorme mukosale Immunantwort gegenüber Kommensalen oder anderen Mikroorganismen angesehen. Es ist denkbar, dass Mutationen im *DMBT1*-Gen möglicherweise durch fehlerhafte Sulfatierungs- oder Phosphorylierungsprozessen zur verminderten Toleranz gegenüber Kommensalen führen und somit zur CED-Entstehung beitragen (81, 280, 281). Wie bereits erwähnt, interagiert DMBT1/SAG/gp-340 ebenfalls mit Viren, wie humanes Immundefizienz-Virus I (HIV-I) und Influenza A-Virus (IAV) (211, 212, 282, 283). Die Interaktion mit dem Glykoprotein gp-120 an der Oberfläche des HIV ist im Gegensatz zur Interaktion mit IAV calciumabhängig. Anders als für die Bindung an Bakterien scheinen die N-Acetylneuraminsäure (NANA)-tragenden Kohlenhydratreste im *DMBT1*-Gen für die Interaktion mit Viren zuständig zu sein (214, 282). Interessanterweise variiert die Anzahl der

NANA auf *DMBT1* zwischen den Individuen, und es ist beobachtet worden, dass eine hohe Anzahl der NANA auf *DMBT1* mit einer höheren Anti-IAV Aktivität des *DMBT1*-Gens einhergeht (211, 214). Ferner konnten zwei Forschungsgruppen nachweisen, dass die anti-HIV-I-Wirkung des Speichels auf die hemmende Eigenschaft von *DMBT1* auf das gp-120-Protein zurückzuführen ist (214, 284, 285).

Wie in Absatz 6.2.2 beschrieben, stellen die hier untersuchten *DMBT1*-SNPs Mutationen dar, die einen direkten Einfluss auf die Proteinsequenz haben oder durch regulatorische Mechanismen in die Proteinsynthese eingreifen. Es ist also durchaus vorstellbar, dass durch spezifische mutationsbedingte Veränderungen Bakterienerkennungsstellen von *DMBT1* modifiziert werden. Dies kann einerseits eine protektive Auswirkung haben, falls sich die Bakterienbindung durch Proteinveränderung verbessert, andererseits ist durch den gleichen Mechanismus auch ein krankheitsfördernder Effekt vorstellbar.

Dies ist gut mit unseren Ergebnissen vereinbar, in denen sich für die unterschiedlichen SNPs statistisch sowohl krankheitsfördernde, als auch krankheitsschützende Tendenzen zeigen.

DMBT1 erkennt körpereigene Proteine

Eine entscheidende Eigenschaft des Immunsystems besteht darin, Harmloses von Pathogenem aber auch Fremdes von Körpereigenem spezifisch zu unterscheiden, was für die Erhaltung der Integrität des Organismus lebensnotwendig ist. Es wurden eine ganze Reihe körpereigener Strukturen beschrieben, die mit *DMBT1*/*SAG*/gp-340 interagieren. Die Interaktion zwischen den Surfactant Proteinen D und A und dem gp-340-Protein wurde bereits 1997 durch Holmskov beschrieben und ist am besten untersucht worden (258). Die Surfactant Proteine A und D sind hydrophile Kollektine, die durch einen kollagenen Anteil und calciumabhängige Lectine charakterisiert sind. Die Surfactant Proteine A und D spielen eine wichtige Rolle in der respiratorischen Immunität, da diese über ihren Kohlenhydraterkennungsbereich (*carbohydrate recognition domain*, CRD) ein breites Spektrum an Bakterien und Viren binden und agglutinieren können. Die Bindung von gp-340 am Surfactant Protein-D ist eine calciumabhängige Protein-Protein-Bindung. Um potentielle additive Effekte beider Proteine gegen das Eindringen von Pathogenen zu evaluieren, wurden Experimente mit dem Influenza A-Virus von Hartshorn et al. durchgeführt (211, 214). Es zeigten sich kooperative Effekte zwischen gp-340 und dem Surfactant Protein-D, die allerdings nicht durch die Bindung von gp-340 auf Surfactant D vermittelt waren, sondern auf eine unabhängige Agglutinierungsaktivität beider Proteine zurückzuführen war. Ferner konnten diese Forscher feststellen, dass sich die Andockstelle für gp-340 und Pathogene auf dem Kohlenhydraterkennungsbereich (CRD) des Surfactant D-Proteins befindet, welche sich jedoch nicht überlappen. Dies bedeutet, dass sich im Falle einer höheren Affinität zwischen gp-340 und Surfactant D-Protein als zwischen Surfactant D-Protein und IAV bzw. zwischen

gp-340 und IAV, die antivirale Aktivität beider Proteine gegenseitig inhibiert. Interessanterweise zeigte sich, dass eine Inkubation vom IAV nur mit dem Surfactant Protein D eine starke Neutrophilen-Immunantwort zur Folge hat. Bei zusätzlicher Inkubation mit gp-340 zeigte sich jedoch eine starke Hemmung dieser Neutrophilen-Immunantwort. Somit war deutlich, dass die Interaktion zwischen gp-340 und dem Surfactant Protein-D sowohl antivirale Effekte potenziert, als auch antiinflammatorische Effekte durch gegenseitige Hemmung zur Folge hat. Dies geschieht möglicherweise im Sinne eines immunmodulierenden Effektes, um Schädigungen durch einen zu starken Entzündungsreiz zu limitieren (214, 286).

Für eine Reihe von anderen körpereigenen Proteinen konnten Interaktionen mit DMBT1/SAG/gp-340 nachgewiesen werden, unter anderen mit IgA, Komplementfaktor C1q, Laktoferrin, Albumin, MUC5B und dem Trefoil Faktor 2. Für die calciumabhängige Bindung von SAG mit dem sekretorischen Antikörper IgA zeigten sich sowohl synergistische antibakterielle Effekte als auch eine Potenzierung ihrer eigenständigen antibakteriellen Aktivität (192, 214, 287, 288). Der Komplementfaktor C1q ist ein lösliches Plasmaprotein und aktiviert entweder durch antikörperabhängige Bindung oder durch direkten Kontakt mit der Oberfläche von Pathogenen den klassischen Weg des Komplementsystems. Dies löst eine Entzündungsreaktion aus, um Krankheitserreger zu neutralisieren, zu opsonisieren und abzutöten. Es ist gezeigt worden, dass eine Interaktion von SAG/gp-340 mit C1q eine Aktivierung des klassischen Komplement-Weges zur Folge hat (215). Obwohl SAG und gp-340 in mukosalen Oberflächen zu finden sind und C1q ein Plasmaprotein ist, wird angenommen, dass beide Proteine im Rahmen einer Entzündungsreaktion in Kontakt kommen könnten, um somit eine Potenzierung im Entzündungsprozess einzuleiten (192).

Ferner sei noch die Bindung von DMBT1/SAG/gp-340 mit Laktoferrin erwähnt. Laktoferrin ist ein eisenbindendes Protein, welches in den Sekretionen aller Säugetiere zu finden ist. Laktoferrin bindet Eisen aus dem lokalen Milieu und verhindert somit die eisenabhängige Bakterienproliferation. Analog zum Immunglobulin IgA, bindet Laktoferrin DMBT1/SAG/gp-340 durch die gleiche Aminosäuresequenz, die für die Bindung von Bakterien an DMBT1/SAG/gp-340 identifiziert wurde (217, 289). Im Gegensatz zur IgA konnte jedoch bewiesen werden, dass die Bindung von Rinder- und Menschen-Laktoferrin an DMBT1/SAG/gp-340 die DMBT1/SAG/gp-340-vermittelte Agglutinierung von *Streptococcus mutans* inhibiert. Carlen et al. fanden heraus, dass eine hohe Konzentration von SAG an der oralen Schleimhautoberfläche die Kolonisation von *Streptococcus mutans* durch Adhäsion fördert, während hohe Konzentrationen in der Speichelflüssigkeit die Kolonisation durch Agglutination verhindert (276). Allerdings zeigten Mitoma et al., dass Laktoferrin die SAG-vermittelte Agglutination von *Streptococcus mutans* in Flüssigkeiten inhibiert, so dass unklar bleibt, welche Wirkung die Bindung von Laktoferrin an SAG für das Immunsystem ausübt.

DMBT1/SAG/gp-340 erkennt körpereigene Proteine, die alle in der angeborenen Immunität involviert sind. Für diese Interaktionen können mehrere Funktionen vermutet werden: Erstens die synergistische Abwehr von Pathogenen in Schleimhäuten, zweitens eine Mitwirkung in Entzündungsprozessen und drittens die Vermittlung der Toleranz körpereigener Strukturen durch immunmodulierende Wirkungen.

DMBT1 ist in entzündeten intestinalen Epithelzellen von M. Crohn-Patienten hochreguliert

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hauptexpressionsorte von *DMBT1/SAG/gp-340* Lungen- und Darmgewebe, insbesondere Dünndarmgewebe, sind. Genauere Analysen mittels immunhistochemischer Untersuchung ergaben, dass die Expression in diesen Organen auf Epithelzellen beschränkt ist (214, 223, 227, 258). In Schleimhautbiopsien aus gesundem Dünndarm und Kolon konnte eine niedrige bis moderate *DMBT1*-Expression in den tiefen bis mittleren Anteilen der Krypten lokalisiert werden. Renner et al. zeigten in einzelnen Biopsien gesunder Individuen zusätzlich eine moderate Expression in den Keimzentren der Peyer'schen Plaques und in den Paneth-Zellen. Zusätzlich zeigte sich eine supranukleäre Lokalisation innerhalb der Epithelzellen, was auf einen luminalen Sekretionsmodus hinweist. Dies stärkt die Hypothese, dass das sekretorische *DMBT1/SAG/gp-340*-Protein als protektiver Faktor für die intestinale Schleimhaut eine Rolle spielt (185, 214, 226). Drei Studien konnten ebenfalls eine bis an die Epitheloberfläche reichende *DMBT1*-Expression sowie zusätzlich zum luminalen Sekretionsmodus einen selteneren basolateralen Sekretionsweg nachweisen, welcher unter anderem in der Haut, in fetalem Gewebe und im mehrschichtigen Plattenepithel des Ösophagus zu finden war (185, 223, 290). Auf die mögliche Bedeutung dieser unterschiedlichen räumlichen und funktionellen Expressionswege wird im nächsten Absatz eingegangen.

Immunchemische Untersuchungen intestinaler Schleimhaut von M. Crohn- und C. ulcerosa-Patienten zeigten eine stark hochregulierte mRNA-Expression von *DMBT1* in den entzündlich veränderten Epithelzellen im Vergleich zur nicht geschädigten Schleimhaut derselben Patienten sowie der Schleimhaut gesunder Kontrollen (227). Intensivierte Analysen machten eine ausgeprägte mRNA-Hochregulierung in der gesamten epithelialen Oberfläche, in Paneth-Zellen sowie in Schleimhautablagerungen ulcerativ-veränderter Bereiche, die bei CED klassischerweise vorkommen, deutlich (226, 227). Paneth-Zellen sind enddifferenzierte intestinale Epithelzellen, die sich auf die Produktion und Sekretion antimikrobieller Peptide wie z.B. Defensine spezialisiert haben und somit eine wichtige Funktion in der mukosalen Abwehr ausüben (93). Auch in den entzündlich veränderten Geweben erkrankter Individuen zeigte sich ein luminaler Sekretionsmodus. Zudem korrelierte die Höhe der *DMBT1*-Expression in Schleimhautbiopsien von M. Crohn- und C.

ulcerosa-Patienten mit dem Grad der Krankheitsaktivität, gemessen an standardisierten Aktivitätsindices für CED (226).

Renner et al. schlussfolgerten, dass die *DMBT1*-Expression in intestinalen Epithelzellen chronisch entzündlicher Schleimhäute spezifisch hochreguliert wird (226).

Auf der Suche nach dem Trigger für diese spezifische Antwort in Epithelzellen von Patienten, fanden Rosentiel et al. heraus, dass die *DMBT1*-Expression durch die proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und LPS induziert werden kann (227).

Diese in vivo-Beobachtungen konnten durch Renner et al. mittels experimenteller Mausmodelle bestätigt werden (226). Diese Forscher konnten nachweisen, dass eine DSS-induzierte Kolitis in *DMBT1*-Wildtyp-Mäusen eine 1,5-fache Erhöhung der *DMBT1*-Expression zur Folge hat. Die DSS-induzierte Kolitis gilt in der Forschung als Model für CED. Dagegen zeigte sich bei *DMBT1*-defizienten Mäusen (*DMBT1*^{-/-}-Mäusen) eine erhöhte Anfälligkeiten für eine DSS-Kolitis im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Außerdem konnte gemessen werden, dass *DMBT1*^{-/-}-Mäusen eine stärkere Expression proinflammatorischer Marker wie IL-6, TNF- α und *NOD2* sowie einen schwereren Krankheitsverlauf (gemessen am Gewichtsverlust und am Ausmaß der epithelialen Schädigung) aufweisen (226, 227). Die hier beschriebenen Ergebnisse aus Tierexperimenten und Expressionanalysen sind Hinweise dafür, dass die *DMBT1*-Expression in Epithelzellen erkrankter Individuen durch proinflammatorische Reize spezifisch getriggert werden kann, was die Rolle von *DMBT1* im mukosalen Immunsystem hervorhebt.

Diese Beobachtungen konnte eine Forschungsgruppe um De Lisle allerdings zum Teil nicht replizieren (291). Zwar konnte eine erhöhte *DMBT1*-Expression in entzündeten Schleimhäuten von Erkrankten nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Krankheitsverlaufes zwischen Wildtypmäusen und *DMBT1*^{-/-}-Mäusen bei der DSS induzierten Kolitis. Erklärungen hierfür suchten die Forscher beim Vergleich der zwar ähnlich aufgebauten, jedoch unterschiedlichen Studienprotokolle. In beiden Studien unterscheiden sich die Mäuse bezüglich ihres genetischen Hintergrundes. Außerdem waren die DSS-Konzentration und Dauer der Verabreichung in beiden Studien unterschiedlich. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass *DMBT1* eine protektive Rolle bei CED spielt, dass aber ein Verlust des Gens begrenzte Effekte bezüglich des Krankheitsgrades bei der künstlich-induzierten Kolitis in Mäuse ausübt (291).

Weitere Hinweise für die Rolle des *DMBT1* in der mukosalen Immunantwort liefern weitere tierexperimentelle Studien, welche eine Erhöhung der *DMBT1*-Expression durch Kolonisation keimfrei-gezüchteter Tiere mit *H. pylori* oder mit Kommensalen gezeigt haben (292, 293). In Analogie zu den *NOD2*^{-/-}-Mäusen, entwickeln *DMBT1*^{-/-}-Mäusen keine spontane Kolitis. Dies deutet eher auf die Rolle von *DMBT1* als protektiver Faktor der intestinalen Schleimhaut hin, der erst im Falle eines Antigenkontaktes relevant wird (226). Es ist allerdings zu beachten,

dass eine Hochregulierung der *DMBT1*-Expression *per se* weder für eine protektive Rolle, noch für eine kausale Beteiligung von *DMBT1* in der CED-Entstehung spricht (226).

Es stellt sich somit die Frage, ob eine Hochregulierung der *DMBT1*-Expression Ausdruck der physiologischen Immunantwort im Rahmen einer Entzündung ist, oder ob diese als einen Versuch der Gegensteuerung zu interpretieren ist und *DMBT1* gar proinflammatorische Eigenschaften besitzt.

Die Regulation von DMBT1 in der Darmschleimhaut ist NOD2- und TL4-abhängig und beeinflusst Mechanismen der Bakterienerkennung und der Bakterieninvasion

Zusätzlich zur Erhöhung proinflammatorischer Faktoren bei *DMBT1*^{-/-}-Mäusen nach DSS-induzierter Kolitis zeigte sich eine Erhöhung der *NOD2*-Expression in Epithelzellen (227). *NOD2* ist ein intrazellulärer Bakteriensensor, der durch MDP spezifisch aktiviert wird und eine NF-κB-vermittelte Entzündungskaskade auslöst. Eine Leserraster-Mutation, L1007fsinsC, die sich in der sogenannten Leucin-reichen Region (LRR) von *NOD2* befindet, wurde mit der Entstehung von M. Crohn assoziiert (128, 273). Es wird derzeit angenommen, dass eine mutationsbedingte Funktionsstörung der *NOD2*-Expression in einer veränderten NF-κB-Signaltransduktion und in einer verminderten Expression wichtiger antibakterieller Faktoren resultiert. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Mutationen im *NOD2*-Gen eine verminderte NF-κB-vermittelte α-Defensin-Expression zur Folge haben (93, 142, 275).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei homozygoten Trägern der *NOD2*-Mutation L1007fsinsC nach Stimulation mit MDP keine erhöhte *DMBT1*-Expression in Epithelzellen messbar ist. Es wurde somit deutlich, dass Zusammenhänge zwischen der *DMBT1*-Expression und dem *NOD2*-Signalweg existieren. Genetische *in vitro* Analysen konnten beweisen, dass die *NOD2*-induzierte MDP-Aktivierung und die TLR4-induzierte LPS-Aktivierung eine *DMBT1*-Expression über den Transkriptionsfaktor NF-κB vermitteln. Somit wurde vermutet, dass *DMBT1* ein Zielgen des Transkriptionsfaktors NF-κB ist. Außerdem konnte in zwei verschiedenen Zelllinien (HEK293 und THP-1) gezeigt werden, dass *DMBT1* die TLR4-induzierte NF-κB-Aktivierung und die MDP-induzierte Interleukin-8 (IL-8)-Sekretion hemmen kann. IL-8 spielt insbesondere durch die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten im entzündeten Gewebe eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess (227).

Zusammengefasst, kann angenommen werden, dass *DMBT1* eine selbstregulatorische Funktion hat und als extrazellulärer Anteil einer regulatorischen homöostatischen Feedbackschleife zur Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere beiträgt. Zum einen könnte die *DMBT1*-vermittelte Bakterienaggregation das Eindringen in die Epithelzellen verhindern. Andererseits könnte *DMBT1* durch Hemmung proinflammatorischer Faktoren überschüssige Entzündungsreize abpuffern oder gar durch Neutralisierung der biologischen Aktivität von

MDP und LPS die Induktion der oralen Toleranz mitsteuern (227). Bei Trägern der L1007fsinsC-Mutation könnte alterierte *NOD2*-Signaltransduktionswege mit daraus resultierender Fehlregulation der *DMBT1*-Expression eine zusätzliche Aggravierung der chronischen Entzündung bei M. Crohn-Patienten zur Folge haben.

In der vorliegenden Arbeit konnten signifikanten Assoziationen von *DMBT1*-SNPs mit M. Crohn- und C. ulcerosa-Patienten gefunden werden. Für die M. Crohn-Patienten waren die *NOD2*-Genotypen nicht bekannt, so dass auch angenommen werden kann, dass Mutationen im *DMBT1*-Gen unabhängig vom *NOD2*-Genotyp eine Auswirkung auf den Krankheitsprozess von CED-Patienten haben.

Eine defektive DMBT1-Expression durch Mutationen im DMBT1-Gen führt zur Dysregulation in der mukosalen Integrität und erhöht somit die Suszeptibilität für die CED-Entstehung

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei den hier beschriebenen Assoziationen um Mutationen, die direkt Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben oder möglicherweise regulatorische Mechanismen des alternativen Spleißens beeinflussen. Angesichts der beschriebenen Funktionen von *DMBT1* als protektiven Faktor der intestinalen Mukosa, ist es durchaus vorstellbar, dass die in dieser Arbeit gefundenen signifikanten Assoziationen von rs2981804 mit M. Crohn und von rs2981745 mit C. ulcerosa die Struktur des *DMBT1*-Proteins derart verändern, dass wichtige Funktionen der Bakterienerkennung, der Erkennung körpereigener Strukturen, und der Immunmodulation gestört sind und Mutationen im *DMBT1*-Gen somit zur CED-Entstehung beitragen können.

Weitere Assoziationsstudien sind dringend erforderlich, um diese Assoziationen zu replizieren. Zusätzlich sind *DMBT1*-Expressionsstudien bei Trägern der postulierten krankheitsfördernden Mutationen notwendig, um zu erfahren, ob diese Mutationen auf mRNA-Ebene Auswirkungen haben.

6.3.2 Mutationen im *DMBT1*-Gen beeinflussen die Restitution der geschädigten intestinalen Schleimhaut in CED

DMBT1 stimuliert die Zelldifferenzierung in Epithelzellen

Hinweise zur Rolle des *DMBT1* bei der epithelialen Zelldifferenzierung stammen aus funktionellen Studien zum *DMBT1*-Tierorthomolog Hensin (290, 294-298). Takito et al. entdeckten 1996 ein Protein, welches in Epithelzellen der Niere durch eine Änderung der Zellpolarität für eine Reihe von morphologischen Zell-Transformationen verantwortlich gemacht werden konnte. Diese Forscher nannten dieses Protein Hensin, ein Wort aus dem

japanischen für „Metamorphose“, „Entwicklung“. Es stellte sich heraus, dass Hensin je nach Dichte der Zellverbände basolateral in die extrazelluläre Matrix (EZM) sezerniert wird und durch eine Galectin-3-vermittelte Polymerisation seiner Proteinstruktur die Zelldifferenzierung in Epithel- und Stammzellen stimuliert (290). Es konnte festgestellt werden, dass Prozesse der Zelldifferenzierung ausschließlich durch das polymerisierte Hensin-Multimer, welches basolateral in die EZM ausgeschieden wird, getriggert werden (290, 297). Hensin bewirkt einen phenotypischen Wechsel von Zellverbänden mit niedriger Dichte zu Zellverbänden mit hoher Dichte, was als terminale Zelldifferenzierung gedeutet wurde. Charakteristisch für diesen Hensin-vermittelten Wechsel sind die morphologische Veränderungen der Zelle, die Eigenschaften einer enddifferenzierte Epithelzelle akquiriert (290, 294, 298).

Basierend auf den Erkenntnissen, dass es sich bei Hensin, CRP-Ductin und *DMBT1* um homologe Proteine in verschiedene Spezies handelt und dass alle drei Proteine sehr ähnliche räumliche und zeitliche Verteilungsmuster der Proteinexpression haben, ist es durchaus wahrscheinlich, dass *DMBT1* eine Rolle in der Zelldifferenzierung auch beim Menschen spielt. Diese Vermutung konnte durch immunhistochemische Studien von Mollenhauer et al. bestärkt werden, in denen gezeigt wurde, dass fetale und adulte epitheliale Gewebe im Darm und in der Haut entwicklungspezifische Charakteristika aufweisen (223). Somit wurde *DMBT1* in fetalem Darmgewebe hauptsächlich in der basolateralen Zytoplasma-Hälfte lokalisiert. In fetalem Hautgewebe zeigte sich, dass sich die Lokalisation der *DMBT1*-Expression im Laufe der fetalen Entwicklung von basolateral nach apikal verschiebt. Auch wurden niedrigere *DMBT1*-Mengen in adulten Darm- und Hautgeweben gemessen als in fetalen Geweben (223). Passend zur Annahme, dass *DMBT1* in Prozessen der terminalen Enddifferenzierung involviert ist, findet sich die höchste *DMBT1*-Expression in adulten intestinalen Epithelzellen in tiefen bis mittleren Krypten-Anteilen, wo sich die am wenigsten differenzierten intestinalen Stammzellen befinden. Diese können durch spezifische Reize zu Proliferation angeregt werden, um sich entlang der Krypt-Villus-Achse zu differenzieren. Zusätzlich zeigt sich in fetalen Geweben eine *DMBT1*-Sekretion in die EZM, im Gegensatz zur üblichen luminalen Sekretion in adulten Geweben. Eine Ausnahme kommt im Ösophagus vor, wo sowohl eine luminalen *DMBT1*-Sekretion, als auch eine anhaltende basale Ausschüttung in die EZM durch mehrschichtige Plattenepithelzellen nachgewiesen wurde.

Mollenhauer et al. stellten somit die Hypothese auf, dass einschichtige Epithelien und Drüsenepithelien überwiegend einen luminalen Sekretionsmodus aufweisen, was auf eine mukosale Schutzfunktion von *DMBT1* hindeutet. Dagegen weisen fetale und mehrschichtige adulte Epithelien mit basalem Sekretionsmodus auf eine mögliche Funktion in der Zelldifferenzierung hin (185). Ferner konnten Mollenhauer et al. durch immunhistochemische Studien an humanen Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zeigen, dass Tumorzellen,

für die eine erhaltene *DMBT1*-Expression gezeigt wurde, einen differenzierteren Phänotypen aufweisen als Tumorzellen für die ein früher Verlust der *DMBT1*-Expression gezeigt wurde. Weiterhin zeigte sich, dass Adenokarzinomen des Ösophagus im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomen insgesamt besser differenzierte Phänotypen besitzen (191). Passend zur oben vorgeschlagener Hypothese, konnte nachgewiesen werden, dass in den oberflächlichen Anteile der Adenokarzinome ein Wechsel der *DMBT1*-Sezenierung von luminal nach basolateral in die EZM stattgefunden hatte, wodurch die terminale Enddifferenzierung möglicherweise getriggert wurde. Dagegen zeigte sich in den tiefen Anteilen der Adenokarzinomen ein weiterhin bestehender luminaler Sekretionsmodus (185). Somit kann die Frage gestellt werden, ob diese unterschiedlichen Expressionswege Folge einer Änderungen bezüglich der Dichte der Zellverbände sind, welche für *DMBT1* einen Reiz zur terminalen Enddifferenzierung durch Polaritätswechsel darstellen könnte.

Epitheliale Reparaturmechanismen im Gastrointestinaltrakt

Die intestinale Schleimhaut benötigt durch ihre hohe Beanspruchbarkeit als Grenzfläche zwischen der Umwelt und dem Organismus eine häufige Regenerierung der Epithelzellen, welche in repetitiven Zyklen alle 3 bis 5 Tagen erfolgt (299-301). Die so genannte proliferative Krypt-Villus-Einheit, die durch eine einzige Krypte und ihre anliegende Zotte gebildet wird, ist für die kontinuierliche Erneuerung der Epithelzelle zuständig. Entlang der morphologischen Krypt-Villus-Achse spielen sich Prozesse der Stammzellproliferation, Restitution und Zelldifferenzierung ab. Eine Krypte enthält ungefähr 200 bis 300 Stammzellen, aus denen sich die vier Zelltypen des Darms entwickeln können: Enterozyten, Becherzellen, endokrine Zellen und Paneth-Zellen. Mechanismen zur physiologische Regenerierung der intestinalen Epithelzellen werden im Falle einer Schleimhautschädigung durch komplexe Signalwege aktiviert, um die schnellstmögliche Wiederherstellung der Schleimhautbarriere zu gewährleisten.

Die Reparaturmechanismen laufen in zwei Schritten ab (299-303). Zuerst wird die Phase der Restitution eingeleitet, in der benachbarte ungeschädigte Zellen durch strukturelle Umverteilung die verletzten Schleimhautstellen bedecken. Diese Phase wird durch zahlreiche Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und Steroide reguliert und benötigt keine Zellproliferation. Die Restitution wird durch intensive Interaktionen zwischen den erhaltenen Epithelzellen ermöglicht, die sich unter anderem durch die Ausbildung von Lamellipodien verflachen und langziehen, um die geschädigte Oberfläche möglichst breitflächig zu bedecken. Man könnte auch behaupten, dass die Zellverbände während der Restitution in einer niedrigen Dichte verteilt sind und somit bezüglich der *DMBT1*-Expression zuerst inaktiv sind. Die Regeneration ist die zweite Phase der Reparatur, die sich parallel abspielt und zum Ziel hat, den Gewebedefekt durch

Neubildung zu füllen. Die Stammzellen werden in den Krypten zur Proliferation angeregt und anschließend durch Mechanismen der terminalen Differenzierung in spezialisierte Epithelzellen umgewandelt.

Mechanismen, die Proliferation und Zelldifferenzierung miteinander koordinieren, müssen streng reguliert werden, um ein unorganisiertes Wachstum zu verhindern. Dies beinhaltet die Kontrolle über den Zellzyklus, über sich proliferierende Zellen und über das Schicksal der Epithelzellen. Die Restitution ist die akute Antwort auf eine Schädigung, die innerhalb von Minuten abgeschlossen ist. Die Regeneration ist ein länger anhaltender Prozess, der innerhalb von 18 bis 24 Stunden nach Verletzung aktiviert und generiert wird (301, 304, 305).

Das DMBT1-Gen spielt eine Rolle für die Epithelregeneration bei CED

Für Hensin wurde bereits gezeigt, dass die Induktion der terminalen Zelldifferenzierung, (durch eine in der EZM-vermittelte Galectin-3-Polymerisation) in Abhängigkeit von der Zelldichte stattfindet. Interessanterweise zeigten Al-Awqati et al., dass das Hensin-Verteilungsmuster in den intestinalen Krypten sich ähnlich wie in Zellverbänden mit niedriger Dichte präsentiert und dass das Hensin-Verteilungsmuster an der Schleimhautoberfläche und in den Zotten ähnlich wie in Zellverbänden mit hoher Dichte erschien (294). Wie bereits erwähnt, zeigt sich in den entzündlich veränderten Epithelzellen von Patienten mit CED eine stark hochregulierte *DMBT1*-Expression, die sich im Gegensatz zu gesunden Epithelzellen in der ganzen epithelialen Oberfläche sowie in Schleimhautablagerungen im Bereich von ulzerativ-veränderten Bereiche ausbreitet. Eine starke *DMBT1*-Expression findet bei Patienten mit CED also in Bereichen statt, die durch die chronische Entzündung geschädigt wurden und in denen sich physiologischerweise Reparaturprozesse zur Wiederherstellung der Schleimhautintegrität schnell abspielen müssen, um eine Gefährdung des Organismus durch eine erhöhte Barrierdurchlässigkeit zu verhindern. Man könnte annehmen, dass im Rahmen solche Reparaturprozesse, Zellverbände hoher Dichte gebildet werden, wodurch *DMBT1* signalisiert wird, dass Prozesse der terminalen Zellendifferenzierung, zur Wiederherstellung der Schleimhautintegrität, eingeleitet werden müssen.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Interaktion von *DMBT1* mit den körpereigenen Trefoil-Faktor-Proteinen. Die Familie der Trefoil-Faktor-Protein (TFF) fasst insgesamt drei hochkonservierte Protease-resistente Proteine zusammen: TFF1, TFF2 und TFF3, die unter anderem in intestinalen Becherzellen produziert werden und luminal im Dün- und Dickdarm sezerniert werden. Ihre Produktion im GIT wird durch unterschiedlichste Reize außerordentlich gesteigert. Unter anderem spielen die TFF eine entscheidende Rolle für die Restitution von einschichtigem Epithel nach Schleimhautschädigung. TFF-defiziente Mäusen sind hoch empfänglich für Schleimhautverletzungen und zeigen absolut keine Anzeichen einer Schleimhautrestitution nach induzierter Schädigung (281, 304, 306, 307).

Es wird vermutet, dass TFF-Proteine in Mechanismen der Auflockerung der Zell-Zell-Verbindungen zur Migration der intakten Epithelzellen während der Restitution involviert sind. Dabei findet eine Interaktion von TFF mit *DMBT1* statt (308). Otto und Thim stellten die Hypothese auf, dass TFF-Proteine, getriggert durch die freiliegende basolaterale Zellmembran, die Zellverflachung während der Restitution fördern und als Gegenspiel dazu den *DMBT1*-vermittelten Polaritätswechsel verhindern. Somit wären TFF-Proteine und *DMBT1* zwei Faktoren, die während der Wundheilung eine Rolle spielen, jedoch ihre spezifische Funktion in unterschiedlichen zeitlich, örtlich und funktionell getrennten Phasen ausüben und sich vermutlich gegenseitig regulieren. Unterstützend dazu ist von Kang und Nielsen bereits gezeigt worden, dass die TFF und *DMBT1* durch die *extracellular signal-related kinase* (ERK) in intestinalen Epithelzellen gegensätzlich reguliert werden (295). ERK wird wiederum durch die *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK) aktiviert.

Wegen der niedrigen Menge an basolateral konstitutiv sezerniertem *DMBT1* in Epithelzellen, erscheint es unwahrscheinlich, dass *DMBT1* im Normalfall einen Einfluss auf den gesamten Prozess der epithelialen Differenzierung im Rahmen der physiologischen Regenerationszyklen der Schleimhaut ausübt. Kang und Nielsen konnten in einer *in vitro*-Studie feststellen, dass die Stimulierung einer aus dem Magen abgeleiteten Zelllinie (AGS) durch Phorbol-Ester (PMA), einen pflanzlichen irreversiblen Aktivator der Proteinkinase C, eine Differenzierung der Zellen bewirkt und die *DMBT1*-Expression unterdrückt (295). Vermittler dieser Differenzierung sind die zwei intrazellulären Signaltransduktionswege Protein-Kinase C (PKC) und ERK. Die Aktivierung von ERK hemmt die *DMBT1*-Expression und stimuliert die TFF-Expression. Der Gegenspieler PD98059, ein MEK1-Inhibitor aktiviert die *DMBT1*-Expression und hemmt die TFF-Expression. Ferner konnte gezeigt werden, dass die *DMBT1*-Expression auch durch eine hohe Zelldichte stimuliert wird. Die *DMBT1*-Expression wird durch ERK zeitlich und örtlich streng kontrolliert. Eine Erhöhung der *DMBT1*-Expression findet nur in Zellen statt, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden und zur terminalen Differenzierung programmiert wurden. Nach Einleitung der terminalen Differenzierung wird die *DMBT1*-Expression wieder gehemmt (190, 295).

Basierend auf den hier vorgestellten Daten könnte vermutet werden, dass *DMBT1* in Schleimhautreparaturmechanismen involviert ist, und in der Phase der terminalen Enddifferenzierung der neu gebildeten Epithelzellen seine Wirkung entfaltet. Während der Restitution, die vorwiegend durch die TFF kontrolliert wird, findet man aufgrund der Zellverflachung Zellverbände mit niedriger Dichte, die im Rahmen der Zellumverteilung zur Deckung des verletzten Bereiches stattfindet. In dieser Phase sind die Zellen bezüglich der *DMBT1*-Produktion inaktiviert. Nach der Restitution folgt die Phase der Regeneration, in der Stammzellen zur Proliferation stimuliert werden und anschließend enddifferenziert werden müssen. Man könnte also annehmen, dass in dieser Phase die Zellen dicht verpackt

nebeneinander liegen, was einen Reiz für die die *DMBT1*-vermittelte terminale Enddifferenzierung darstellt.

Ferner ist vorstellbar, dass die *DMBT1*-Expression im Falle einer Schleimhautschädigung durch Interaktionen mit dem mukosalen Immunsystem über einen spezifischen Trigger, z.B. einer Änderung in der Zelldichte, zeitlich und örtlich begrenzt stimuliert werden kann, um Prozesse der terminalen Zelldifferenzierung im Rahmen der Schleimhautreparatur einzuleiten.

Eine fehlerhafte *DMBT1*-Expression, zum Beispiel aufgrund von Mutationen im Gen, könnte somit zur Folge haben, dass es zu einer mangelhaften Wiederherstellung der geschädigten Schleimhaut kommt. Bleibt aufgrund von Schäden in den Reparaturmechanismen eine permanent geschädigte Schleimhaut, führt dies zur erleichterten Absorption und Penetration toxischer Antigene mit daraus resultierender anhaltender Entzündung und unkontrollierter Immunantwort. Es ist durchaus vorstellbar, dass Mutationen im *DMBT1*-Gen zur mangelhaften Restitution der Schleimhautintegrität führen, wodurch ein permanenter Entzündungsreiz unterhalten wird, der somit zur CED-Entstehung beiträgt.

DMBT1 ist Zielgen von IL-22 und IL-27

Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich neuste Erkenntnisse zur Expression, Funktion und Signaltransduktion von IL-27 geliefert (115). IL-27 gehört zur Familie der IL-12-Familie (97, 171) und spielt eine wichtige Rolle bei der Th17-Differenzierung (101, 102), eine kürzlich entdeckte Unterform der CD4⁺-T-Zellen, welcher proinflammatorische Eigenschaften zugesprochen wird (101, 102). IL-27 besitzt antiinflammatorische Eigenschaften und ist unter anderem in der Lage, die Th17-Zell-Differenzierung zu hemmen, indem der hierfür notwendige Transkriptionsfaktor ROR γ t unterdrückt wird (109). Zusätzlich fördert IL-27 die Differenzierung von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen und erhöht somit die IL-10-Produktion (110, 309). IL-10 besitzt antiinflammatorischen Funktionen und spielt eine herausragende Rolle in der adaptiven Immunabwehr (54, 310, 311). IL-27 induziert weiterhin die frühe Th1-Zell-Differenzierung und hemmt gleichzeitig die Th2-Zell-Differenzierung, wodurch IL-27 eine wichtige Rolle in der frühen Phase der adaptiven Abwehr unterstellt wird (108, 312).

Hauptproduzent von IL-27 sind aktivierte Antigen-präsentierende Zellen (97). Allerdings wurden IL-27-Rezeptoren an der Oberfläche von T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und endothelialen Zellen gefunden (313, 314). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass auch intestinale Epithelzellen beide Untereinheiten des IL-27-Rezeptor IL-27RA und gp130 exprimieren (115). Es wurde gezeigt, dass die *IL27*-Expression in

entzündete Epithelzellen von M. Crohn-Patienten im Vergleich zu nicht-entzündeter Schleimhaut erhöht ist (115).

Außerdem erlangte unsere Arbeitsgruppe neuste Einsichten in *IL27*-Signaltransduktionswege. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von intestinalen Epithelzellen mit *IL-27* eine Reihe von Kinasen und Transkriptionsfaktoren aktiviert, unter anderem p38, ERK, STAT, STAT3 und STAT6. Wie unter 6.3.2 bereits beschrieben wurde, scheint *DMBT1* eine wichtige Rolle bei Prozessen der Wundheilung zu spielen und wird ebenfalls durch ERK streng örtlich und zeitlich reguliert (295). Interessanterweise wurde weiterhin *DMBT1* als Zielgen von *IL-27* entdeckt, welches durch p38 und STAT3 induziert wird. Die *IL-27*-vermittelte *DMBT1*-Expression konnte wiederum durch STAT1 und STAT6 gehemmt werden. Dies zeigte sich im Einklang mit einer früheren Studie, welche ebenfalls eine STAT3-vermittelte *DMBT1*-Expression nach Stimulation mit *IL-22* in Epithelzellen von C. ulcerosa-Patienten nachweisen konnte (315). *IL-22* ist ein Zytokin der *IL-10*-Familie welches durch Th-17-Zellen produziert wird (316, 317). Besonderes Merkmal von *IL-22* ist, dass sein Rezeptor *IL-22R1* nicht an der Oberfläche von Immunzellen exprimiert wird, sondern ausschließlich auf Epithelzellen und auf Fibroblasten zu finden ist (318, 319). Außerdem konnten Fukui et al. zeigen, dass die *IL-22*-vermittelte *DMBT1*-Expression neben STAT3 auch via ERK erfolgt (315).

Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe ebenfalls zeigen, dass *IL-27* auch Prozesse der Zellproliferation und Zellregeneration über STAT3 und STAT6 vermittelt (115).

Zusammengefasst kann also die Behauptung gestellt werden, dass *DMBT1* als Zielgen von *IL-27* möglicherweise Prozesse der Wundheilung fördert. Die *IL-27/DMBT1*-Achse könnte somit wichtige Kontrollstelle für die Koordination der adaptiven Abwehr mit Prozessen der Wundheilung sein. Es ist daher denkbar, dass Mutationen im *DMBT1*-Gen Einfluss auf die Proteinfunktion haben und so regenerierende Abläufe der Zellregenerierung stören und zur chronischen Entzündung bei CED beitragen.

6.3.3 Schlussfolgerung und Ausblick: Die integrative Rolle des *DMBT1*-Gens für die Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere zwischen Pathogenabwehr und Geweberegenerierung in CED

In unserer Studie wurden *DMBT1*-SNPs bei M. Crohn und bei der C. ulcerosa signifikant assoziiert. Obwohl zur Regulation der *DMBT1*-Expression noch wenig bekannt ist, wird vermutet, dass *DMBT1* Zielgen von *NOD2*, *IL-22* und *IL-27* ist und unter anderem via NF- κ B und STAT3 hochreguliert und via ERK und STAT6 im Sinne einer negativen Rückkoppelungsschleife gehemmt wird (115, 227, 295, 315). Es konnte gezeigt werden, dass *DMBT1* eine Schlüsselrolle in der mukosalen Abwehr spielt und nicht nur als Teil des

angeborenen Immunsystems die Pathogenabwehr gewährleistet (151, 192, 214), sondern vermutlich auch für die Induktion einer oralen Immuntoleranz verantwortlich ist (192). Ferner vermuten wir, dass *DMBT1* eine Rolle bei der mukosalen Wundheilung spielt, in dem das Gen in der abschließenden Phase der Zellregeneration die terminale Enddifferenzierung intestinaler Epithelzellen induziert (191, 192, 214, 220, 221, 294, 295, 297). Somit wird postuliert, dass *DMBT1* durch seine Multifunktionalität das komplexe Zusammenspiel der zellulären angeborenen Immunantwort mit Prozessen der intestinalen Wundheilung koordiniert. Mutationen im *DMBT1*-Gen können somit durch eine fehlerhafte Pathogenabwehr als auch durch eine fehlerhafte Schleimhautregeneration durch die Aufrechterhaltung eines chronischen Entzündungsreizes die Schleimhautintegrität gefährden und somit zur CED-Entstehung beitragen.

Die Abbildungen 14 und 15 geben eine Übersicht über bekannte Regulationswege der *DMBT1*-Expression in intestinalen Epithelzellen stark vereinfacht wieder.

Die Abbildung 14 zeigt die IL-27-vermittelten Signaltransduktionswege, die Abbildung 15 fasst die IL-22-vermittelte Signaltransduktionswege und die *NOD2*-Signaltransduktionswege zusammen. Alle Studien zur Regulation der *DMBT1*-Expression deuten darauf hin, dass *DMBT1* sowohl in der adaptiven Abwehr als auch für die Erhaltung einer intakten Schleimhautbarriere eine Doppelrolle einnimmt.

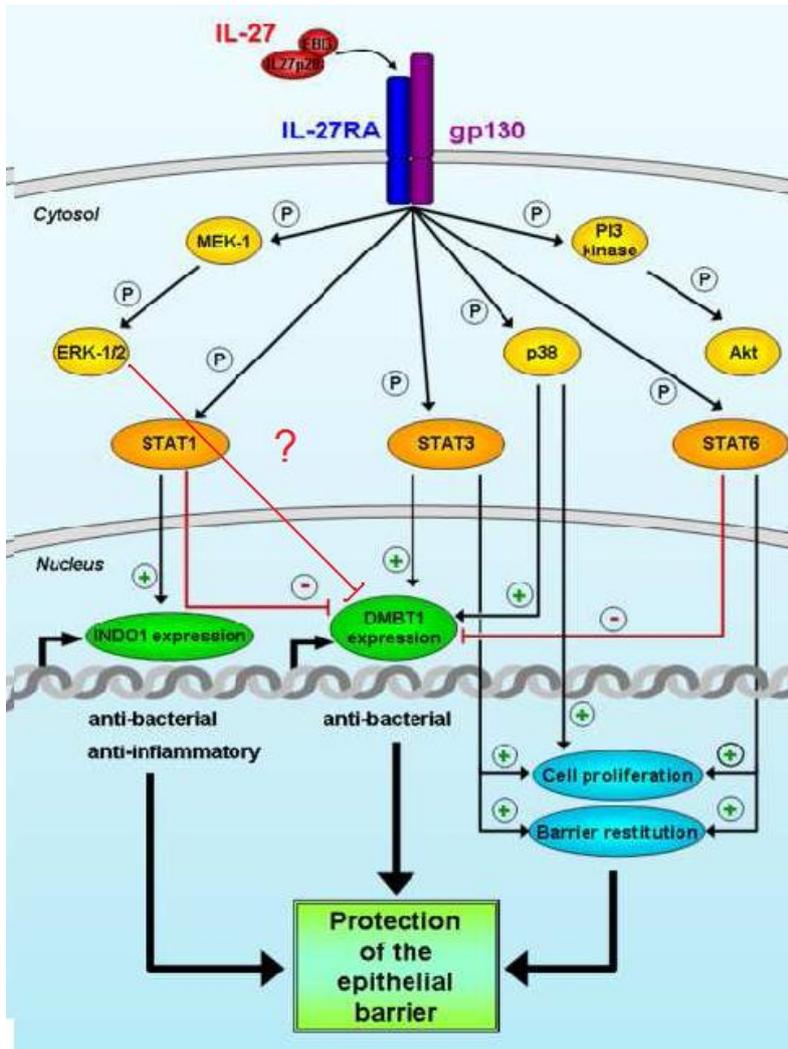


Abbildung 14: Die IL-27-vermittelte Regulation der *DMBT1*-Expression. Abbildung mod. aus Diegelmann (115).

Anm.: IL-27 induziert die Phosphorylierung der Kinasen ERK-1/2 und p38 und der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT6. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 ist für die Erhöhung der *DMBT1*-Expression verantwortlich. STAT6 und fraglich ERK haben einen hemmenden Effekt auf die *DMBT1*-Expression (115, 295)

Legende: ERK, *extracellular-signal regulated kinase*. STAT, *signal transducer and activator of transcription*. INDO1, *indoleamine-2,3-dioxygenase*. P, Phosphorylierung.

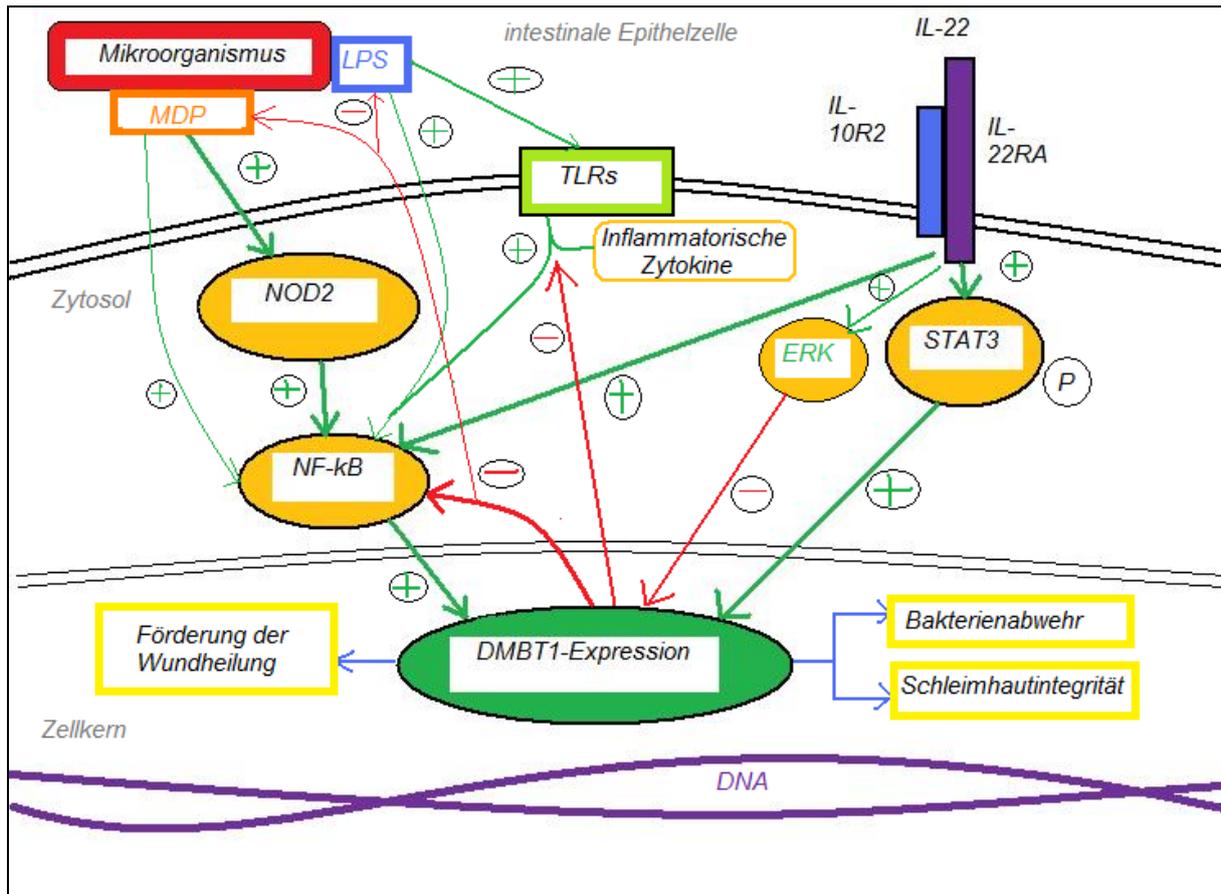


Abbildung 15: Die Regulation der *DMBT1*-Expression über *NOD2* und IL-22

Anm.: Die *DMBT1*-Expression wird nicht nur durch IL-27 reguliert, sondern auch durch IL-22 und *NOD2* via dem Transkriptionsfaktor NF-κB (227, 315). Die beiden letztgenannten Signaltransduktionswege führen sowohl über getrennte Wege als auch über eine gemeinsame, NF-κB-vermittelte Endstrecke zur *DMBT1*-Expression (227, 315). Die Aktivierung des PRR und Suszeptibilitätsgen für CED *NOD2* durch die Bestandteile Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (MDP und LPS) führt über NF-κB zu einer Verstärkung der *DMBT1*-Expression. Ferner können MDP und LPS direkt via TLRs die *DMBT1*-Expression aktivieren. *DMBT1* hemmt im Sinne einer negativen Rückkoppelungsschleife MDP und LPS (227)

Die Aktivierung des IL-22-Rezeptors durch IL-22 führt über die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF-κB ebenfalls zur *DMBT1*-Expression (315). Die IL-22-vermittelte ERK-Aktivierung wirkt hemmend auf *DMBT1* (295, 315). Letztendlich führt die *DMBT1*-Expression zur Abwehr von Pathogenen, zur Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere und zur Förderung der Wundheilung (151, 192, 214, 223, 295, 315)

Legende: ERK, *extracellular-signal regulated kinase*. STAT, *signal transducer and activator of transcription*, *NOD2*, *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*. NF-κB, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, TLRs, Toll-like-Rezeptoren. MDP, Muramyl-Dipeptid. LPS, Lipopolysaccharide. P, Phosphorylierung.

Angesichts der Rolle von *DMBT1* in Prozessen der terminalen Differenzierung und der Zellproliferation (184, 185, 220-223, 290, 294, 297, 298), ist es denkbar, dass chronische Defekte in der intestinalen Schleimhautregeneration die Karzinomentwicklung im Darm auslösen können. Die potentielle Rolle des *DMBT1*-Gens in der Tumorentstehung wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass unsere Arbeitsgruppe und Fukui et al. in zwei unabhängigen Studien erhöhte Werte für die *DMBT1*-Expression in epithelialen Tumoren messen konnten (115, 315). Für CED ist das Krebsrisiko erhöht, und Studien konnten Assoziationen zwischen *NOD2* Mutationen und einer Karzinomgenese nachweisen (320,

321). Somit wären auch Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen *DMBT1*-Mutationen und der Entstehung von Darmkrebs bei CED sinnvoll.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Polymorphismen im *DMBT1*-Gen bei CED untersucht. Hierfür wurden die Genotypen und Allelfrequenzen von sieben ausgewählten SNPs des *DMBT1*-Gens bei 824 M. Crohn-Patienten, 283 C. ulcerosa-Patienten und 981 gesunden, nicht-verwandten Kontrollindividuen bestimmt und untereinander verglichen. Zusätzlich wurden nach Berechnung des Kopplungsungleichgewichtes Haplotypanalysen und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen durchgeführt. Außerdem wurde eine Epistasie-Analyse zwischen *DMBT1* und drei bereits nachgewiesenen CED-Suszeptibilitätsgenen berechnet. Bei den untersuchten genetischen Variationen handelt es sich um die sieben *DMBT1*-SNPs rs2981745, rs3013236, rs1052715, rs2981778, rs11253871, rs2981804 und 2277244, welche das gesamte *DMBT1* samt regulatorischer Sequenzen abdecken. *DMBT1* gehört zur Superfamilie der SRCR-Gene und spielt durch seine Bakterienerkennungseigenschaften eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Ferner wird angenommen, dass *DMBT1* Funktionen in der Entwicklung der oralen Immuntoleranz, in der Zelldifferenzierung und in der Tumorgenese ausübt. Forschungen der letzten Jahre zur CED-Pathogenese haben Aufschluss über Interaktionen zwischen der intestinalen Darmflora und genetischen Faktoren gegeben, welche durch kürzlich beschriebene Assoziationen von *NOD2*, *ATG16L1*, *IL23R* (125, 127, 157, 159, 162, 169, 225) mit dem M. Crohn und teilweise mit der C. ulcerosa untermauert werden konnten. *DMBT1* ist somit als funktionelles Kandidatengen für die CED-Entstehung anzusehen und wurde in der vorliegenden Arbeit zum zweiten Mal in einer breiten Studienpopulation untersucht.

Die Genotypisierung der insgesamt aus 2088 Individuen bestehender Studienpopulation erfolgte mit *real-time* PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse. Die Validität der Methode wurde durch stichprobartige Sequenzierung der DNA-Proben überprüft. Die ermittelten Genotyp- und Allelfrequenzen, Haplotypfrequenzen und Genotyp-Phänotyp wurden durch statistische Verfahren miteinander verglichen. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Für die *DMBT1*-SNPs rs2981745, rs11253871, rs3013236, rs2981778 und rs2981804 konnten erstmals signifikante Assoziationen mit M. Crohn und für rs2981745 und rs2981804 ebenfalls mit C. ulcerosa nachgewiesen werden. Die stärksten Assoziationen zeigten sich für rs2981804 mit M. Crohn ($p = 3,0 \times 10^{-7}$) und rs2981745 mit C. ulcerosa ($p = 2,5 \times 10^{-4}$). Ersteres wurde mit einem schützenden Effekt des *minor allele* assoziiert, Zweiteres mit einem prädisponierendem Effekt des *minor allele*. Insgesamt zeigten sich stärkere Assoziationen beim M. Crohn als bei der C. ulcerosa, was mit der allgemeinen Beobachtung zu vereinbaren ist, dass M. Crohn eine stärkere genetische Komponente zuzuschreiben ist. Zusätzlich konnten wir zum ersten Mal starke Assoziationen zwischen Haplotypen im

DMBT1-Gen und CED nachweisen. Die stärkste signifikante Assoziation wurde in der M. Crohn-Gruppe für das Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2381778-rs11523871-rs3013236-rs2981804-rs2277244-rs1052715 (p -Wert= 6.14×10^{-18}) gefunden. In der Gruppe der *C. ulcerosa* war der Haplotyp bestehend aus den SNPs rs2981745-rs2981778 (p -Wert= 1.37×10^{-11}) am stärksten assoziiert. Die Genotyp-Phänotyp-Analysen ergaben für SNP rs2981745 und M. Crohn einige schwache Assoziationen, welche allerdings nach Bonferroni-Korrektur nicht aufrechterhalten werden konnten. Die Analyse der Gen-Gen-Interaktion zwischen *DMBT1* und den drei bereits replizierten Suszeptibilitätsgenen für CED, *NOD2*, *IL23R* und *IL27* ergab bis auch eine schwache Assoziation mit dem *IL23R*-Variant rs1004819 (p -Wert= 3.13×10^{-2}) keine statistisch signifikante Assoziationen.

Diese Ergebnisse liefern weitere Hinweise dafür, dass Genvarianten in Prozessen der Immunabwehr durch den Einfluss von Umweltfaktoren die CED-Entstehung fördern können. Die assoziierten SNPs führen entweder zu einem Aminosäureaustausch mit daraus resultierender Änderung der Proteinsequenz oder befinden sich innerhalb regulatorischer Sequenzen oder Introns, wodurch sich Alterationen der Proteinexpression ergeben können. In der vorliegenden Arbeit wird angenommen, dass die *DMBT1*-SNPs rs2981745, rs11523871, rs3013236 und rs2981804 durch eine Verschlechterung der Antigenerkennung und eine Störung der oralen Toleranz im Sinne einer Immunschwäche die CED-Entstehung beeinflussen können. Ferner wird vermutet, dass Mutationen im *DMBT1*-Gen Auswirkungen auf Prozesse der terminalen Epithelzeldifferenzierung haben und somit die Wundheilung gestört wird. Die Charakterisierung von *DMBT1* als Zielgen von *NOD2*, *IL22* und *IL27* (115, 227, 315) gibt Hinweise auf ein komplex reguliertes *DMBT1*-Gen, welches als Koordinator zwischen adaptiver Abwehr und Epithelrestitution eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Angesichts dieser möglichen Rolle des *DMBT1*-Gens ist somit durchaus vorstellbar, dass Defekte in der epithelialen Zeldifferenzierung zur Unterhaltung eines chronischen Entzündungsreizes beitragen könnten. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die vielseitigen Funktionen des *DMBT1*-Gens näher zu verstehen. Ferner sind weitere Replikationsstudien notwendig, um diese hier erstmals gefundenen Assoziationen zu replizieren.

TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Tabelle 1:** Die Wien- und Montreal-Klassifikation für M. Crohn
- Tabelle 2:** Die Montreal-Klassifikation für die C. ulcerosa nach Ausdehnung der Entzündung
- Tabelle 3:** Die Montreal-Klassifikation für die C. ulcerosa nach Schweregrad der Erkrankung
- Tabelle 4:** Die IL-12-Zytokin-Familie: Struktur und Eigenschaften
- Tabelle 5:** Demographische Daten der Studienpopulation
- Tabelle 6:** PCR-Reagenzen und Hersteller
- Tabelle 7:** Primer-Sequenzen für die Sequenzierung
- Tabelle 8:** RT-PCR-Materialien
- Tabelle 9:** Primer-Sequenzen und FRET-Proben-Sequenzen für die Genotypisierung
- Tabelle 10:** Materialien für die Gelelektrophorese
- Tabelle 11:** Gebrauchsmaterialien
- Tabelle 12:** Geräte
- Tabelle 13:** Computer-Programme
- Tabelle 14:** Zusammensetzung des Gels und der Pufferlösung
- Tabelle 15:** Mischprotokoll für eine PCR
- Tabelle 16:** Spezifische Mg²⁺ Konzentration und Anneling-Temperatur für jeden SNP
- Tabelle 17:** Ablaufprogramme für die PCR
- Tabelle 18:** Genotypfrequenzen der drei untersuchten Kohorten, M. Crohn-Patienten, C. ulcerosa-Patienten und Kontrollen.
- Tabelle 19:** Allelfrequenzen des *minor allele* bei Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa verglichen mit dem Kontrollkollektiv.
- Tabelle 20:** Ergebnisse des Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der Kontrollgruppe, Die P-Werte wurden für multiple Testung nach der Bonferroni-Methode korrigiert (n=7 Teste; signifikante P-Werte Schwelle 0.05/7=0.007).
- Tabelle 21:** Allelhäufigkeiten für zwei diallelische Genloci
- Tabelle 22:** Kopplungsungleichgewichtsanalysen für die *DMBT1*-SNPs beim M. Crohn-Patienten, bei der C. ulcerosa-Patienten und bei Kontrollen
- Tabelle 23:** *DMBT1*-Polymorphismen beim M. Crohn: Haplotyp-Frequenzen-Analysen im Vergleich mit der Kontrollgruppe
- Tabelle 24:** *DMBT1*-Polymorphismen bei der C. ulcerosa: Haplotyp-Frequenzen-Analysen im Vergleich mit der Kontrollgruppe
- Tabelle 25:** Assoziationen zwischen *DMBT1*-SNP rs2981745 Genotypen und Phänotypen bei M. Crohn Patienten

- Tabelle 26:** Assoziationen zwischen *DMBT1*-SNP rs2981804 Genotypen und Phänotypen bei M. Crohn-Patienten.
- Tabelle 27:** Assoziationen zwischen *DMBT1*-SNP rs2981745 Genotypen und Phänotypen bei C. ulcerosa Patienten
- Tabelle 28:** Analysen für die Epistasie zwischen *NOD2*-SNPs rs2066844=p.Arg702Trp, rs2066845=p.Gly908Arg und rs2066847=p.Leu1007fsX1008 und *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2381808 bezüglich der Suszeptibilität für M. Crohn bzw. für die C. ulcerosa
- Tabelle 29:** Analysen für die Epistasie zwischen den *IL23R*-SNPs rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026=p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965 und die zwei *DMBT1*-SNPs rs2981745 und rs2981804 bezüglich der Suszeptibilität für M. Crohn bzw. für die C. ulcerosa
- Tabelle 30:** Analysen für die Epistasie zwischen den *IL27*-SNP rs151181 und die sieben *DMBT1*-SNPs rs2981745, rs2981778, rs11523871=p.Pro42Thr, rs3013236=p.Leu54Ser, rs2981804, rs2277244=p.His585Tyr, rs1052715=p.Pro1707Pro bezüglich der Suszeptibilität für M. Crohn und für die C. ulcerosa

- Abbildung 1:** Typische endoskopische Charakteristika bei M. Crohn und C. ulcerosa
- Abbildung 2:** Histologische Charakteristika bei M. Crohn und C. ulcerosa
- Abbildung 3:** Die multifaktorielle Ätiopathogenese von CED
- Abbildung 4:** Die T-Helfer-Zell-Differenzierung
- Abbildung 5:** Funktionelles Schema zum mukosalen Immunsystem
- Abbildung 6:** Stark vereinfachtes Schema zur Dichotomie der Zytokinen in CED
- Abbildung 7:** Das Ungleichgewicht zwischen antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen bei M. Crohn
- Abbildung 8:** Suszeptibilitätsgene für CED
- Abbildung 9:** Die verschiedenen Signalwege der Suszeptibilitätsgene für CED
- Abbildung 10:** Proteine, welche durch Suszeptibilitätsgene für M. Crohn und für die C. ulcerosa kodiert werden und in der Th17-Zell-Differenzierung involviert sind
- Abbildung 11:** Genomische Struktur von *DMBT1*
- Abbildung 12:** Das Prinzip der Hybridisierungssonden
- Abbildung 13:** Beispiel für eine Darstellung der Schmelzkurven Maxima mit dem LighCycler®480 von Roche
- Abbildung 14:** Die IL-27-vermittelte Regulation der *DMBT1*-Expression
- Abbildung 15:** Die Regulation der *DMBT1*-Expression über *NOD2* und IL-22

LITERATURVERZEICHNIS

1. Cho JH. 2008. Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol* 14: 338-47
2. Loftus EV, Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126: 1504-17
3. Fauci B, Kasper. 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine*: MacGraw- Hill Medical
4. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. 2000. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 35: 154-67
5. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. 1996. 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* 39: 690-7
6. Nerich V, Monnet E, Etienne A, Louafi S, Ramee C, Rican S, Weill A, Vallier N, Vanbockstael V, Auleley GR, Allemand H, Carbonnel F. 2006. Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm Bowel Dis* 12: 218-26
7. Sood A, Midha V. 2007. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Indian J Gastroenterol* 26: 285-9
8. Straus WL, Eisen GM, Sandler RS, Murray SC, Sessions JT. 2000. Crohn's disease: does race matter? The Mid-Atlantic Crohn's Disease Study Group. *Am J Gastroenterol* 95: 479-83
9. Yang H, Taylor KD, Rotter JI. 2001. Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol Genet Metab* 74: 1-21
10. Yang Q, Khoury MJ. 1997. Evolving methods in genetic epidemiology. III. Gene-environment interaction in epidemiologic research. *Epidemiol Rev* 19: 33-43
11. Fauci A, ed. 2004. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th edition, Vols. 2*
12. Hoffmann K, ed. 2008. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen- das CED-Handbuch für Klinik und Praxis*
13. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. 2000. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 6: 8-15
14. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Pena AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. 2005. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 19 Suppl A: 5-36
15. Silvennoinen JA, Karttunen TJ, Niemela SE, Manelius JJ, Lehtola JK. 1995. A controlled study of bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 37: 71-6
16. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. 1990. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 336: 357-9
17. Zisman TL, Rubin DT. 2008. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 2662-9
18. Goel GA, Kandiel A, Achkar JP, Lashner B. 2011. Molecular pathways underlying IBD-associated colorectal neoplasia: therapeutic implications. *Am J Gastroenterol* 106: 719-30
19. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C. 2003. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 124: 544-60

20. Eaden JA, Mayberry JF. 2002. Guidelines for screening and surveillance of asymptomatic colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 51 Suppl 5: V10-2
21. Hanauer SB, Meyers S. 1997. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 92: 559-66
22. Mc CF, Barga JA, et al. 1949. Involvement of the ileum in chronic ulcerative colitis. *N Engl J Med* 240: 119-27
23. Rhodes JM, Campbell BJ. 2002. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med* 8: 10-6
24. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. 1990. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323: 1228-33
25. Devroede GJ, Taylor WF, Sauer WG, Jackman RJ, Stickler GB. 1971. Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis. *N Engl J Med* 285: 17-21
26. Jess T, Loftus EV, Jr., Velayos FS, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Schleck CD, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, Munkholm P, Sandborn WJ. 2006. Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota. *Gastroenterology* 130: 1039-46
27. Levin B. 1992. Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Cancer* 70: 1313-6
28. Macdougall IP. 1964. The Cancer Risk In Ulcerative Colitis. *Lancet* 2: 655-8
29. Rosenqvist H, Ohrling H, Lagercrantz R, Edling N. 1959. Ulcerative colitis and carcinoma coli. *Lancet* 1: 906-8
30. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. 2008. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 40 Suppl 2: S253-9
31. Saich R, Chapman R. 2008. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 331-7
32. Gitkind MJ, Wright SC. 1990. Amyloidosis complicating inflammatory bowel disease. A case report and review of the literature. *Dig Dis Sci* 35: 906-8
33. Nikolaus S, Schreiber S. 2007. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 133: 1670-89
34. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. 2009. Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 104: 465-83; quiz 4, 84
35. Gisbert JP, McNicholl AG. 2009. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 41: 56-66
36. Wagner M, Peterson CG, Ridefelt P, Sangfelt P, Carlson M. 2008. Faecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 5584-9; discussion 8
37. Nakamura RM, Barry M. 2001. Serologic markers in inflammatory bowel disease (IBD). *MLO Med Lab Obs* 33: 8-15; quiz 6-9
38. Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. 2001. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 96: 730-4
39. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. 2004. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 113: 1296-306
40. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JI, Yang H, Targan SR. 2004. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 126: 414-24
41. Schoepfer AM, Schaffer T, Seibold-Schmid B, Muller S, Seibold F. 2008. Antibodies to flagellin indicate reactivity to bacterial antigens in IBS patients. *Neurogastroenterol Motil* 20: 1110-8
42. Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, Vasiliauskas E, Elson CO, Hershberg RM. 2005. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 128: 2020-8

43. Xavier RJ, Podolsky DK. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448: 427-34
44. Hwang JM, Varma MG. 2008. Surgery for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 2678-90
45. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 28: 573-621
46. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. 2001. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 344: 808-14
47. Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. 2006. [Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendicectomy)]. *Gastroenterol Clin Biol* 30: 859-67
48. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. 1988. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 29: 352-7
49. Podolsky DK. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 417-29
50. Rook GA, Adams V, Hunt J, Palmer R, Martinelli R, Brunet LR. 2004. Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Semin Immunopathol* 25: 237-55
51. Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM. 1997. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease. *Gut* 40: 619-22
52. Kunzendorf S, Jantschek G, Straubinger K, Heberlein I, Homann N, Ludwig D, Benninghoven D. 2007. The Luebeck interview for psychosocial screening in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13: 33-41
53. Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. 1999. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 5: 1178-82
54. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 66: 5224-31
55. Dotan I, Rachmilewitz D. 2005. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol* 21: 426-30
56. Guarner F, Malagelada JR. 2003. Role of bacteria in experimental colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 793-804
57. Sartor RB. 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126: 1620-33
58. Shanahan F. 2000. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 6: 107-15
59. Winslet MC, Allan A, Poxon V, Youngs D, Keighley MR. 1994. Faecal diversion for Crohn's colitis: a model to study the role of the faecal stream in the inflammatory process. *Gut* 35: 236-42
60. Danese S, Fiocchi C. 2006. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 12: 4807-12
61. Behr MA, Kapur V. 2008. The evidence for Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 24: 17-21
62. Behr MA, Schurr E. 2006. Mycobacteria in Crohn's disease: a persistent hypothesis. *Inflamm Bowel Dis* 12: 1000-4
63. Cohavy O, Harth G, Horwitz M, Eggens M, Landers C, Sutton C, Targan SR, Braun J. 1999. Identification of a novel mycobacterial histone H1 homologue (HupB) as an antigenic target of pANCA monoclonal antibody and serum immunoglobulin A from patients with Crohn's disease. *Infect Immun* 67: 6510-7
64. Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M. 2007. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7: 607-13

65. Sartor RB. 2005. Does Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* 54: 896-8
66. Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, Sanderson JD, Sechi LA, Dettori G, Zanetti S, Hermon-Taylor J. 2007. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *J Clin Microbiol* 45: 3883-90
67. Barnich N, Denizot J, Darfeuille-Michaud A. E. coli-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients. *Pathol Biol (Paris)*
68. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. 2004. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127: 412-21
69. Issa M, Vijayapal A, Graham MB, Beaulieu DB, Otterson MF, Lundeen S, Skaros S, Weber LR, Komorowski RA, Knox JF, Emmons J, Bajaj JS, Binion DG. 2007. Impact of Clostridium difficile on inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5: 345-51
70. Prindiville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell MC, Silva J, Jr. 2000. Bacteroides fragilis enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerg Infect Dis* 6: 171-4
71. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. 2005. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 43: 3380-9
72. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. 1993. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 54: 248-55
73. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13780-5
74. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. 2006. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World J Gastroenterol* 12: 1829-41
75. Sartor RB. 1997. Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 3: 17-22; discussion -3
76. Sartor RB. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134: 577-94
77. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44-54
78. Sartor RB. 2006. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 390-407
79. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. 2003. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 24: 652-8
80. Packey CD, Sartor RB. 2008. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med* 263: 597-606
81. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102: 448-55
82. Kelly D, Conway S, Aminov R. 2005. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol* 26: 326-33
83. Clavel T, Haller D. 2007. Bacteria- and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: implications for chronic inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 13: 1153-64

84. Eckburg PB, Relman DA. 2007. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis* 44: 256-62
85. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. 2002. "For whom the bell tolls!" -- innate defense mechanisms and survival strategies of the intestinal epithelium against luminal pathogens. *Z Gastroenterol* 40: 983-90
86. Podolsky DK. 2002. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16: 933-43
87. Holtmann M, Mudter J, Galle PR, Neurath MF. 2002. [The mucosal immune system. How clear is the pathophysiology?]. *Internist (Berl)* 43: 1343-4, 7-53
88. Breslin NP, Nash C, Hilsden RJ, Hershfield NB, Price LM, Meddings JB, Sutherland LR. 2001. Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 96: 2934-8
89. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. 2006. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 55: 342-7
90. Irvine EJ, Marshall JK. 2000. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 119: 1740-4
91. May GR, Sutherland LR, Meddings JB. 1993. Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 104: 1627-32
92. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Jr., Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18129-34
93. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307: 731-4
94. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, Tagesson C, Sjodahl R. 2002. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 50: 307-13
95. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216
96. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-57
97. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16: 779-90
98. Berrebi D, Besnard M, Fromont-Hankard G, Paris R, Mougnot JF, De Lagausie P, Emilie D, Cezard JP, Navarro J, Peuchmaur M. 1998. Interleukin-12 expression is focally enhanced in the gastric mucosa of pediatric patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 152: 667-72
99. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. 1997. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 150: 823-32
100. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129: 550-64
101. Brand S. 2009. 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* 58: 1152-67

102. Strober W, Fuss IJ. 2011. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140: 1756-67 e1
103. Wei XQ, Rogers H, Lewis MA, Williams DW. 2011. The role of the IL-12 cytokine family in directing T-cell responses in oral candidosis. *Clin Dev Immunol* 2011: 697340
104. Xu M, Mizoguchi I, Morishima N, Chiba Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2010. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol* 2010
105. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204: 1849-61
106. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Goke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S. 2009. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58: 1207-17
107. Pene J, Chevalier S, Preisser L, Venereau E, Guilleux MH, Ghannam S, Moles JP, Danger Y, Ravon E, Lesaux S, Yssel H, Gascan H. 2008. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 180: 7423-30
108. Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Hata K, Fukai F, Matsui M, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2005. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol* 175: 2191-200
109. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, Chen Y, Tato CM, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Hunter CA, Cua DJ, Kastelein RA. 2009. IL-27 blocks ROR γ c expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol* 182: 5748-56
110. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. 2009. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4⁺ T cells. *J Immunol* 183: 2435-43
111. Nieuwenhuis EE, Neurath MF, Corazza N, Iijima H, Trgovcich J, Wirtz S, Glickman J, Bailey D, Yoshida M, Galle PR, Kronenberg M, Birkenbach M, Blumberg RS. 2002. Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16951-6
112. Troy AE, Zaph C, Du Y, Taylor BC, Guild KJ, Hunter CA, Saris CJ, Artis D. 2009. IL-27 regulates homeostasis of the intestinal CD4⁺ effector T cell pool and limits intestinal inflammation in a murine model of colitis. *J Immunol* 183: 2037-44
113. Honda K, Nakamura K, Matsui N, Takahashi M, Kitamura Y, Mizutani T, Harada N, Nawata H, Hamano S, Yoshida H. 2005. T helper 1-inducing property of IL-27/WSX-1 signaling is required for the induction of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 11: 1044-52
114. Villarino AV, Artis D, Bezbradica JS, Miller O, Saris CJ, Joyce S, Hunter CA. 2008. IL-27R deficiency delays the onset of colitis and protects from helminth-induced pathology in a model of chronic IBD. *Int Immunol* 20: 739-52
115. Diegelmann J, Olszak T, Goke B, Blumberg RS, Brand S. 2012. A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins. *J Biol Chem* 287: 286-98
116. Atkins D, Furuta GT. Mucosal immunology, eosinophilic esophagitis, and other intestinal inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 125: S255-61
117. Cho JH. 2008. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8: 458-66
118. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 116: 1310-6

119. Bickeböllner F. 2007. *Einführung in die genetische Epidemiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag
120. H. Bickeböllner CF, ed. 2007. *Einführung in die genetische Epidemiologie*: Springer Verlag Berlin Heidelberg
121. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, et al. 2011. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 43: 246-52
122. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Geary R, Glas J, Van Gossom A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panes J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhardt AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK, Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ, Parkes M. 2010. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42: 1118-25
123. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. 2011. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*
124. Cho JH, Brant SR. 2011. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140: 1704-12
125. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossom A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorji J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40: 955-62
126. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S. 2002. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 359: 1661-5
127. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossom A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. 1996. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-3
128. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-6
129. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278: 5509-12

130. van Heel DA, Hunt KA, King K, Ghosh S, Gabe SM, Mathew CG, Forbes A, Playford RJ. 2006. Detection of muramyl dipeptide-sensing pathway defects in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12: 598-605
131. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. 2004. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 99: 2393-404
132. Oostenbrug LE, Nolte IM, Oosterom E, van der Steege G, te Meerman GJ, van Dullemen HM, Drenth JP, de Jong DJ, van der Linde K, Jansen PL, Kleibeuker JH. 2006. CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis* 38: 834-45
133. Bonen DK, Cho JH. 2003. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124: 521-36
134. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. 2002. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 123: 86-91
135. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. 2003. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 1465-70
136. Sugimura M, Kinouchi Y, Takahashi S, Aihara H, Takagi S, Negoro K, Obana N, Kojima Y, Matsumoto K, Kikuchi T, Hiroki M, Oomori S, Shimosegawa T. 2003. CARD15/NOD2 mutational analysis in Japanese patients with Crohn's disease. *Clin Genet* 63: 160-2
137. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. 2002. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70: 845-57
138. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, Hofbauer K, Dambacher J, Tillack C, Sackmann M, Goke B, Lohse P, Ochsenkuhn T. 2006. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 41: 1421-32
139. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 277: 41701-5
140. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. 2003. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124: 993-1000
141. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, Drenth JP, Van der Meer JW. 2004. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 34: 2052-9
142. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 5: 800-8
143. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53: 1658-64
144. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. 2004. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 13: 763-70
145. Browning BL, Huebner C, Petermann I, Geary RB, Barclay ML, Shelling AN, Ferguson LR. 2007. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol* 102: 2504-12

146. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, Belaiche J, Vermeire S, Farwell L, Goris A, Libioulle C, Jani N, Dassopoulos T, Bromfield GP, Dubois B, Cho JH, Brant SR, Duerr RH, Yang H, Rotter JI, Silverberg MS, Steinhart AH, Daly MJ, Podolsky DK, Louis E, Hafler DA, Rioux JD. 2007. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 8: 387-97
147. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellou-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, Netea MG. 2007. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16645-50
148. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW, Netea MG. 2008. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med* 14: 346-52
149. Zhernakova A, Festen EM, Franke L, Trynka G, van Diemen CC, Monsuur AJ, Bevova M, Nijmeijer RM, van 't Slot R, Heijmans R, Boezen HM, van Heel DA, van Bodegraven AA, Stokkers PC, Wijmenga C, Crusius JB, Weersma RK. 2008. Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am J Hum Genet* 82: 1202-10
150. McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, Neale BM, Ong RT, Lagace C, Li C, Green T, Stevens CR, Beauchamp C, Fleshner PR, Carlson M, D'Amato M, Halfvarson J, Hibberd ML, Lordal M, Padyukov L, Andriulli A, Colombo E, Latiano A, Palmieri O, Bernard EJ, Deslandres C, Hommes DW, de Jong DJ, Stokkers PC, Weersma RK, Sharma Y, Silverberg MS, Cho JH, Wu J, Roeder K, Brant SR, Schumm LP, Duerr RH, Dubinsky MC, Glazer NL, Haritunians T, Ippoliti A, Melmed GY, Siscovick DS, Vasiliauskas EA, Targan SR, Annesse V, Wijmenga C, Pettersson S, Rotter JI, Xavier RJ, Daly MJ, Rioux JD, Seielstad M. 2010. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 42: 332-7
151. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. 2009. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 89-116
152. Deretic V. 2005. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 26: 523-8
153. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119: 753-66
154. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T. 2004. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* 306: 1037-40
155. Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C. 2005. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* 307: 727-31
156. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, Munz C. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307: 593-6
157. Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, Schroff F, Wetzke M, Roeske D, Torok HP, Tonenchi L, Pfennig S, Haller D, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Lohse P, Goke B, Ochsenkuhn T, Mussack T, Folwaczny M, Muller-Myhsok B, Brand S. 2008. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol* 103: 682-91
158. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Gunther S, Prescott NJ, Onnie CM, Hasler R, Sipos B, Folsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. 2007. A genome-

- wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 39: 207-11
159. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. 2007. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 132: 1665-71
 160. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, Shugart YY, Griffiths AM, Targan SR, Ippoliti AF, Bernard EJ, Mei L, Nicolae DL, Regueiro M, Schumm LP, Steinhardt AH, Rotter JI, Duerr RH, Cho JH, Daly MJ, Brant SR. 2007. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 39: 596-604
 161. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-78
 162. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A. 2007. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet* 52: 575-83
 163. Xavier RJ, Huett A, Rioux JD. 2008. Autophagy as an important process in gut homeostasis and Crohn's disease pathogenesis. *Gut* 57: 717-20
 164. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HWt. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456: 259-63
 165. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. 2006. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313: 1438-41
 166. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, Schuldt D, Nikolaus S, Rosenstiel P, Krawczak M, Schreiber S. 2008. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet* 40: 713-5
 167. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhardt AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314: 1461-3
 168. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ, Nimmo ER, Massey D, Berzuini C, Johnson C, Barrett JC, Cummings FR, Drummond H, Lees CW, Onnie CM, Hanson CE, Blaszczyk K, Inouye M, Ewels P, Ravindrarajah R, Keniry A, Hunt S, Carter M, Watkins N, Ouwehand W, Lewis CM, Cardon L, Lobo A, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Mansfield JC, Deloukas P, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. 2008. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* 40: 710-2
 169. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Torok HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Goke B, Ochsenkuhn T, Muller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S. 2007. 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* 2: e819
 170. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, Nimmo ER, Drummond H, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Bredin F, Berzuini C, Forbes A, Lewis CM, Cardon L, Deloukas P, Jewell D, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. 2007. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 132: 1657-64
 171. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19: 641-4

172. Imielinski M, Baldassano RN, Griffiths A, Russell RK, Annese V, et al. 2009. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 41: 1335-40
173. Anderson CA, Massey DC, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Fisher SA, Gwilliam R, Jacob J, Nimmo ER, Drummond H, Lees CW, Onnie CM, Hanson C, Blaszczyk K, Ravindrarajah R, Hunt S, Varma D, Hammond N, Lewis G, Attlesey H, Watkins N, Ouwehand W, Strachan D, McArdle W, Lewis CM, Lobo A, Sanderson J, Jewell DP, Deloukas P, Mansfield JC, Mathew CG, Satsangi J, Parkes M. 2009. Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology* 136: 523-9 e3
174. Salazar-Gonzalez RM, Niess JH, Zammit DJ, Ravindran R, Srinivasan A, Maxwell JR, Stoklasek T, Yadav R, Williams IR, Gu X, McCormick BA, Pazos MA, Vella AT, Lefrancois L, Reinecker HC, McSorley SJ. 2006. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* 24: 623-32
175. Nakazawa A, Dotan I, Brimnes J, Allez M, Shao L, Tsushima F, Azuma M, Mayer L. 2004. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 126: 1347-57
176. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD. 2008. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 4: e1000024
177. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. 2004. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 36: 471-5
178. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Muller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brunner G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkuhn T, Folwaczny C. 2005. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 54: 1421-7
179. Glas J. 2007. The first two Crohn's disease susceptibility loci with a high degree of epistasis: PTGER4- expression-modulating polymorphisms in the 5p13.1 region enhance ATG16L1- associated susceptibility to Crohn's disease.
180. Ericson T, Rundegren J. 1983. Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *Eur J Biochem* 133: 255-61
181. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A. 1997. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 17: 32-9
182. Munoz J, Lazcoz P, Inda MM, Nistal M, Pestana A, Encio IJ, Castresana JS. 2004. Homozygous deletion and expression of PTEN and DMBT1 in human primary neuroblastoma and cell lines. *Int J Cancer* 109: 673-9
183. Bikker FJ, van der Wal JE, Ligtenberg AJ, Mollenhauer J, de Blicck-Hogervorst JM, van der Waal I, Poustka A, Nieuw Amerongen AV. 2004. Salivary agglutinin/DMBT1SAG expression is up-regulated in the presence of salivary gland tumors. *J Dent Res* 83: 567-71
184. Mollenhauer J, Helmke B, Muller H, Kollender G, Lyer S, Diedrichs L, Holmskov U, Ligtenberg T, Herbertz S, Krebs I, Wiemann S, Madsen J, Bikker F, Schmitt L, Otto HF, Poustka A. 2002. Sequential changes of the DMBT1 expression and location in normal lung tissue and lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 164-9
185. Mollenhauer J, Herbertz S, Helmke B, Kollender G, Krebs I, Madsen J, Holmskov U, Sorger K, Schmitt L, Wiemann S, Otto HF, Grone HJ, Poustka A. 2001. Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. *Cancer Res* 61: 8880-6
186. Wu W, Kemp BL, Proctor ML, Gazdar AF, Minna JD, Hong WK, Mao L. 1999. Expression of DMBT1, a candidate tumor suppressor gene, is frequently lost in lung cancer. *Cancer Res* 59: 1846-51

187. Ligtenberg TJ, Bikker FJ, Groenink J, Tornoe I, Leth-Larsen R, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Holmskov U. 2001. Human salivary agglutinin binds to lung surfactant protein-D and is identical with scavenger receptor protein gp-340. *Biochem J* 359: 243-8
188. Mollenhauer J, Muller H, Kollender G, Lyer S, Diedrichs L, Helmke B, Holmskov U, Ligtenberg T, Herberitz S, Krebs I, Madsen J, Bikker F, Schmitt L, Wiemann S, Scheurlen W, Otto HF, von Deimling A, Poustka A. 2002. The SRCR/SID region of DMBT1 defines a complex multi-allele system representing the major basis for its variability in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 242-55
189. Holmskov U, Mollenhauer J, Madsen J, Vitved L, Gronlund J, Tornoe I, Kliem A, Reid KB, Poustka A, Skjodt K. 1999. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10794-9
190. Kang W, Nielsen O, Fenger C, Madsen J, Hansen S, Tornoe I, Eggleton P, Reid KB, Holmskov U. 2002. The scavenger receptor, cysteine-rich domain-containing molecule gp-340 is differentially regulated in epithelial cell lines by phorbol ester. *Clin Exp Immunol* 130: 449-58
191. Mollenhauer J, Helmke B, Muller H, Kollender G, Krebs I, Wiemann S, Holmskov U, Madsen J, Otto HF, Poustka A. 2002. An integrative model on the role of DMBT1 in epithelial cancer. *Cancer Detect Prev* 26: 266-74
192. Ligtenberg AJ, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Mollenhauer J. 2007. Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer. *Biol Chem* 388: 1275-89
193. Mollenhauer J, Holmskov U, Wiemann S, Krebs I, Herberitz S, Madsen J, Kioschis P, Coy JF, Poustka A. 1999. The genomic structure of the DMBT1 gene: evidence for a region with susceptibility to genomic instability. *Oncogene* 18: 6233-40
194. Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, Lozano F. 2004. The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 24: 1-37
195. Hohenester E, Sasaki T, Timpl R. 1999. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat Struct Biol* 6: 228-32
196. Muller WE. 1997. Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review. *Cell Tissue Res* 289: 383-95
197. Resnick D, Pearson A, Krieger M. 1994. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 19: 5-8
198. Bork P, Beckmann G. 1993. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231: 539-45
199. Bork P, Sander C. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett* 300: 237-40
200. Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* 74: 83-114
201. Prakobphol A, Boren T, Ma W, Zhixiang P, Fisher SJ. 2005. Highly glycosylated human salivary molecules present oligosaccharides that mediate adhesion of leukocytes and *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* 44: 2216-24
202. Yeh JC, Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, Ellies LG, Rabuka D, Hindsgaul O, Marth JD, Lowe JB, Fukuda M. 2001. Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Core1 extension beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell* 105: 957-69
203. Jenkinson HF, Demuth DR. 1997. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol* 23: 183-90
204. Bikker FJ, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC, van't Hof W, Bolscher JG, Poustka A, Nieuw Amerongen AV, Mollenhauer J. 2002. Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J Biol Chem* 277: 32109-15
205. Madsen J, Tornoe I, Nielsen O, Lausen M, Krebs I, Mollenhauer J, Kollender G, Poustka A, Skjodt K, Holmskov U. 2003. CRP-ductin, the mouse homologue of gp-

- 340/deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1), binds gram-positive and gram-negative bacteria and interacts with lung surfactant protein D. *Eur J Immunol* 33: 2327-36
206. Prakobphol A, Xu F, Hoang VM, Larsson T, Bergstrom J, Johansson I, Frangsmyr L, Holmskov U, Leffler H, Nilsson C, Boren T, Wright JR, Stromberg N, Fisher SJ. 2000. Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. *J Biol Chem* 275: 39860-6
207. Demuth DR, Lammey MS, Huck M, Lally ET, Malamud D. 1990. Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinin. *Microb Pathog* 9: 199-211
208. Oho T, Yu H, Yamashita Y, Koga T. 1998. Binding of salivary glycoprotein-secretory immunoglobulin A complex to the surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 66: 115-21
209. Ligtenberg AJ, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. 2000. A role for Lewis a antigens on salivary agglutinin in binding to *Streptococcus mutans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 77: 21-30
210. Bikker FJ, Ligtenberg AJ, End C, Renner M, Blaich S, Lyer S, Wittig R, van't Hof W, Veerman EC, Nazmi K, de Blicke-Hogervorst JM, Kioschis P, Nieuw Amerongen AV, Poustka A, Mollenhauer J. 2004. Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains. *J Biol Chem* 279: 47699-703
211. Hartshorn KL, Ligtenberg A, White MR, Van Eijk M, Hartshorn M, Pemberton L, Holmskov U, Crouch E. 2006. Salivary agglutinin and lung scavenger receptor cysteine-rich glycoprotein 340 have broad anti-influenza activities and interactions with surfactant protein D that vary according to donor source and sialylation. *Biochem J* 393: 545-53
212. Wu Z, Golub E, Abrams WR, Malamud D. 2004. gp340 (SAG) binds to the V3 sequence of gp120 important for chemokine receptor interaction. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 600-7
213. Tino MJ, Wright JR. 1999. Glycoprotein-340 binds surfactant protein-A (SP-A) and stimulates alveolar macrophage migration in an SP-A-independent manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 759-68
214. Madsen J, Mollenhauer J, Holmskov U. Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. *Innate Immun* 16: 160-7
215. Boackle RJ, Connor MH, Vesely J. 1993. High molecular weight non-immunoglobulin salivary agglutinins (NIA) bind C1Q globular heads and have the potential to activate the first complement component. *Mol Immunol* 30: 309-19
216. Kojouharova MS, Tsacheva IG, Tchorbadjieva MI, Reid KB, Kishore U. 2003. Localization of ligand-binding sites on human C1q globular head region using recombinant globular head fragments and single-chain antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1652: 64-74
217. Mitoma M, Oho T, Shimazaki Y, Koga T. 2001. Inhibitory effect of bovine milk lactoferrin on the interaction between a streptococcal surface protein antigen and human salivary agglutinin. *J Biol Chem* 276: 18060-5
218. Oho T, Bikker FJ, Nieuw Amerongen AV, Groenink J. 2004. A peptide domain of bovine milk lactoferrin inhibits the interaction between streptococcal surface protein antigen and a salivary agglutinin peptide domain. *Infect Immun* 72: 6181-4
219. Thornton DJ, Davies JR, Kirkham S, Gautrey A, Khan N, Richardson PS, Sheehan JK. 2001. Identification of a nonmucin glycoprotein (gp-340) from a purified respiratory mucin preparation: evidence for an association involving the MUC5B mucin. *Glycobiology* 11: 969-77
220. Mollenhauer J, Deichmann M, Helmke B, Muller H, Kollender G, Holmskov U, Ligtenberg T, Krebs I, Wiemann S, Bantel-Schaal U, Madsen J, Bikker F, Klauck SM, Otto HF, Moldenhauer G, Poustka A. 2003. Frequent downregulation of DMBT1 and galectin-3 in epithelial skin cancer. *Int J Cancer* 105: 149-57

221. Takito J, Al-Awqati Q. 2004. Conversion of ES cells to columnar epithelia by hensin and to squamous epithelia by laminin. *J Cell Biol* 166: 1093-102
222. Bisgaard HC, Muller S, Nagy P, Rasmussen LJ, Thorgeirsson SS. 1999. Modulation of the gene network connected to interferon-gamma in liver regeneration from oval cells. *Am J Pathol* 155: 1075-85
223. Mollenhauer J, Herbertz S, Holmskov U, Tolnay M, Krebs I, Merlo A, Schroder HD, Maier D, Breitling F, Wiemann S, Grone HJ, Poustka A. 2000. DMBT1 encodes a protein involved in the immune defense and in epithelial differentiation and is highly unstable in cancer. *Cancer Res* 60: 1704-10
224. Cheng H, Bjerknes M, Chen H. 1996. CRP-ductin: a gene expressed in intestinal crypts and in pancreatic and hepatic ducts. *Anat Rec* 244: 327-43
225. Glas J, Seiderer J, Tillack C, Pfennig S, Beigel F, Jurgens M, Olszak T, Laubender RP, Weidinger M, Muller-Myhsok B, Goke B, Ochsenkuhn T, Lohse P, Diegelmann J, Czamara D, Brand S. 2010. The NOD2 single nucleotide polymorphisms rs2066843 and rs2076756 are novel and common Crohn's disease susceptibility gene variants. *PLoS One* 5: e14466
226. Renner M, Bergmann G, Krebs I, End C, Lyer S, Hilberg F, Helmke B, Gassler N, Autschbach F, Bikker F, Strobel-Freidekind O, Gronert-Sum S, Benner A, Blaich S, Wittig R, Hudler M, Ligtenberg AJ, Madsen J, Holmskov U, Annese V, Latiano A, Schirmacher P, Amerongen AV, D'Amato M, Kioschis P, Hafner M, Poustka A, Mollenhauer J. 2007. DMBT1 confers mucosal protection in vivo and a deletion variant is associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 133: 1499-509
227. Rosenstiel P, Sina C, End C, Renner M, Lyer S, Till A, Hellmig S, Nikolaus S, Folsch UR, Helmke B, Autschbach F, Schirmacher P, Kioschis P, Hafner M, Poustka A, Mollenhauer J, Schreiber S. 2007. Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol* 178: 8203-11
228. Duerr RH. 2007. Genome-wide association studies herald a new era of rapid discoveries in inflammatory bowel disease research. *Gastroenterology* 132: 2045-9
229. Ramanathan L, Ingram R, Sullivan L, Greenberg R, Reim R, Trotta PP, Le HV. 1993. Immunochemical mapping of domains in human interleukin 4 recognized by neutralizing monoclonal antibodies. *Biochemistry* 32: 3549-56
230. Stryer L, Haugland RP. 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58: 719-26
231. Le HV, Seelig GF, Syto R, Ramanathan L, Windsor WT, Borkowski D, Trotta PP. 1991. Selective proteolytic cleavage of recombinant human interleukin 4. Evidence for a critical role of the C-terminus. *Biochemistry* 30: 9576-82
232. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. 2006. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55: 749-53
233. Lewontin RC. 1964. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics* 49: 49-67
234. Lewontin RC. 1988. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120: 849-52
235. Hill WG, Robertson A. 1968. The effects of inbreeding at loci with heterozygote advantage. *Genetics* 60: 615-28
236. Devlin B, Risch N. 1995. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 29: 311-22
237. Jorde LB. 2000. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res* 10: 1435-44
238. Pritchard JK, Przeworski M. 2001. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* 69: 1-14
239. Zondervan KT, Cardon LR. 2004. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* 5: 89-100
240. Wray NR. 2005. Allele frequencies and the r2 measure of linkage disequilibrium: impact on design and interpretation of association studies. *Twin Res Hum Genet* 8: 87-94

241. Visscher PM, Montgomery GW. 2009. Genome-wide association studies and human disease: from trickle to flood. *Jama* 302: 2028-9
242. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. 2001. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 29: 306-9
243. Hinds DA, Kloek AP, Jen M, Chen X, Frazer KA. 2006. Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet* 38: 82-5
244. McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ, Altshuler DM. 2006. Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nat Genet* 38: 86-92
245. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. 2003. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361: 865-72
246. Wacholder S, Rothman N, Caporaso N. 2000. Population stratification in epidemiologic studies of common genetic variants and cancer: quantification of bias. *J Natl Cancer Inst* 92: 1151-8
247. Wacholder S, Rothman N, Caporaso N. 2002. Counterpoint: bias from population stratification is not a major threat to the validity of conclusions from epidemiological studies of common polymorphisms and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 513-20
248. Thomas DC, Witte JS. 2002. Point: population stratification: a problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 505-12
249. Lay MJ, Wittwer CT. 1997. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 43: 2262-7
250. Djin-Ye Ho F. 2006. LightCycler 480: High throughput Genotyping for TLR-8 SNPs. *Biochemica*
251. Walter B. 2006. LightCycler ® 480 System: High-throughput gen expression and genotyping Analysis, a performance study. *Biochemica*
252. von Ahsen N, Oellerich M, Armstrong VW, Schutz E. 1999. Application of a thermodynamic nearest-neighbor model to estimate nucleic acid stability and optimize probe design: prediction of melting points of multiple mutations of apolipoprotein B-3500 and factor V with a hybridization probe genotyping assay on the LightCycler. *Clin Chem* 45: 2094-101
253. Reed GH, Wittwer CT. 2004. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 50: 1748-54
254. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. 2005. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 6: 376-88
255. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF. 2006. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 79: 439-48
256. Somerville RP, Shoshan Y, Eng C, Barnett G, Miller D, Cowell JK. 1998. Molecular analysis of two putative tumour suppressor genes, PTEN and DMBT, which have been implicated in glioblastoma multiforme disease progression. *Oncogene* 17: 1755-7
257. Mori M, Shiraishi T, Tanaka S, Yamagata M, Mafune K, Tanaka Y, Ueo H, Barnard GF, Sugimachi K. 1999. Lack of DMBT1 expression in oesophageal, gastric and colon cancers. *Br J Cancer* 79: 211-3
258. Holmskov U, Lawson P, Teisner B, Tornoe I, Willis AC, Morgan C, Koch C, Reid KB. 1997. Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule. *J Biol Chem* 272: 13743-9
259. Freeman M, Ashkenas J, Rees DJ, Kingsley DM, Copeland NG, Jenkins NA, Krieger M. 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8810-4

260. Faustino NA, Cooper TA. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 17: 419-37
261. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. 2009. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792: 14-26
262. Wang GS, Cooper TA. 2007. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 8: 749-61
263. Chatterjee S, Pal JK. 2009. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 101: 251-62
264. Pickering BM, Willis AE. 2005. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 16: 39-47
265. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3: 285-98
266. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM. 2002. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol* 4: 457-61
267. Dubois PC, van Heel DA. 2008. New susceptibility genes for ulcerative colitis. *Nat Genet* 40: 686-8
268. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. 2002. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 123: 679-88
269. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122: 854-66
270. Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, Magarry GR, Butler WJ, Eaden JA, Roberts-Thomson IC, Pavli P, Wilson SR, Callen DF. 2003. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet* 67: 35-41
271. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. 2002. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 867-74
272. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P. 2005. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 11: 1489-95
273. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357: 1925-8
274. Glas J, Seiderer J, Nagy M, Fries C, Beigel F, Weidinger M, Pfennig S, Klein W, Epplen JT, Lohse P, Folwaczny M, Goke B, Ochsenkuhn T, Diegelmann J, Muller-Myhsok B, Roeske D, Brand S. 2010. Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset. *PLoS One* 5: e10373
275. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307: 734-8
276. Carlen A, Bratt P, Stenudd C, Olsson J, Stromberg N. 1998. Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *J Dent Res* 77: 81-90
277. Rosan B, Appelbaum B, Golub E, Malamud D, Mandel ID. 1982. Enhanced saliva-mediated bacterial aggregation and decreased bacterial adhesion in caries-resistant versus caries-susceptible individuals. *Infect Immun* 38: 1056-9

278. Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Kallestal C, Stromberg N. 2001. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res* 80: 2005-10
279. Leito JT, Ligtenberg AJ, Nazmi K, de Blicck-Hogervorst JM, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. 2008. A common binding motif for various bacteria of the bacteria-binding peptide SRCRP2 of DMBT1/gp-340/salivary agglutinin. *Biol Chem* 389: 1193-200
280. End C, Bikker F, Renner M, Bergmann G, Lyer S, Blaich S, Hudler M, Helmke B, Gassler N, Autschbach F, Ligtenberg AJ, Benner A, Holmskov U, Schirmacher P, Nieuw Amerongen AV, Rosenstiel P, Sina C, Franke A, Hafner M, Kioschis P, Schreiber S, Poustka A, Mollenhauer J. 2009. DMBT1 functions as pattern-recognition molecule for poly-sulfated and poly-phosphorylated ligands. *Eur J Immunol* 39: 833-42
281. Taupin D, Podolsky DK. 2003. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 721-32
282. Hartshorn KL, White MR, Moguees T, Ligtenberg T, Crouch E, Holmskov U. 2003. Lung and salivary scavenger receptor glycoprotein-340 contribute to the host defense against influenza A viruses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1066-76
283. Wu Z, Van Ryk D, Davis C, Abrams WR, Chaiken I, Magnani J, Malamud D. 2003. Salivary agglutinin inhibits HIV type 1 infectivity through interaction with viral glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19: 201-9
284. Nagashunmugam T, Malamud D, Davis C, Abrams WR, Friedman HM. 1998. Human submandibular saliva inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection by displacing envelope glycoprotein gp120 from the virus. *J Infect Dis* 178: 1635-41
285. Shugars DC, Sweet SP, Malamud D, Kazmi SH, Page-Shafer K, Challacombe SJ. 2002. Saliva and inhibition of HIV-1 infection: molecular mechanisms. *Oral Dis* 8 Suppl 2: 169-75
286. White MR, Crouch E, Vesona J, Tacken PJ, Batenburg JJ, Leth-Larsen R, Holmskov U, Hartshorn KL. 2005. Respiratory innate immune proteins differentially modulate the neutrophil respiratory burst response to influenza A virus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L606-16
287. Armstrong EA, Ziola B, Habbick BF, Komiyama K. 1993. Role of cations and IgA in saliva-mediated aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J Oral Pathol Med* 22: 207-13
288. Rundegren J, Arnold RR. 1987. Differentiation and interaction of secretory immunoglobulin A and a calcium-dependent parotid agglutinin for several bacterial strains. *Infect Immun* 55: 288-92
289. Ligtenberg AJ, Bikker FJ, De Blicck-Hogervorst JM, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. 2004. Binding of salivary agglutinin to IgA. *Biochem J* 383: 159-64
290. Hikita C, Vijayakumar S, Takito J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Al-Awqati Q. 2000. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J Cell Biol* 151: 1235-46
291. De Lisle RC, Xu W, Roe BA, Ziemer D. 2008. Effects of Muclin (Dmbt1) deficiency on the gastrointestinal system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G717-27
292. Mueller A, O'Rourke J, Grimm J, Guillemin K, Dixon MF, Lee A, Falkow S. 2003. Distinct gene expression profiles characterize the histopathological stages of disease in *Helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1292-7
293. Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4596-601
294. Al-Awqati Q, Vijayakumar S, Takito J, Hikita C, Yan L, Wiederholt T. 2000. Phenotypic plasticity and terminal differentiation of the intercalated cell: the hensin pathway. *Exp Nephrol* 8: 66-71
295. Kang W, Nielsen O, Fenger C, Leslie G, Holmskov U, Reid KB. 2005. Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer. *Carcinogenesis* 26: 1129-37

296. Kang W, Reid KB. 2003. DMBT1, a regulator of mucosal homeostasis through the linking of mucosal defense and regeneration? *FEBS Lett* 540: 21-5
297. Takito J, Hikita C, Al-Awqati Q. 1996. Hensin, a new collecting duct protein involved in the in vitro plasticity of intercalated cell polarity. *J Clin Invest* 98: 2324-31
298. Vijayakumar S, Takito J, Hikita C, Al-Awqati Q. 1999. Hensin remodels the apical cytoskeleton and induces columnarization of intercalated epithelial cells: processes that resemble terminal differentiation. *J Cell Biol* 144: 1057-67
299. Okamoto R, Matsumoto T, Watanabe M. 2006. Regeneration of the intestinal epithelia: regulation of bone marrow-derived epithelial cell differentiation towards secretory lineage cells. *Hum Cell* 19: 71-5
300. Okamoto R, Watanabe M. 2004. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 39: 1-6
301. Sturm A, Dignass AU. 2008. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 348-53
302. Okamoto R, Watanabe M. 2005. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 50 Suppl 1: S34-8
303. Verstappen J, Katsaros C, Torensma R, Von den Hoff JW. 2009. A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. *Wound Repair Regen* 17: 296-305
304. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 87: 545-64
305. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. 2007. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* 56: 130-9
306. Kjellek S. 2009. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 66: 1350-69
307. Otto WR, Thim L. 2005. Trefoil factor family-interacting proteins. *Cell Mol Life Sci* 62: 2939-46
308. Thim L, Mortz E. 2000. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept* 90: 61-8
309. Batten M, Kljavin NM, Li J, Walter MJ, de Sauvage FJ, Ghilardi N. 2008. Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells. *J Immunol* 180: 2752-6
310. Grutz G. 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 77: 3-15
311. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75: 263-74
312. Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. 2007. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol* 179: 4415-23
313. Holscher C, Holscher A, Ruckerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T, Saris C, Ehlers S. 2005. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol* 174: 3534-44
314. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172: 2225-31
315. Fukui H, Sekikawa A, Tanaka H, Fujimori Y, Katake Y, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. 2011. DMBT1 is a novel gene induced by IL-22 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17: 1177-88
316. Kolls JK, McCray PB, Jr., Chan YR. 2008. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat Rev Immunol* 8: 829-35
317. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203: 2271-9
318. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. 2005. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 129: 969-84

319. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21: 241-54
320. Tian Y, Li Y, Hu Z, Wang D, Sun X, Ren C. Differential effects of NOD2 polymorphisms on colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis* 25: 161-8
321. Tuupanen S, Alhopuro P, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA. 2007. No evidence for association of NOD2 R702W and G908R with colorectal cancer. *Int J Cancer* 121: 76-9