

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor (komm.): Prof. Dr. med. Alexander Gerbes**

**Neue Krankheitssuszeptibilitätsgene bei chronisch entzündlichen
Darmerkrankungen und deren phänotypische Auswirkungen**

***Der Einfluss von Polymorphismen im PTGER4-, PHOX2B-, NCF4- und
FAM92B-Gen und in der chromosomalen Region 10q21.1 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 München

vorgelegt von Giulia Pasciuto
aus Rom

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Brand
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Ochsenkühn
Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Dipl.-Biol. Jürgen Glas

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2017

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Chronisch entzündliche Darmerkrankungen | 1 |
| 1.1.1 | Definition..... | 1 |
| 1.1.2 | Historischer Hintergrund | 1 |
| 1.1.3 | Epidemiologie | 3 |
| 1.1.4 | Klinik..... | 5 |
| 1.1.5 | Therapie | 7 |
| 1.1.6 | Pathogenese..... | 10 |
| 1.1.6.1 | Umweltfaktoren | 12 |
| 1.1.6.2 | Das gastrointestinale Immunsystem..... | 13 |
| 1.1.6.3 | Genetik..... | 23 |
| 1.2 | Genetik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen | 24 |
| 1.2.1 | Die Rolle der Genetik in der Pathogenese von CED | 24 |
| 1.2.2 | CED-Suszeptibilitätsgene | 26 |
| 1.2.2.1 | Bereits bekannte Suszeptibilitätsgene..... | 26 |
| 1.2.2.2 | In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des <i>PTGER4</i> -Gens | 33 |
| 1.2.2.3 | In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des <i>PHOX2B</i> -Gens | 34 |
| 1.2.2.4 | In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des <i>NCF4</i> -Gens | 36 |
| 1.2.2.5 | In dieser Arbeit untersuchte Varianten der intergenetischen Region auf Chromosom 10 | 37 |
| 1.2.2.6 | In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des <i>FAM92B</i> -Gens..... | 39 |
| 2 | ZIELSETZUNG | 40 |
| 3 | METHODIK | 42 |
| 3.1 | Untersuchungskollektiv und Phänotypisierung | 42 |
| 3.2 | Materialien | 46 |
| 3.2.1 | Geräte..... | 46 |
| 3.2.2 | Verbrauchsmaterialien..... | 47 |
| 3.2.3 | Reagenzien und Chemikalien | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Genotypisierung | 48 |
| 3.3.1 DNA-Isolierung | 48 |
| 3.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)..... | 48 |
| 3.3.3 Sequenzierung..... | 51 |
| 3.4 Statistische Auswertung | 53 |
| 4 ERGEBNISSE | 54 |
| 4.1 Analyse der untersuchten Genvarianten bzgl. Krankheitssuszeptibilität..... | 54 |
| 4.1.1 Analyse von <i>PTGER4</i> -Genvarianten bzgl. Krankheitssuszeptibilität von M. Crohn und Colitis ulcerosa..... | 55 |
| 4.1.2 Analyse von Genvarianten im <i>PHOX2B</i> -, <i>NCF4</i> - und <i>FAM92B</i> -Gen und einer intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1 bzgl. Krankheitssuszeptibilität von M. Crohn und Colitis ulcerosa | 56 |
| 4.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse | 58 |
| 4.2.1 Genotyp-Phänotyp-Analyse bzgl. <i>PTGER4</i> -Genvarianten in rs4495224 und rs7720838..... | 58 |
| 4.2.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse bzgl. Genvarianten in <i>PHOX2B</i> , <i>NCF4</i> , <i>FAM92B</i> und der intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1..... | 66 |
| 4.3 Analyse der Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis)..... | 67 |
| 4.3.1 Gen-Gen-Interaktionen zwischen <i>PTGER4</i> und den bereits etablierten Suszeptibilitätsgenen <i>NOD2</i> , <i>IL23R</i> , <i>ATG16L1</i> und <i>SLC22A4/5</i> | 67 |
| 4.3.2 Gen-Gen-Interaktionen zwischen <i>PHOX2B</i> , <i>NCF4</i> , <i>FAM92B</i> und dem SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1 und den bereits etablierten Suszeptibilitätsgenen <i>NOD2</i> , <i>IL23R</i> und <i>ATG16L1</i> | 69 |
| 5 DISKUSSION..... | 71 |
| 5.1 Suszeptibilitätsanalyse..... | 71 |
| 5.1.1 <i>PTGER4</i> ist ein Suszeptibilitätsgen für M. Crohn | 71 |
| 5.1.2 Die intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1, <i>PHOX2B</i> , <i>NCF4</i> und <i>FAM92B</i> sind keine CED-Suszeptibilitätsloci in der deutschen Bevölkerung ... | 74 |
| 5.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse | 75 |
| 5.2.1 <i>PTGER4</i> -Polymorphismen sind nicht mit bestimmten phänotypischen Charakteristika von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert | 75 |
| 5.2.2 Die intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1, <i>PHOX2B</i> , <i>NCF4</i> und <i>FAM92B</i> sind nicht mit einem ilealen Phänotyp assoziiert..... | 75 |

5.3 Analyse der Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis)..... 78

5.3.1 *PTGER4* und *ATG16L1* zeigen Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis) 78

5.3.2 Die intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1, *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B* zeigen keine Gen-Gen-Interaktionen mit *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* 81

6 ZUSAMMENFASSUNG..... 82

7 ANHANG 85

7.1 Literaturverzeichnis 85

7.2 Abkürzungsverzeichnis..... 105

7.3 Abbildungsverzeichnis..... 109

7.4 Tabellenverzeichnis 110

7.5 Danksagung 111

7.6 Publikationen 112

1 EINLEITUNG

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1 Definition

Der Begriff „chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ (CED; engl.: inflammatory bowel disease, IBD) beschreibt idiopathische, chronisch-rezidivierende Entzündungen des Gastrointestinaltraktes (GI-Traktes). Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa sind die beiden Hauptformen. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die keiner der beiden Hauptformen zugeordnet werden können, bezeichnet man als Colitis indeterminata. Sie machen etwa 10% aller CED aus.

1.1.2 Historischer Hintergrund

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind Erkrankungen, die erst mit Hilfe von relativ modernen diagnostischen Verfahren wie der Endoskopie mit Biopsieentnahme und histopathologischer Untersuchung eindeutig dem M. Crohn bzw. der Colitis ulcerosa zugeordnet werden konnten. Es gibt jedoch jahrhundertealte Beschreibungen von Krankheitsfällen, bei denen aufgrund der damals beschriebenen Symptome und Autopsieberichte heute nachträglich die Verdachtsdiagnose M. Crohn oder Colitis ulcerosa gestellt werden kann. Folgende Tabelle soll eine Übersicht der historischen Daten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen geben.

| Jahr | Publizierer | Beobachtung |
|---------------------|----------------------------|--|
| Morbus Crohn | | |
| 1612 | Wilhelm Fabry | Beschreibung eines ulzerierten, kontrahierten Caecums mit Ileuminvagination bei der Autopsie eines Jungen mit persistierenden subhepatischen Schmerzen und Diarrhoe ^{1,2,3} |
| 1769 | Giovanni Battista Morgagni | Beschreibung eines entzündeten, verengten terminalen Ileum mit Ulzera und Perforationen und vergrößerten mesenterialen |

| | | |
|------|--|---|
| | | Lymphknoten bei der Autopsie eines 20-Jährigen, der unter Durchfall und Fieber gelitten hatte ^{1,2,4} |
| 1813 | C. Coombe, W. Saunders | Beschreibung eines Falles von Ileumstriktur und -verdickung ^{1,2,5} |
| 1828 | John Abercrombie | Beschreibung eines entzündeten, ulzerierten und verdickten Ileumsegments bei der Autopsie eines 13-jährigen Mädchens, das unter Durchfall gelitten hatte ^{1,2,6} |
| 1830 | Abraham Colles | Beschreibung der Erkrankung bei Kindern mit initial der Tuberkulose zugeschriebenen perianalen, retrovaginalem und retrovesikulären Fisteln ^{1,2,7} |
| 1853 | Dominic Corrigan | Beschreibung eines Falles mit einem verdickten Ileum und „Schneckenpurulzera“ ^{1,8} |
| 1882 | Robert Koch | Identifikation des Tuberkelbakteriums und somit Möglichkeit der Unterscheidung zwischen tuberkulöser und nicht-infektiöser ileozäkaler Krankheit ⁹ |
| 1889 | S. Fenwick | Autopsie einer 27-jährigen Frau mit Diarrhoe- und Gewichtsverlustanamnese zeigt verbackene Darmschlingen mit ileokolitischer Fistel und erweitertem terminalen Ileum bei stenosierter Ileozäkalklappe ^{2,10} |
| 1909 | Heinrich Braun | Beschreibung von mehreren Fällen mit entzündlich verändertem Darm ^{1,11} |
| 1913 | Thomas Kennedy Dalziel | 9 Fälle mit disseminierter Verdickung des terminalen Ileums und in einigen Fällen zusätzlich des Colon ascendens, davon 7 erfolgreich chirurgisch therapiert ¹² |
| 1923 | Eli Moschowitz, Abraham O. Wilensky | Beschreibung von 4 Fällen mit diskontinuierlicher, transmuraler Entzündung des Kolons, in einem Fall zusätzlich auch Ileitis ¹³ |
| 1932 | Burrill Bernard Crohn, Leon Ginzburg, Gordon David Oppenheimer | Einführung des Begriffes „Ileitis terminalis“ bei 14 Fällen im Mount Sinai Hospital, New York, USA ¹⁴ |
| 1934 | Ralph Colp | Bericht über Patienten mit Ileokolitis Crohn ¹⁵ |
| 1952 | Charles Wells | Beschreibung von Kolonbefall bei Crohn-ähnlichen entzündlichen Läsionen ¹⁶ |
| 1960 | Hugh Evelyn Lockhart-Mummery, BC. Morson | Histopathologische Differenzierung zwischen dem das Kolon befallende M. Crohn und der Colitis ulcerosa ¹⁷ |

| Colitis ulcerosa | | |
|------------------|-----------------------------|---|
| 1793 | Matthew Baillie | Bericht über Patienten, die vermutlich an Colitis ulcerosa verstarben ^{2;18} |
| 1859 | Samuel Wilks | Bezeichnung der „einfach idiopathischen Kolitis“ [als Differentialdiagnose zur akuten Dysenterie] ¹⁹ |
| 1859 | Samuel Wilks | Beschreibung von Entzündung in Ileum und Kolon ²⁰ |
| 1875 | Samuel Wilks, W. Moxon | Ulzerationen und Entzündung des gesamten Kolons einer jungen Frau, die nach schweren blutigen Durchfällen verstarb ^{2;21} |
| 1902 | R. F. Weir | Spülung des Kolons mit Kaliumpermanganat bei vermutlicher Infektion durch eine äußere operative Wurmfortsatzfistel (Appendikostomie) bei einem Patienten mit Colitis ulcerosa ^{2;22} |
| 1907 | John Percy Lockhart-Mummery | Diagnose eines Kolonkarzinoms bei 7 von 36 Colitis ulcerosa-Patienten mithilfe des neuen elektrisch beleuchteten Proktosigmoidoskop ^{2;23} |
| 1909 | Herbert P. Hawkins | Beschreibung der Colitis ulcerosa als intermittierende bzw. chronische Krankheit ²⁴ |

Tabelle 1.1: Historische Daten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

1.1.3 Epidemiologie

Sowohl der M. Crohn als auch die Colitis ulcerosa sind weltweit vorkommende Krankheitsbilder. Je nach geographischer Region, den teils damit verbundenen ethnischen Unterschieden und Untersuchungszeitpunkten sind jedoch eindeutige Unterschiede in Inzidenz und Prävalenz festzustellen.

Verschiedene Inzidenzstudien aus Europa und Nordamerika, die in den 1960er und 70er Jahren durchgeführt wurden, zeigten ein Nord-Süd-Gefälle mit höheren Inzidenzzahlen in nördlichen Breitenkreisen²⁵⁻³². Eine Studie, die in den 1990er Jahren mit Daten aus 20 europäischen Zentren durchgeführt wurde, bestätigte ein Nord-Süd-Gefälle, welches aber wohl durch eine ansteigende Inzidenz in Südeuropa^{33,34} geringer ausfiel als erwartet und sich möglicherweise in Zukunft ausgleichen könnte²⁷.

| Europa | Morbus Crohn | Colitis ulcerosa |
|-----------|---------------------|----------------------|
| Inzidenz | 0.7 – 9.8 / 100 000 | 1.5 – 20.3 / 100 000 |
| Prävalenz | 144 / 100 000 | 243 / 100 000 |

Tabelle 1.2: Inzidenz und Prävalenz bei M. Crohn und Colitis ulcerosa in Europa^{26,27}

| Deutschland | Morbus Crohn | Colitis ulcerosa |
|-------------|-------------------|-------------------|
| Inzidenz | 3 – 5 / 100 000 | 2 – 5 / 100 000 |
| Prävalenz | 30 – 55 / 100 000 | 25 – 50 / 100 000 |

Tabelle 1.3: Inzidenz und Prävalenz bei M. Crohn und Colitis ulcerosa in Deutschland³⁵

Die Inzidenzzahlen von M. Crohn und Colitis ulcerosa zeigen auch bezüglich des Zeitpunktes der Datenerhebung Unterschiede. In der Nachkriegszeit zeigte die Inzidenzkurve der CED bis in die 1970er Jahre, v.a. in Skandinavien, Großbritannien und den USA einen rapiden Anstieg und flachte dann bis in die heutige Zeit ab³⁶. Der Anstieg erfolgte für die Colitis ulcerosa 15-20 Jahre vor dem Anstieg des M. Crohn^{37,38}.

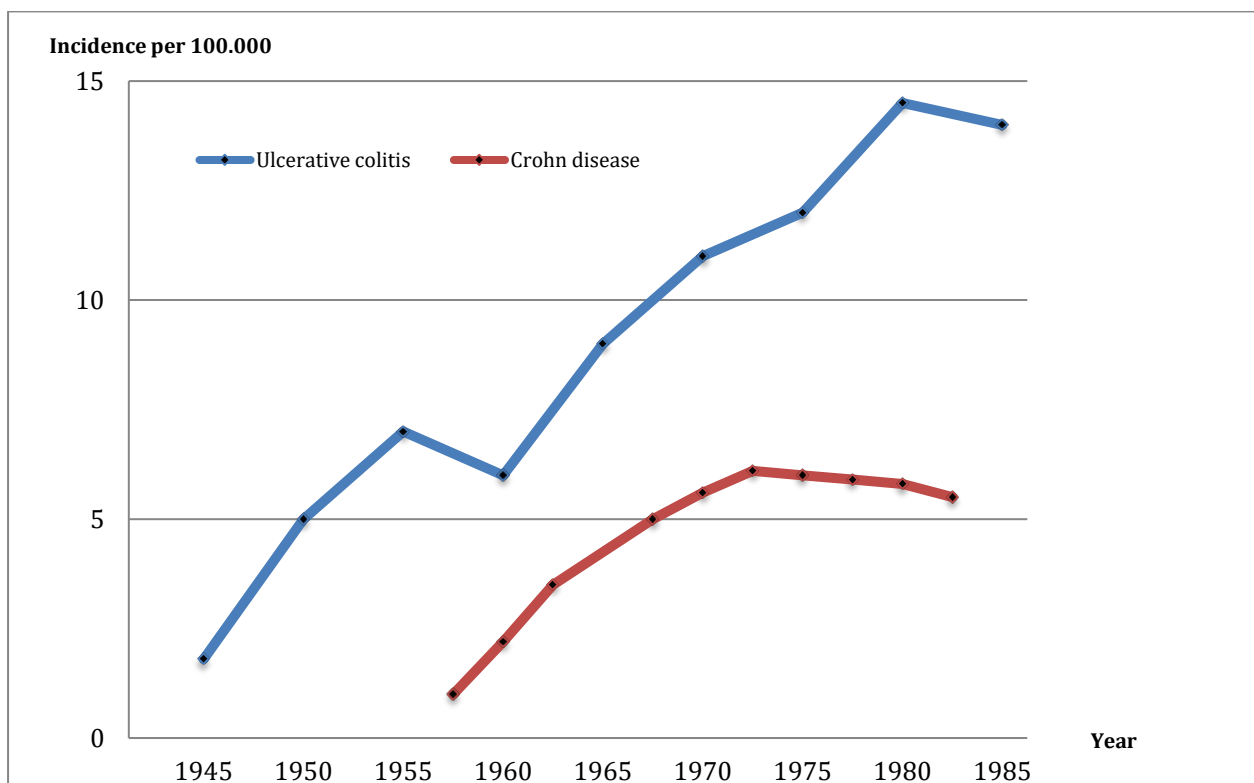


Abbildung 1.1: Jährliche Inzidenz von Colitis ulcerosa und M. Crohn in Uppsala, Schweden, 1945-1983 (Abbildung modifiziert aus Ekbohm³⁶)

Auch sozioökonomische Aspekte scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, da in städtischen Gebieten höhere Inzidenz- und Prävalenzraten beobachtet wurden als in ländlichen Gebieten³⁹.

Der M. Crohn und die Colitis ulcerosa können in jedem Lebensalter auftreten. Es zeigte sich jedoch ein Altersgipfel der Erstmanifestation für beide chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr sowie ein zweiter niedrigerer Gipfel zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr.

Das Geschlechterverhältnis ist bei der Colitis ulcerosa ausgeglichen, während beim M. Crohn die Männer leicht überwiegen³⁵.

| | Morbus Crohn | Colitis ulcerosa |
|------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Altersgipfel | 15–30 Jahre und 60–80 Jahre | |
| Verhältnis Mann : Frau | 1,1-1,8 : 1 | 1 : 1 |

Tabelle 1.4: Altersgipfel der Erstmanifestation und Geschlechterverhältnis bei CED³⁵

1.1.4 Klinik

Die zwei Hauptformen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind durch verschiedene Aspekte charakterisiert, die im Rahmen diagnostischer Verfahren meist eine eindeutige Zuordnung zu dem einen oder anderen Krankheitsbild erlauben. In folgender Tabelle sollen die wesentlichen Unterschiede herausgehoben werden.

| | Morbus Crohn | Colitis ulcerosa |
|----------------------------|------------------------------------|--|
| Lokalisation | | |
| | gesamter GI-Trakt | Kolon |
| Lokalisationsmuster | | |
| | transmural | auf Mukosa beschränkt |
| | diskontinuierlich („skip lesions“) | kontinuierlich und über die gesamte Zirkumferenz |

| Symptomatik | | |
|--|--|--|
| | Abdominalschmerzen (v.a. rechter Unterbauch) | Tenesmen |
| | Durchfälle, nur selten blutig | schleimig-blutige Durchfälle |
| | perianale Erkrankungen | sehr selten perianale Erkrankungen |
| | Erbrechen, Gewichtsverlust, Fieber | anämische Symptome |
| Befunde apparativer Diagnostik | | |
| Endoskopie | segmentaler Befall, Fissuren, Ulzera, Pflastersteinrelief, Schleimhautrötung, Aphthen, Ödem | kontinuierlich vom Rektum ausgehend, fast immer auf Kolon beschränkt, z.T. „back-wash“-Ileitis |
| Radiologie | Fisteln (CT), skip-lesions, Pflastersteinrelief, schmale Stenosen, Ulzerationen, Abszesse (CT) | kontinuierlicher Befall, Haustrenverlust, samtartige Schleimhaut mit unscharfen Konturen, Ulzerationen |
| Histopathologie | transmurale Entzündung, bei 40% Granulome, häufig aphthoide/fissurale Ulzera, Verbreiterung der Submukosa, Ödem, Fibrose | mukosale und submukosale Entzündung, zahlreiche Kryptenabszesse |
| Komplikationen | | |
| | Fisteln | Kolonkarzinom |
| | Stenosen, Strikturen | toxisches Megakolon |
| | Abszesse | Kolonperforation |
| | Perforation | schwere Blutungen |
| | Blutung | |
| | Malabsorption | |
| | Konglomerattumor | |
| Extraintestinale Manifestationen⁴⁰ | | |
| Gelenke | Periphere Arthritiden, Spondylitis ankylosans, Sacroiliitis | |
| Haut | Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Stomatitis aphthosa | |
| Auge | Uveitis, Episkleritis | |

| | |
|----------------------------|---|
| Leber, Gallenwege | Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) |
| Pankreas | Pankreatitis, Autoimmunpankreatitis |
| Blut, Gefäße | Thromboembolische Ereignisse, Gerinnungsstörungen, Vaskulitiden |
| Niere, ableitende Harnwege | Tubuläre Proteinurie, Nephrolithiasis, AA-Amyloidose, interstitielle Nephritis |
| Lunge | Bronchiolitis-obliterans-organisierende Pneumonie (BOOP), chronische Bronchitis/Bronchiektasien, kryptogene organisierende Pneumonie (COP), Pleuritis/Serositis |
| Nervensystem | Demyelinisierende Krankheiten (u.a. Multiple Sklerose), Neuritis nervi optici, sensorische Schwerhörigkeit |

Tabelle 1.5: Gegenüberstellung verschiedener klinischer Aspekte bei M. Crohn und Colitis ulcerosa (Tabelle modifiziert aus Göke und Beglinger³⁵)

1.1.5 Therapie

Der M. Crohn und die Colitis ulcerosa sind Krankheitsbilder, deren Ursachen noch nicht ausreichend entschlüsselt sind. Daher stellen viele Therapieoptionen keine kausale Behandlung, sondern lediglich einen empirischen Ansatz dar, der dazu dient, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern. Nach der Diagnosestellung sind die Ausprägung und das Befallsmuster der Erkrankung, die aktuelle klinische Symptomatik, eventuelle Begleiterkrankungen und der bisherige Verlauf wichtige Informationen zur Erstellung eines optimalen Therapieplans.

Die medikamentöse Therapie kann bei den CED allein zur Behandlung eines akuten Schubes zur Linderung der Symptome oder als remissionserhaltende Maßnahme zur Verminderung der Anzahl der Schübe angewendet werden. Weiterhin müssen bei Komplikationen und/oder extraintestinalem Befall beim M. Crohn und der Colitis ulcerosa therapeutische Maßnahmen ergriffen werden.

Nur bei geringer Krankheitsaktivität, sehr seltenen Schüben und vollständiger Remission über lange Zeit nach einer Schubtherapie kann man sich auf die alleinige Behandlung des akuten Schubes beschränken. In den meisten Fällen wird jedoch eine remissionserhaltende Therapie empfohlen.

Einen Überblick über Möglichkeiten der Pharmakotherapie des M. Crohn und der Colitis ulcerosa gibt die nachfolgende Tabelle.

| Wirkstoff | Wirkmechanismus | Anwendung |
|--------------------------------|---|--|
| 5-Aminosalizylate | | |
| Sulfasalazin | Inhibition der Prostaglandin- und Leukotriensynthese, der NF- κ B-Aktivierung, der Chemotaxis von Makrophagen und Neutrophilen; Abfangen reaktiver Sauerstoffverbindungen | Akuttherapie 3-4 g/d verteilt auf 3 Einzeldosen; Dauertherapie 2-3 g/d |
| Mesalazin | | Behandlung des akuten Schubes und Remissionsinduktion; kein Stellenwert in der Remissionserhaltung bei CU*; Akuttherapie 1.5-4 g/d auf 3 Einzeldosen verteilt; Rezidivprophylaxe (CU): 1-2 g/d |
| Olsalazin | | Akuttherapie CU: 3x 1.5-4 g/d Rezidivprophylaxe CU: 2-3x 1-2 g/d |
| Balsalazid | | Akuttherapie CU: 5.25-6.75 g/d (auf 3 Einzeldosen verteilt); Rezidivprophylaxe CU: 3-4 g/d (auf 2 Einzeldosen verteilt) |
| Glukokortikoide | | |
| Prednisolon | Bindung an Glukokortikoidrezeptoren, dadurch Induktion der Expression antiinflammatorischer Proteine (z.B. Lipocortin), Suppression proinflammatorischer Proteine (NO-Synthetase, Cyclooxygenase, Zytokine IL-1 β und TNF- α) | Im akuten Schub zur Remissionserhaltung 1 mg/kg KG (bei hohen Dosen verteilt auf 2 Einzeldosen), dann entsprechend Klinik Dosisreduktion (z.B. 60, 40, 30, 20, 15, 10, (7.5), 5 und 0 mg) |
| Budenosid | | Lokaltherapie, insbes. bei Befall des terminalen Ileums und des rechtsseitigen Kolons, 3x 3 mg p.o., Klysmen 2 mg/d |
| Immunsuppressiva | | |
| Azathioprin 6-Mercaptopurin | Hemmung der Lymphozytenfunktion über die Hemmung der Purinsynthese und Apoptoseinduktion mukosaler T-Zellen | Remissionserhaltung, Steroideinsparung bei chronisch aktiven Verläufen Azathioprin: 1-2.5 mg/kg KG/d 6-MP: 0.5-1.5 mg/kg KG/d |

| | | |
|---|--|--|
| Methotrexat | Antimetabolit: Hemmung der Thymidin- und Purinsynthese über die Störung der THF(Tetrahydrofolsäure)-Bereitstellung | Alternative zu Azathioprin und 6-Mercaptopurin, 5-15 mg/Woche als Dauertherapie, max. Dosis 25 mg/Woche |
| Immunmodulatoren, TNF-α-Antikörper | | |
| Infliximab | Apoptoseinduktion von Monozyten und T-Helferzellen durch neutralisierende monoklonale TNF- α -Antikörper | CU-Therapie: Woche 0, 2, 6, dann alle 8 Wochen jeweils 5 mg/kg KG i.v. |
| Adalimumab | monoklonaler TNF- α -Antikörper | CU-Therapie: Woche 0: 160 mg, Woche 2: 80 mg, dann alle 2 Wochen 40 mg s.c. |
| Golimumab | bildet mit TNF α Komplexe und verhindert so die TNF α -Bindung an TNF α -Rezeptoren | CU-Therapie: Woche 0: 200 mg, Woche 2: 100 mg, danach alle 4 Wochen bei KG <80 kg 50 mg, bei KG >80 kg 100 mg s.c. |
| Vedolizumab | Hemmung der Lymphozytenbindung an darmspezifische MAdCAM-Rezeptoren durch Blockierung von α 4 β 7-Integrin auf deren Oberfläche | für mittelschwere bis schwere Verläufe, bei denen konventionelle Therapien oder TNF- α -Antagonisten unwirksam sind oder nicht vertragen werden CU-Therapie: Einleitung, Woche 0, 2, 6: 300 mg, dann alle 8 Wochen 300 mg i.v. |

Tabelle 1.6: Medikamentöse Therapieansätze bei M. Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) (Tabelle modifiziert aus Göke^{35,41})

*CU: Colitis ulcerosa

Neben dem pharmakologischen Therapieansatz spielt in der Behandlung der CED und deren Komplikationen auch die Chirurgie eine wichtige Rolle. Bei einem schweren Verlauf der Colitis ulcerosa und einem Versagen der medikamentösen Therapie kann eine Proktokolektomie sinnvoll sein und ermöglicht das Absetzen jeglicher Immunsuppressiva. Aufgrund der transmuralen Ausbreitung des M. Crohn kommt es häufig zu Komplikationen wie Stenosen, Fistelbildungen, Konglomerattumoren, Adhäsionen und Abszessen. In diesen Fällen lässt sich die chirurgische Intervention oftmals nicht vermeiden. Sie sollte im Sinne einer „minimal surgery“ durchgeführt werden und umfasst elektive Eingriffe wie Strikturoplastik und Bypassverfahren sowie Notfalleingriffe, z.B. im Falle einer Perforation oder Durchwanderungsperitonitis. Der häufigste chirurgische Eingriff bei M. Crohn-Patienten ist die Ileozökalresektion.

Chirurgische und pharmakologische Therapiemaßnahmen stellen nicht die einzigen Behandlungsmöglichkeiten dar. Besonders während eines akuten Schubes müssen ernährungsspezifische Maßnahmen ergriffen werden. Die Diät sollte im akuten Schub ballaststoffarm, eiweißreich und leicht resorbierbar sein. In einigen Fällen können eine Null-Diät und eine temporäre parenterale Ernährung zur Besserung der Symptome notwendig werden. Besonders bei Kindern und Jugendlichen ist eine Ernährungstherapie hoch effektiv.

Auch supportive oder analytische Psychotherapie sowie das Beitreten in Selbsthilfegruppen können sich für diese Patienten als sehr hilfreich erweisen.

1.1.6 Pathogenese

Die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bis heute nicht vollständig aufgeschlüsselt. Bei der Krankheits-Pathogenese handelt es sich beim M. Crohn und der Colitis ulcerosa um ein multifaktorielles Geschehen, in dem sowohl exogene als auch endogene Faktoren eine wichtige Rolle spielen⁴²⁻⁴⁶.

Da sich beide Krankheitsbilder als anhaltende Entzündungsreaktionen im Gastrointestinaltrakt darstellen, richtete sich das wissenschaftliche Interesse schon früh auf das Immunsystem^{47,48}. Es entstanden verschiedene Theorien zur Pathogenese der CED, wobei die eine einen Immundefekt mit inadäquater Antwort des Immunsystems auf nicht pathogene Antigene postulierte, die andere eine defekte Barrierefunktion der Mukosa und somit eine unübliche Exposition des Immunsystems gegenüber sonst nicht bekannten Antigenen annahm und eine weitere eine adäquate Immunantwort auf einen pathogenen Erreger in Erwägung zog, wobei bis heute kein solcher bekannt ist.

Für die Ätiologie der CED kommen verschiedene Faktoren in Frage. Zum einen bestätigen Familienstudien und neuerdings auch genomweite Assoziationsstudien (GWAS), dass die Genetik eine entscheidende Rolle spielt. Zum anderen zeigen epidemiologische Studien, dass Umweltfaktoren ebenfalls entscheidend die Inzidenz beeinflussen. Da es sich um multifaktoriell bedingte Krankheiten handelt, gibt es jedoch weder ein Gen noch einen Umweltfaktor, die für das Entstehen einer CED allein verantwortlich gemacht werden können.

Im Folgenden sollen erst die Umwelteinflüsse und dann die Rolle und Funktion des Immunsystems besprochen werden. Der Genetik wird aufgrund ihres Umfangs und ihrer Bedeutung in dieser Arbeit eigens das Kapitel 1.2 gewidmet. Folgende Abbildung zeigt die drei wichtigsten Einflussfaktoren, die zur Entstehung von CED beitragen.

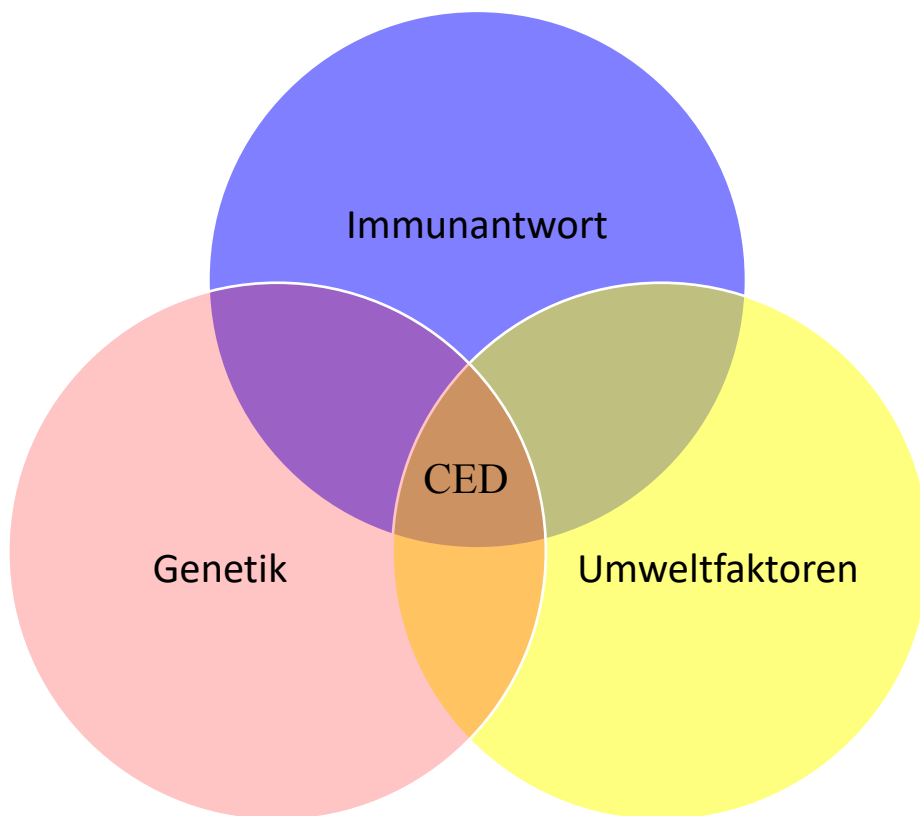


Abbildung 1.2.: Die drei Hauptbausteine in der Entstehung von CED: „Genetik“, „Immunantwort“ und „Umweltfaktoren“.

1.1.6.1 Umweltfaktoren

Die Umweltfaktoren zählen im Gegensatz zum Immunsystem und der Genetik zu den exogenen Faktoren. Bereits oben erwähnte epidemiologische Studien, die eine unterschiedliche geographische und zeitliche Verteilung der CED zeigten, lieferten wichtige Hinweise auf die mögliche Rolle von Umweltfaktoren. Andererseits hat sich bis jetzt kein einzelner, für die Entstehung dieser multifaktoriell bedingten Krankheiten verantwortlicher Risikofaktor herausstellen können. Vielmehr scheint ein westlicher Lebensstil im Allgemeinen zu einem erhöhten Risiko beizutragen. Das in epidemiologischen Studien gezeigte Nord-Süd-Gefälle und das West-Ost-Gefälle sowie die im Vergleich zu ländlichen Regionen erhöhte Inzidenz der CED in städtischen Gebieten, aber auch der deutliche Anstieg der Inzidenzen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts (s. Kapitel 1.1.3 Epidemiologie), die steigende Inzidenz bei Einwanderern in wirtschaftlich höher entwickelten Ländern und die steigende Inzidenz im Rahmen der wirtschaftlichen Entwicklung südlicher und asiatischer Länder sind Hinweise auf eine potentiell ausschlaggebende Rolle der sogenannten Zivilisationsfaktoren bei der Entstehung von CED. Dabei ist nicht immer genau klar, welchen Einfluss dabei die Umweltfaktoren spielen. Man nimmt an, dass die sich in den letzten Jahrzehnten enorm veränderten Ernährungs- und Rauchgewohnheiten und eine verstärkte Exposition von Umweltverschmutzung und Industriechemikalien bedeutend sind⁴⁹. Im Folgenden sollen einige für einen westlichen Lebensstil charakteristische Eigenschaften und Gewohnheiten einzeln besprochen werden.

Da der M. Crohn und die Colitis ulcerosa im Gastrointestinaltrakt auftreten, wurde der Ernährung schon früh eine wichtige Rolle eingeräumt. Insbesondere in Bevölkerungen mit hohem Konsum an raffinierten Kohlenhydraten und Milchprodukten konnten CED häufiger beobachtet werden. Der Konsum von Sojaprodukten scheint hingegen einen protektiven Effekt der Entstehung von CED gegenüber zu haben. Andererseits könnten diese Beobachtungen aber auch auf unterschiedliche geographische Hintergründe zurückzuführen sein. Schließlich lindern weder eine milchfreie Ernährung noch eine sojareiche Kost die Symptome⁵⁰.

Das Rauchen scheint auf die Colitis ulcerosa und den M. Crohn unterschiedliche Einflüsse zu haben^{50,51}. Es gibt mehr Nichtraucher unter Colitis ulcerosa-Patienten als unter

Menschen ohne Colitis ulcerosa^{50,52}. Der Tabakkonsum hat sich als der wichtigste exogene Faktor mit negativer Beeinflussung des M. Crohn und mit positiver Beeinflussung der Colitis ulcerosa herausgestellt^{50,53}.

Auch die in den Industriestaaten höheren Hygienestandards scheinen die Entstehung von CED zu beeinflussen. Kinder aus einem hygienischeren Umfeld mit modernen Sanitäreinrichtungen weisen ein erhöhtes Risiko auf, an einer CED zu erkranken^{54,55}. Das ist vermutlich auf eine fehlende Exposition gegenüber bestimmten Antigenen in der Kindheit zurückzuführen, was wiederum eine adäquate und ausreichende Immunantwort verhindert^{49,50}. Eine Studie erbrachte den Nachweis, dass sich natürliche Killer-T-Zellen vom Typ I (invariante natürliche Killer-T-Zellen) in der Lamina propria des Kolons und in der Lunge von keimfreien Mäusen ansammeln. Eine Kolonisierung neugeborener keimfreier Mäuse mit Mikrobiota schützte die Tiere vor einer solchen Akkumulation von natürlichen Killer-T-Zellen und somit vor einer erhöhten Morbidität in Modellen mit CED und allergischem Asthma⁵⁶.

Eine Metaanalyse konnte zeigen, dass eine Appendektomie das Risiko, an Colitis ulcerosa zu erkranken, um 69% reduziert⁵⁷. Das relative Risiko, an M. Crohn zu erkranken, scheint hingegen erhöht zu sein⁵⁸.

1.1.6.2 Das gastrointestinale Immunsystem

Das Immunsystem spielt bei der Entstehung von CED eine Schlüsselrolle. Der Darm stellt ein Erregerreservoir dar, mit dem sich die Darmschleimhaut ständig auseinandersetzen muss. Einerseits sollten pathogene Erreger erkannt und bekämpft werden, um einen übermäßigen Eintritt von Erregern in die tieferen Schichten des Darmes zu vermeiden, andererseits soll eine Toleranz gegenüber apathogenen Keimen aufrechterhalten werden, um eine Homöostase zu ermöglichen.

Zunächst soll auf die Funktion der mukosalen Barriere im GI-Trakt, dann auf die Rolle des Immunsystems und zuletzt auf die mögliche Auslösung der CED durch Mikrobiota eingegangen werden.

1.1.6.2.1 Die mukosale Barriere im Gastrointestinaltrakt

Von allen Körperoberflächen zeigt die gastrointestinale Mukosa die größte Austauschfläche mit der Außenwelt⁴⁷. Die intestinalen Epithelzellen bilden eine Schutzbarriere gegen einen überschüssigen Eintritt von luminalen Antigenen in die tieferen Schichten der Mukosa, wobei eine selektive Permeabilität erforderlich ist, die einerseits die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen aus dem Darmlumen und die Sekretion von Stoffen ermöglicht, andererseits die Barrierefunktion gegen unerwünschte Mikroorganismen erhalten soll. Eine intakte Barrierefunktion wird durch interzelluläre Zellverbindungen (Junctions) ermöglicht, welche den parazellulären Raum verschließen, und durch Tight Junctions, welche die Dichtigkeit aufrecht erhalten^{59,60}. In erstgradigen Verwandten von M. Crohn-Patienten konnte eine ungewöhnlich hohe intestinale Permeabilität nachgewiesen werden⁶¹⁻⁶⁵. Bei Patienten mit CED weist der parazelluläre Raum eine verminderte Dichtigkeit auf und die Regulierung der Tight Junctions ist fehlerhaft^{59,60}. Diese Eigenschaften könnten einen primären Defekt der Barrierefunktion darstellen, aber auch eine Folge des entzündlichen Prozesses sein^{59,60,66-69}. Expressionsanalysen aus menschlichen CED-Biopsien ergaben, dass Zell-Zellverbindungen wie E-Cadherin und β -Catenin herunterreguliert waren, wobei der zugrunde liegende Mechanismus unbekannt ist⁷⁰. Der Prostaglandin E₂-Rezeptor 4 (EP4) wird in intestinalen Epithelzellen exprimiert und reguliert die epitheliale Barrierefunktion⁶⁵. In *Ptger4*-Knockout-Mäusen zeigte sich eine höhere Anfälligkeit für eine Dextran-Natrium-Sulfat-Kolitis im Vergleich zu Wild-Typ-Tieren⁷¹. 5p13.1 ist ein M. Crohn-Suszeptibilitätslokus, der in einem 1.25 Mb großen, nicht kodierenden DNA-Abschnitt (*gene-desert*) liegt und mit Krankheitssuszeptibilität bei M. Crohn assoziiert ist. Die zugehörigen Allele korrelieren mit der quantitativen Expression des EP4-Rezeptors⁶⁵. Polymorphismen in der Nähe des Gens, welches EP4 kodiert (*PTGER4*), wurden mit M. Crohn in Verbindung gebracht⁵⁹.

Zu den intestinalen Epithelzellen gehören verschiedene Zellen mit unterschiedlichen Funktionen. Die Becherzellen sezernieren in gesundem Zustand Schleim, der auf dem Epithel liegt und verhindert, dass Mikrobiota aus dem Darmlumen in die tieferen Schichten gelangen. Somit wird der Kontakt zwischen Erregern und Epithelzellen stark eingeschränkt. MUC2 ist eine wichtige Muzinkomponente, und Mäuse, in denen das

MUC2-kodierende Gen ausgeschaltet ist, entwickeln eine intestinale Entzündung^{59,72}. Außerdem konnte eine Variante in einer genomischen Region, die MUC19 kodiert, mit M. Crohn in Zusammenhang gebracht werden⁷³.

Die bakterielle Besiedlung führt in Ileum und Kolon zur Synthese eines weiteren becherzellspezifischen Proteins, RELM β (engl.: resistin-like molecule beta). Studien konnten zeigen, dass das Fehlen dieses Gens bei Mäusen mit Dextran-Natrium-Sulfat-Behandlung die Schwere der Kolitis vermindert⁷⁴. RELM β beeinträchtigt weder die Barrierefunktion noch die Epithelproliferation in GI-Trakt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte jedoch gezeigt werden, dass es Makrophagen zur Produktion von TNF- α anregt. Dies lässt vermuten, dass beim Verlust der epithelialen Barrierefunktion durch Dextran-Natrium-Sulfat das angeborene Immunsystem in der Mukosa durch das im Lumen vorhandene RELM β aktiviert wird.

Durch Paneth-Zellen sezernierte antimikrobielle Peptide wie α -Defensine⁷⁵⁻⁷⁷ und die von Enterozyten produzierten Immunglobuline A (IgA)⁷⁸ stellen einen weiteren Schutzfaktor luminalen Mikrobiota gegenüber dar. Diese Faktoren minimieren den potentiellen Kontakt zwischen luminalen Erregern und intestinalem Immunsystem und setzen dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Immunantwort herab. Beobachtungen lassen vermuten, dass in Patienten mit mutiertem *NOD2*-Gen eine Verminderung der durch Paneth-Zellen sezernierten α -Defensine zur Pathogenese von M. Crohn im terminalen Ileum beitragen könnte^{79,80}. Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass ein Mangel von Paneth-Zellen das Risiko für M. Crohn erhöht, während Becherzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Kolitis spielen^{74,81-83}.

Die M-Zellen nehmen auf ihrer apikalen Seite Antigene (Makromoleküle, Bakterien, Viren, kleinere Parasiten) über Endozytose auf und geben diese an der basalen Seite an die Zellen des adaptiven Immunsystems ab. Sie stellen daher eine Verbindung zwischen dem intestinalen Lumen und den tieferen Schichten des Darms dar.

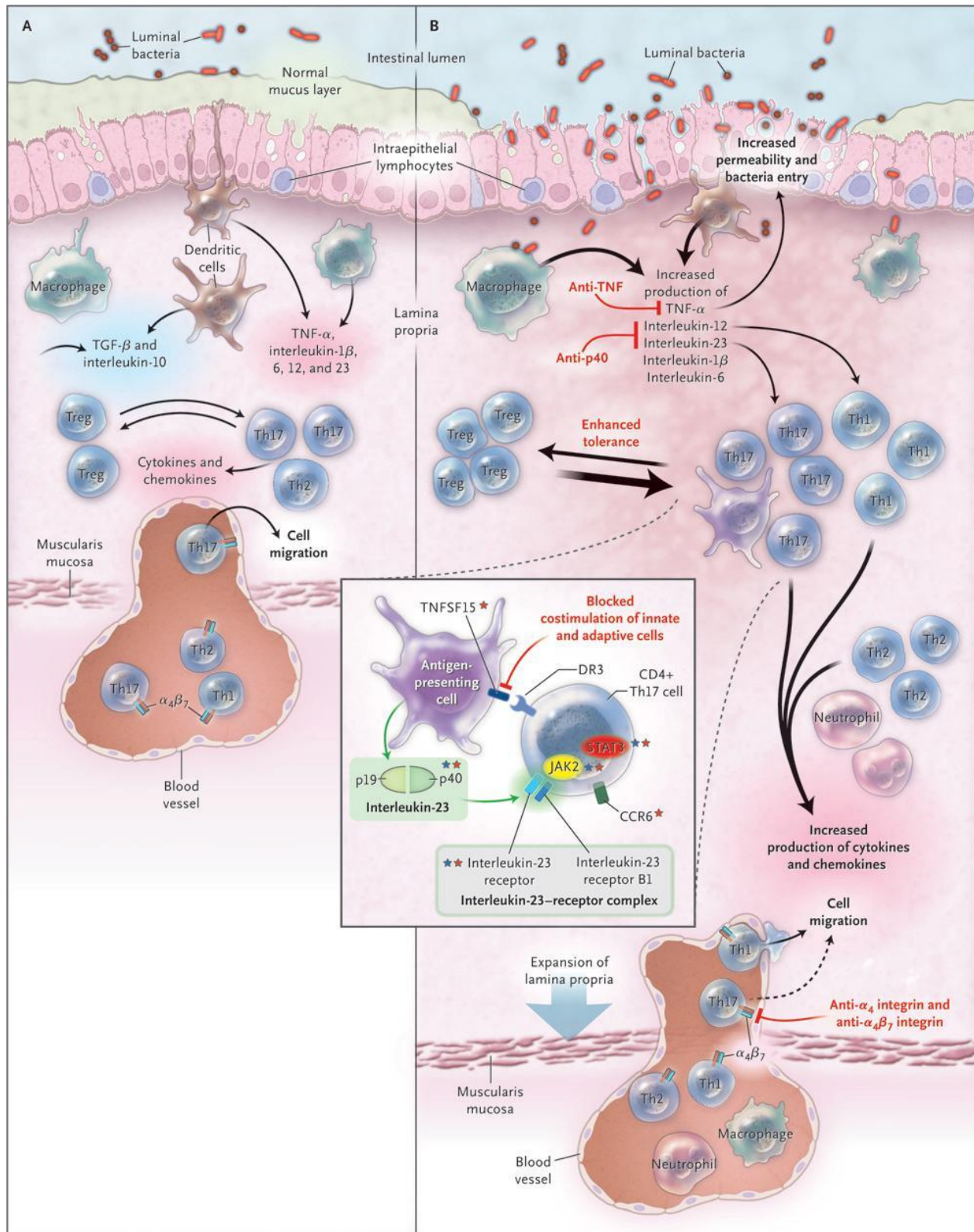


Abbildung 1.3: Das intestinale Immunsystem im Gesundheits- (A) und Krankheitszustand (B) (Abbildung aus Abraham⁵⁹)

1.1.6.2.2 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung von CED

Neben einer intakten mukosalen Barrierefunktion ist zur Erhaltung der gastrointestinalen Homöostase ein funktionierendes Immunsystem wichtig, welches in der Lage sein soll, Antigene aus Nahrungsbestandteilen und aus der physiologischen Darmflora zu tolerieren, pathologische Mikroorganismen jedoch effektiv zu bekämpfen.

Die Aufnahme von Antigenen über die gastrointestinale Mukosa kann einerseits zu einer lokalen Abwehr (mit Produktion von sekretorischem IgA) führen oder in einer systemischen Abwehrantwort resultieren. Andererseits kann – und das ist für die meisten aufgenommenen Antigene der Fall – die Induktion einer systemischen Immuntoleranz erfolgen^{84,85}. Dieser Mechanismus nennt sich „orale Toleranz“, da gegenüber oral aufgenommenen (und nicht gegenüber systemisch applizierten) Antigenen eine immunologische Toleranz induziert werden kann. Suppressorzellen (eine Untergruppe von T-Lymphozyten) setzen antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10, und TGF- β frei⁸⁴. TGF- β wird von Th3-Zellen (einer Suppressorzell-Subspezies) sezerniert, die nur nach oraler, nicht aber nach systemischer Antigengabe generiert werden⁸⁴. In verschiedenen Krankheitsmodellen war nach *in vivo*-Neutralisation von TGF- β keine orale Toleranzinduktion mehr möglich⁸⁴.

Im GI-Trakt werden kontinuierlich Antigene aus dem intestinalen Lumen aufgenommen, um je nach entnommenem Antigen entweder Abwehrreaktionen gegen luminale Erreger zu triggern oder Epithelzellen und antigenpräsentierende Zellen (APC) zur Entwicklung von Toleranzmechanismen zu induzieren⁸⁶⁻⁸⁹. Diese Antigen-Aufnahme erfolgt hauptsächlich durch Makrophagen, die zu den APC gehören. Sie besitzen Zellausläufer, mit denen sie durch die Tight Junctions in das Darmlumen ragen können, ohne die intestinale Barrierefunktion zu beeinträchtigen^{47,90,91}. Über die sog. pattern-recognition receptors (PRRs), die für die angeborene Immunabwehr charakteristisch sind und relativ unspezifisch hochkonservierte, mikrobielle Strukturen, sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl.: pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), erkennen, können Makrophagen luminale Antigene aufnehmen⁹². Zu den PRRs gehören u.a. die Toll-like-Rezeptoren (TLR) und die Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD)-like Rezeptoren (NLRs), die PAMPs wie Lipopolysaccharide, Lipoproteine, Peptidoglykane und Flagellin binden^{48,65,93,94}. Eine angemessene Funktion der APC ist

stark von der Funktionalität der PRRs abhängig. Mehrere Studien konnten zeigen, dass der M. Crohn mit genetischen Mutationen dieser Rezeptoren in Verbindung gebracht werden kann^{47,95-97}.

Muramyl-Dipeptid (MDP), welches sich in bakteriellem Peptidoglykan findet, wird von der Leucine-rich Repeat (LRR)-Domäne von NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) in Paneth-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen (DC) und Endothelzellen erkannt. Dies initiiert die Aktivierung der NF- κ B- und MAP-Kinasen-Signalwege^{59,65,98-100} und führt zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden und von Zytokinen (z.B. TNF- α und Interleukin-1 β)^{59,100,101}. Studien haben gezeigt, dass interagierende Faktoren diese Signalwege sowohl positiv als auch negativ beeinflussen^{65,102-106}. Neben den APC exprimieren u.a. auch intestinale Epithelzellen TLR, NOD1, NOD2 und Rezeptoren für verschiedene Chemokine und antikörperspezifische Fc^{65,107-109}. Einige kommensale Mikrobiota scheinen in der Lage zu sein, die Aktivierung von NF- κ B in den Epithelzellen zu minimieren¹¹⁰, indem sie durch die Inhibierung von I κ B α -Abbau und Proteinubiquitinierung und die Förderung des PPAR γ -vermittelten nukleären Export von RelA die Signaltransduktion beenden und somit die intestinale Entzündung dämpfen¹¹¹. Intestinale APC zeigen eine stark reduzierte Sekretion von proinflammatorischen Enzymen^{59,112-115}, wobei sie effektiv Bakterien töten. Dies ermöglicht dem intestinalen Immunsystem eine Verteidigung gegen luminale Mikroorganismen bei gleichzeitig minimaler Gewebsschädigung^{59,113}.

Durch den Prozess der Autophagie werden intrazelluläre Komponente wie abzubauenen Organellen und apoptotische Körperchen beseitigt^{59,116} und Zellen gegen verschiedene Pathogene und zytotoxische Bakteriengifte geschützt^{65,117-119}. Die Entdeckung, dass ein SNP in dem Autophagie-Gen *ATG16L1* mit einem erhöhten Krankheitsrisiko für M. Crohn einhergeht, hebt die Bedeutung der Autophagie in der Pathogenese der CED hervor^{65,120,121}. *ATG16L1* wird im intestinalen Epithel, in APC, in CD4/8-Zellen, in B1- und in B-Gedächtniszellen exprimiert. Einige Studien konnten *ATG16L1* mit der Immunantwort auf intrazelluläre Bakterien in Verbindung bringen^{65,121}. Außerdem wurde *IRGM* (immunity-related GTPase M), ein weiteres Autophagiegen, mit dem Krankheitsrisiko für M. Crohn in Zusammenhang gebracht^{65,122}. *IRGM* wird zur mykobakteriellen Abwehr benötigt und könnte in der oft in M. Crohn beobachteten Granulombildung eine analoge

Rolle spielen^{65,123,124}. Auch NADPH-Oxidasen und assoziierte akzessorische Proteine sind essentielle Komponenten der zellulären Antwort bei einer mikrobiellen Invasion^{65,125-127}. Ein SNP im ersten Intron auf *NCF4* (p40Phox) ist mit Suszeptibilität für CED assoziiert^{65,121}. Mutationen in *NCF4* lassen vermuten, dass eine veränderte Phagosomenfunktion bezüglich der Erkennung von kommensalen Bakterien zur Krankheit beitragen könnte. Funktionell veränderte Phagosome können Bakterien weniger effektiv töten, was zu einer verlängerten Immunaktivierung oder einem unvollständigen Pathogenabbau führen würde.

Die dendritischen Zellen präsentieren den naiven CD4⁺-T-Zellen (T-Helfer-Zellen) in den sekundären Lymphorganen des GI-Traktes (Peyer-Plaques, mesenteriale Lymphknoten, isolierte Lymphfollikel) die aus dem Darmlumen entnommenen Peptid-Antigene^{59,112,128} und stellen somit die Verbindung zur adaptiven Immunabwehr her. Der Kontakt mit den Antigenen aktiviert die T-Zellen und die DC triggern in diesen aktivierten Zellen die Induktion von Integrin $\alpha 4\beta 7$ (einem Adhäsionsmolekül) und CCR9 (einem Chemokinrezeptor) durch die Freisetzung von Retinolsäure (einem Vitamin-A-Metabolit)¹²⁹. Dies verleiht den T-Zellen enterotopische Eigenschaften^{47,59,130-132} und sie verweilen als langlebige Effektorgedächtniszellen in der Epithelzellschicht und der Lamina propria der Darmmukosa, wo sie im Laufe der Zeit akkumulieren¹¹⁴.

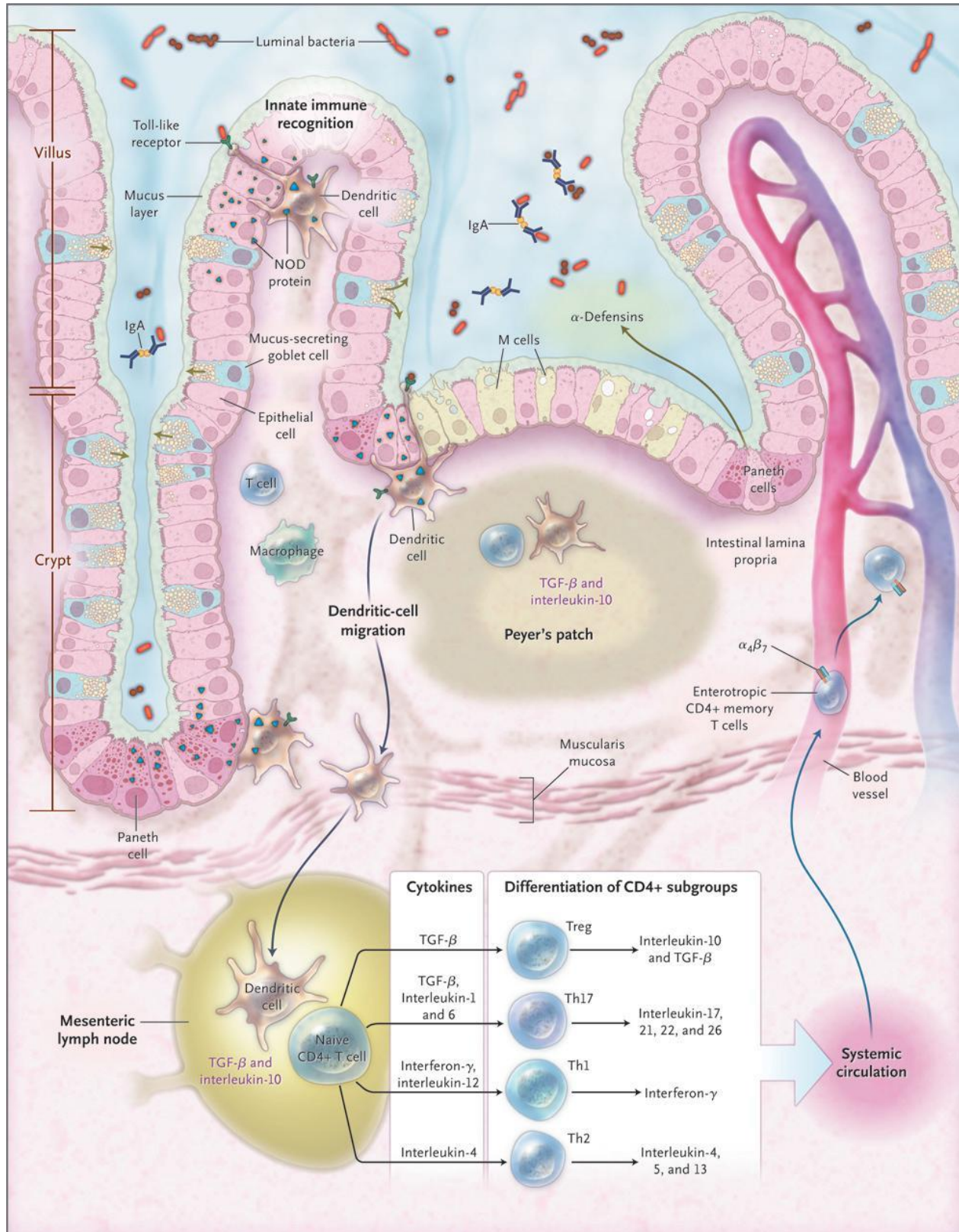


Abbildung 1.4: Das intestinale Immunsystem (Abbildung aus Abraham⁵⁹)

In gesundem Zustand sezernieren die Becherzellen eine Schleimschicht, die den direkten Kontakt zwischen intestinalen Epithelzellen und luminalen Bakterien einschränkt. Sowohl die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden (z.B. α -Defensine) durch Paneth-Zellen als auch die Synthese von Immunglobulin A (IgA) stellen einen weiteren Schutz vor luminalen Mikrobiota dar. Über PRR wie TLR und NOD können Epithelzellen, DC und Makrophagen luminal Antigen aufnehmen. Diese werden den naiven T-Helfer-Zellen in den sekundären Lymphorganen des GI-Traktes (Peyer-Plaques und mesenteriale Lymphknoten) präsentiert. Dort beeinflussen einerseits der Phänotyp der APC und das Zytokin-Milieu (TGF- β und IL-10) die Differenzierung der T-Zell-Untergruppen mit ihren charakteristischen Zytokin-Profilen und werden andererseits Moleküle mit enterotropischen Eigenschaften (z.B. α 4 β 7) synthetisiert, die zur Migration von Lymphozyten in die Darmmukosa führen.

Die CD4⁺-Zellen spielen in der Pathogenese des M. Crohn und der Colitis ulcerosa eine Schlüsselrolle. Sie werden nach ihrem Zytokinprofil in Th1-, Th2- und Th17-Effektor-Zellen (=T-Helferzellen) eingeteilt. Die Differenzierung dieser T-Zellen bedarf verschiedener Transkriptionsfaktoren, und zwar T-bet für Th1-^{133,134}, GATA3 für Th2-^{133,135} und ROR γ t für Th17-Zellen^{133,136}. Effektor-Funktionen von T-Zellen sind durch andere T-Zell-Untergruppen (regulatorische T-Zellen, Suppressorzellen) gegenreguliert. Zu diesen gehören IL-10-produzierende Tr1-, TGF- β -produzierende Th3- und vom Thymus stammende CD4⁺CD25⁺-T-reg-Zellen, die durch Zell-Zell-Kontakt die Reaktion von Effektor-T-Lymphozyten verhindern. Die Bildung von CD4⁺CD25⁺-T-reg-Zellen bedarf des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Forkhead box protein 3)^{133,137}.

Die Zellen dieser Untergruppen sezernieren verschiedene und für sie charakteristische Zytokine. Um eine intestinale immunologische Homöostase aufrechterhalten zu können, muss die Regulierung dieser Untergruppen fein abgestimmt sein^{59,138,139}. Die Effektor-Untergruppen (Th1-, Th2- und Th17-Zellen) sind für die Verteidigung gegen Pathogene und die Vermeidung eines überschießenden Eintritts von luminalen Antigenen von Bedeutung. Andererseits kann aber eine im Vergleich zu den Treg-Zellen übermäßige Expandierung und Überaktivität dieser Zellen zu einer intestinalen Entzündung führen^{59,139-147}. CED-Studien bei Mäusen und Menschen konnten eine Dysregulierung von intestinalen CD4⁺-Zell-Untergruppen bei der Pathogenese dieser Krankheiten nachweisen. Bei M. Crohn zeigte sich eine erhöhte Produktion des Th17-Zytokins IL-17A und des Th1-Zytokins IFN- γ und TNF- α in der intestinalen Mukosa^{59,143,148}. Im Gegensatz dazu fiel bei der Colitis ulcerosa eine Erhöhung von IL-17A und Th2-Zytokinen wie IL-13 auf^{59,143,148,149}. Für die Th17-Zellen ist der IL-23-Signalweg von großer Bedeutung.

Polymorphismen in verschiedenen Genen, die bei diesem Signalweg und der Th17-Zell-Funktion eine wichtige Rolle spielen, wurden mit M. Crohn und Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht^{59,73}.

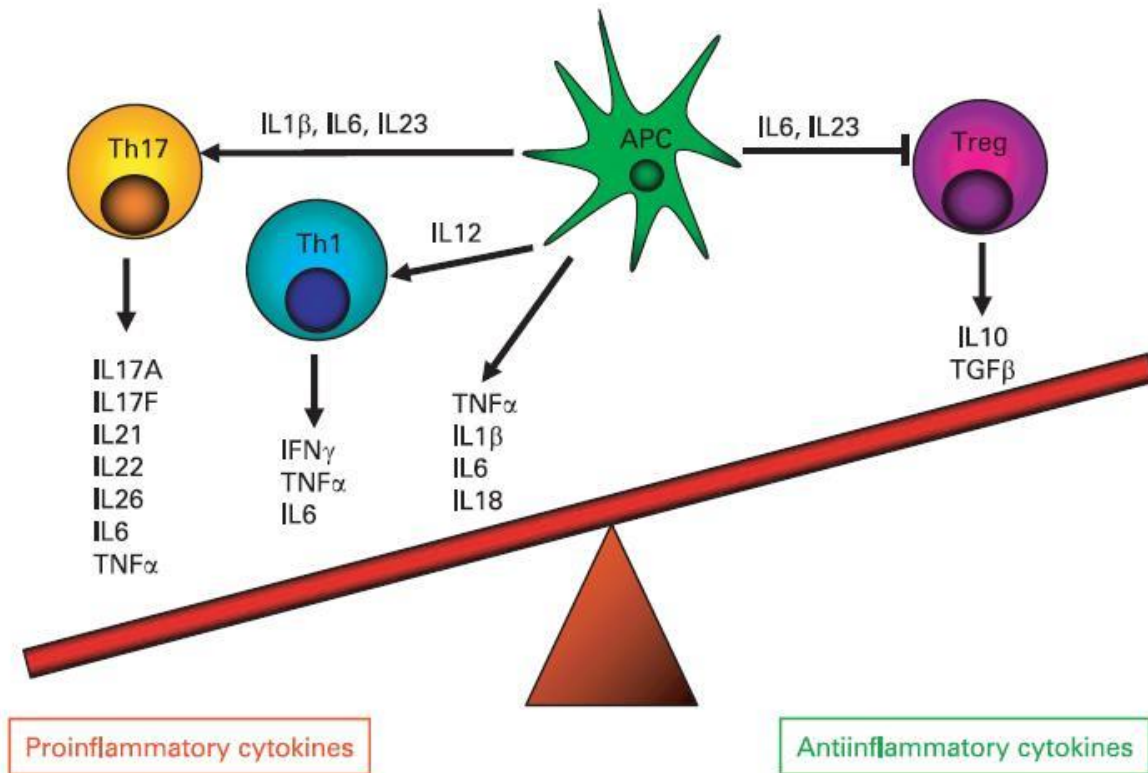


Abbildung 1.5: Die Dysbalance von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei M. Crohn (Abbildung aus Brand¹⁵⁰)

1.1.6.2.3 Mikrobiota als pathogenetischer Faktor der CED-Entstehung

Verschiedene Anhaltspunkte sprechen dafür, dass Mikrobiota bei der Entwicklung und Pathogenese von CED entscheidend sind. Einen Hinweis dafür liefert zum Beispiel die Tatsache, dass sich Antibiotika-Therapien und die Anwendung von sog. Probiotika zumindest bei einigen CED-Patienten als hilfreich erwiesen haben^{65,151,152}. Außerdem konnte bei CED-Patienten häufiger als bei gesunden Kontrollpersonen^{65,153,154} in der intestinalen Flora der *Escherichia coli*-Stamm AIEC (adhärent-invasiver *E. coli*)

nachgewiesen werden, der an der intestinalen Mukosa haftet und mitunter sogar in sie eindringen kann^{59,153}. Weiterhin zeigten Beobachtungen bei Tiermodellen, dass eine „spontane“ chronische Kolitis bei Mäusen fast ausschließlich bei Anwesenheit von intestinalen Bakterien entstand^{59,65,140,155}. Andere Studien^{65,156} konnten zeigen, dass die Art der Immunantwort für den Ausgang der Interaktion zwischen Erreger und Immunsystem eher verantwortlich ist als die biologischen Eigenschaften luminaler Bakterienspezies. Unsere Kenntnisse der intestinalen Mikrobiota sind jedoch bis heute noch unzureichend^{65,157}.

Obwohl bereits mehrere spezifische Pathogene für die Entstehung von CED zumindest mitverantwortlich gemacht wurden, konnte kein einziges davon als allein ursächlich identifiziert werden. Vielmehr scheinen physiologisch vorkommende Antigene die Entzündung im Darm zu initiieren. Im Vergleich zu Kontrollpersonen weisen z.B. M. Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten eine verminderte Anzahl und Vielfalt an mukosa-assoziierten Firmicutes- und Bacteroidetes-Stämmen auf^{59,158,159}. Es ist jedoch nicht eindeutig festzulegen, ob diese Unterschiede kausal zur Krankheit beitragen oder lediglich sekundäre Veränderungen widerspiegeln, die durch die Entzündung verursacht wurden.

1.1.6.3 Genetik

Bereits früh wurde die Rolle der Genetik bei CED durch Beobachtungen von gehäuften Auftreten bei Familienangehörigen und in bestimmten Bevölkerungsgruppen als ätiologisch relevant eingeschätzt. Verschiedene GWAS identifizierten Suszeptibilitätsgene, die diese Theorie untermauerten und bestätigten, dass sich CED oft bei genetisch vorbelasteten Individuen entwickeln. Details dazu sind im folgenden Kapitel dargestellt.

1.2 Genetik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

1.2.1 Die Rolle der Genetik in der Pathogenese von CED

Mehrere Beobachtungen stützen die Theorie eines starken Einflusses der Genetik in der CED-Pathogenese. Epidemiologische Daten zeigen, dass die Inzidenz und Prävalenz der CED in bestimmten Bevölkerungsgruppen bzw. geographischen Regionen höher ist als in anderen. Das bereits beschriebene Nord-Süd-Gefälle und das geringe Auftreten von CED in Afrika, Asien und Südamerika sind ein Beispiel dafür^{26-34,58,160-163}.

Auch die Rasse bzw. die ethnische Herkunft scheinen einen hohen Einfluss auf die Suszeptibilität der CED zu haben. Prävalenzraten für CED in den USA waren bei nicht-Weißen durchweg niedriger. In einer Briefumfrage lagen die Prävalenzraten für M. Crohn pro 100 000 Einwohnern bei Weißen bei 43.6, bei Afroamerikanern bei 29.8, bei Lateinamerikanern bei 4.1 und bei Asiaten bei 5.6^{42,164}. Unter den verschiedenen ethnischen Gruppen weisen in den USA Populationen jüdischer Herkunft, verglichen mit nicht-jüdischen Weißen, das höchste Risiko auf, an einer CED zu erkranken¹⁶⁵: Die Inzidenz liegt 2- bis 4fach und die Prävalenz 2- bis 9fach höher¹⁶⁶. Diese erhöhten CED-Zahlen bei aschkenasischen Juden wurden über verschiedene Zeiträume und geographische Regionen hinweg beobachtet. Das lässt vermuten, dass bei der Entwicklung von CED bei aschkenasischen Juden genetische Faktoren eine größere Rolle spielen könnten als bei Populationen nicht-jüdischer Herkunft¹⁶⁷.

Auch ein gehäuftes Auftreten von CED bei Verwandten lässt eine genetische Komponente an der Suszeptibilität des M. Crohn und der Colitis ulcerosa vermuten. Familienstudien zeigen, dass 5-10% aller CED-Erkrankten eine positive Familienanamnese aufweisen. Somit ist der größte Risikofaktor, eine CED zu entwickeln, ein bereits erkrankter Verwandter^{42,168-170}. Das relative Risiko einer CED bei erstgradigen Verwandten kann mit Kohorten- oder mit Fall-Kontroll-Studien geschätzt werden. In einer Kohortenstudie¹⁷¹ wurde gezeigt, dass Verwandte von Patienten mit Colitis ulcerosa ein relatives Risiko von 10 und Verwandte von M. Crohn-Patienten ein relatives Risiko von 14 hatten¹⁷¹. Ähnliche Schätzungen des relativen Risikos für erstgradige Verwandte von CED-Patienten (14-15fach erhöhtes Risiko) wurden in zwei Fallkontroll-Studien beschrieben^{42,172,173}. In Familien, in denen mehr als ein Mitglied an einer CED erkrankt

ist, liegt in 75% der Fälle dieselbe Krankheit vor (also jeweils entweder M. Crohn oder Colitis ulcerosa). In 25% der Fälle jedoch leiden die betroffenen Familienmitglieder an unterschiedlichen CED (ein Mitglied an M. Crohn, das andere an Colitis ulcerosa)^{42,174}. Diese Daten bestätigen eine Beteiligung mehrerer Suszeptibilitätsgene an der CED-Pathogenese, wobei einige dem M. Crohn und der Colitis ulcerosa gemeinsam sind, während andere entweder der einen oder der anderen CED-Form zugeschrieben werden⁴².

Die Theorie der Vererbbarkeit einer Disposition für CED wird weiterhin durch die Tatsache gestützt, dass in nichterkrankten Familienangehörigen von M. Crohn- bzw. Colitis ulcerosa-Patienten ein erhöhter Titer von CED-assoziierten Antikörpern nachgewiesen wurde. Dazu gehören die ANCA (Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper) und die ASCA (Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae*). Hohe Serumlevel von ANCA korrelieren stark mit Colitis ulcerosa, und verschiedene Studien haben ANCA-Seropositivität in nichterkrankten Familienangehörigen von Colitis ulcerosa-Patienten beobachtet^{42,175-179}. Andere Studien hingegen waren negativ¹⁸⁰. Diese unterschiedlichen Daten für ANCA-Positivitätsraten bei nichterkrankten Familienangehörigen von Colitis ulcerosa-Patienten weisen auf die Heterogenität der Krankheit hin⁴². Für die Mehrheit der Individuen, die an M. Crohn leiden, ist ASCA ein serologischer Marker^{42,181-185}. Da jedoch einige Bevölkerungsgruppen eine höhere Prävalenz für ASCA bzw. ANCA bei nichterkrankten Verwandten von M. Crohn-Patienten aufweisen, sind weder ASCA- noch ANCA-Antikörper-Tests ausreichend sensitiv, um als einziger Screening-Test eingesetzt zu werden⁴².

Zwillings-Konkordanz-Studien sind die aussagekräftigste Methode, um besonders für M. Crohn die Beteiligung von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren in der Pathogenese der CED zu untermauern^{42,186,187}. Die Konkordanz bei monozygoten Zwillingen für M. Crohn liegt zwischen 24-58%, wohingegen dizygote Zwillinge eine Konkordanz wie bei unterschiedlich alten Geschwistern aufweisen. Bei der Colitis ulcerosa liegt die monozygote Konkordanz bei 6-17%, die dizygote bei 0-5%⁴². Die deutlich unter 100% liegende Konkordanz bei monozygoten Zwillingen zeigt, dass es eine reduzierte Penetranz für den CED-Genotyp gibt. Dies erklärt sich höchstwahrscheinlich durch nicht-

genetische Faktoren wie Umweltfaktoren und schließt eine alleinige genetische Ätiologie aus⁴².

Letztendlich wurde die Rolle der Genetik in der Ätiologie der CED durch die Entdeckung von Suszeptibilitätsgenen in GWAS bestätigt. Zum Verständnis des pathogenetischen Einflusses von SNPs muss die Funktion der durch diese Suszeptibilitätsgene kodierten Proteine analysiert werden.

1.2.2 CED-Suszeptibilitätsgene

M. Crohn und Colitis ulcerosa, die zwei Hauptformen der CED, zeichnen sich durch eine chronische Entzündung des GI-Traktes aus, die höchstwahrscheinlich durch Bakterien der intestinalen Flora bei genetisch vorbelasteten Individuen ausgelöst wird^{65,188-190}. Seit der Identifizierung von *NOD2* als erstes Suszeptibilitätsgen für M. Crohn im Jahre 2001^{95,188,191} wurden weitere M. Crohn-assoziierte genetische Varianten von Proteinen, die in der bakteriellen Erkennung oder in der mukosalen Immunantwort involviert sind, in GWAS identifiziert^{120-122,188,192-194}.

Aufgrund der genetischen Heterogenität verschiedener Völker sind Replikationsstudien in Bevölkerungsgruppen mit unterschiedlich genetischer Ausstattung entscheidend, um neue CED-Suszeptibilitätsgene zu bestätigen¹⁸⁹.

Das Erfassen der Suszeptibilitätsgene durch GWAS und die Ergründung derer Funktionen ermöglichen außerdem Rückschlüsse auf die CED-Pathogenese.

1.2.2.1 Bereits bekannte Suszeptibilitätsgene

Seit der Identifizierung des ersten Suszeptibilitätsgens für M. Crohn 2001^{95,188,191} wurde in diversen GWAS nach weiteren Suszeptibilitätsgenen für CED gesucht. Viele Studien wurden in mehreren Bevölkerungsgruppen repliziert und teilweise bestätigt. Im Folgenden werden die bereits identifizierten Suszeptibilitätsgene aufgelistet.

| Laufende Nummer | Chromosom | Position (hg19 (Mb)) | SNP | Assoziierte Gene (n zusätzliche Gene in Genlokus) |
|---------------------|-----------|----------------------|-------------------|---|
| Morbus Crohn | | | | |
| 1 | 1 | 78.62 | rs17391694 | (5) |
| 2 | 1 | 114.3 | rs6679677§ | PTPN22 , (8) |
| 3 | 1 | 120.45 | rs3897478 | ADAM30, (5) |
| 4 | 1 | 172.85 | rs9286879 | FASLG, TNFSF18, (0) |
| 5 | 2 | 27.63 | rs1728918 | UCN, (23) |
| 6 | 2 | 62.55 | rs10865331 | (3) |
| 7 | 2 | 231.09 | rs6716753 | SP140, (5) |
| 8 | 2 | 234.15 | rs12994997 | ATG16L1 , (8) |
| 9 | 4 | 48.36 | rs6837335 | (6) |
| 10 | 4 | 102.86 | rs13126505 | (1) |
| 11 | 5 | 55.43 | rs10065637 | IL6ST, IL31RA, (1) |
| 12 | 5 | 72.54 | rs7702331 | (4) |
| 13 | 5 | 173.34 | rs17695092 | CPEB4, (2) |
| 14 | 6 | 21.42 | rs12663356 | (3) |
| 15 | 6 | 31.27 | rs9264942 | (22) |
| 16 | 6 | 127.45 | rs9491697 | (3) |
| 17 | 6 | 128.24 | rs13204742 | (2) |
| 18 | 6 | 159.49 | rs212388 | TAGAP, (5) |
| 19 | 7 | 26.88‡ | rs10486483 | (2) |
| 20 | 7 | 28.17 | rs864745 | CREB5, JAZF1, (1) |
| 21 | 8 | 90.87 | rs7015630 | RIPK2, (4) |
| 22 | 8 | 129.56 | rs6651252 | (0) |
| 23 | 13 | 44.45 | rs3764147 | LACC1, (3) |
| 24 | 15 | 38.89 | rs16967103 | RASGRP1, SPRED1, (2) |

| | | | | |
|-------------------------|----|---------|------------|------------------------------|
| 25 | 16 | 50.66** | rs2066847§ | NOD2 , (6) |
| 26 | 17 | 25.84 | rs2945412 | LGALS9, NOS2 , (3) |
| 27 | 19 | 1.12 | rs2024092 | GPX4, HMHA1 , (20) |
| 28 | 19 | 46.85‡ | rs4802307 | (9) |
| 29 | 19 | 49.2 | rs516246 | FUT2 , (25) |
| 30 | 21 | 34.77 | rs2284553 | IFNGR2, IFNAR1 , (10) |
| Colitis ulcerosa | | | | |
| 31 | 1 | 2.5 | rs10797432 | TNFRSF14 , (10) |
| 32 | 1 | 20.15** | rs6426833 | (9) |
| 33 | 1 | 200.09 | rs2816958 | (3) |
| 34 | 2 | 198.65 | rs1016883 | RFTN2, PLCL1 , (7) |
| 35 | 2 | 199.70* | rs17229285 | (0) |
| 36 | 3 | 53.05 | rs9847710 | PRKCD, ITIH4 , (8) |
| 37 | 4 | 103.51 | rs3774959 | NFKB1, MANBA , (2) |
| 38 | 5 | 0.59 | rs11739663 | SLC9A3 , (8) |
| 39 | 5 | 134.44 | rs254560 | (6) |
| 40 | 6 | 32.595 | rs6927022 | (15) |
| 41 | 7 | 2.78 | rs798502 | CARD11, GNA12 , (5) |
| 42 | 7 | 27.22‡ | rs4722672 | (14) |
| 43 | 7 | 107.45* | rs4380874 | DLD , (9) |
| 44 | 7 | 128.57 | rs4728142 | IRF5 , (13) |
| 45 | 11 | 96.02 | rs483905 | JRKL, MAML2 , (2) |
| 46 | 11 | 114.38 | rs561722 | FAM55A, FAM55D , (5) |
| 47 | 15 | 41.55 | rs28374715 | (11) |
| 48 | 16 | 30.47 | rs11150589 | ITGAL , (20) |
| 49 | 16 | 68.58 | rs1728785 | ZFP90 , (6) |
| 50 | 17 | 70.64 | rs7210086 | (3) |

| | | | | |
|--|----|---------|--------------------|---|
| 51 | 19 | 47.12‡ | rs1126510 | <i>CALM3</i> , (14) |
| 52 | 20 | 33.8 | rs6088765 | (11) |
| 53 | 20 | 43.06 | rs6017342 | <i>ADA</i> , <i>HNF4A</i> , (9) |
| Chronisch entzündliche Darmerkrankungen | | | | |
| 54 | 1 | 1.24 | rs12103 | <i>TNFRSF18</i> , <i>TNFRSF4</i> , (30) |
| 55 | 1 | 8.02 | rs35675666 | <i>TNFRSF9</i> , (6) |
| 56 | 1 | 22.7 | rs12568930† | (3) |
| 57 | 1 | 67.68** | rs11209026† | <i>IL23R</i> , (5) |
| 58 | 1 | 70.99 | rs2651244† | (3) |
| 59 | 1 | 151.79 | rs4845604† | <i>RORC</i> , (14) |
| 60 | 1 | 155.67 | rs670523† | (31) |
| 61 | 1 | 160.85 | rs4656958† | CD48 , (15) |
| 62 | 1 | 161.47 | rs1801274† | <i>FCGR2A/B</i> , <i>FCGR3A</i> , (13) |
| 63 | 1 | 197.6 | rs2488389 | <i>C1orf53</i> , (2) |
| 64 | 1 | 200.87 | rs7554511 | <i>KIF21B</i> , (6) |
| 65 | 1 | 206.93 | rs3024505† | <i>IL10</i> , (10) |
| 66 | 2 | 25.12 | rs6545800† | <i>ADCY3</i> , (6) |
| 67 | 2 | 28.61 | rs925255† | <i>FOSL2</i> , <i>BRE</i> , (1) |
| 68 | 2 | 43.81 | rs10495903† | (5) |
| 69 | 2 | 61.2 | rs7608910 | REL , (9) |
| 70 | 2 | 65.67 | rs6740462 | <i>SPRED2</i> , (1) |
| 71 | 2 | 102.86* | rs917997† | <i>IL18RAP</i> , <i>IL1R1</i> , (7) |
| 72 | 2 | 163.1 | rs2111485 | <i>IFIH1</i> , (5) |
| 73 | 2 | 191.92 | rs1517352 | STAT1 , STAT4 , (2) |
| 74 | 2 | 219.14 | rs2382817 | (15) |
| 75 | 2 | 241.57* | rs3749171† | GPR35 , (12) |
| 76 | 3 | 18.76 | rs4256159† | (0) |

| | | | | |
|-----|---|---------|--------------------|----------------------------|
| 77 | 3 | 48.96** | rs3197999 | MST1, PFKB4, (63) |
| 78 | 4 | 74.85 | rs2472649† | (11) |
| 79 | 4 | 123.22 | rs7657746 | IL2, IL21, (2) |
| 80 | 5 | 10.69 | rs2930047 | DAP, (2) |
| 81 | 5 | 40.38** | rs11742570† | <i>PTGER4</i> , (1) |
| 82 | 5 | 96.24 | rs1363907 | <i>ERAP2, ERAP1</i> , (3) |
| 83 | 5 | 130.01 | rs4836519† | (1) |
| 84 | 5 | 131.19* | rs2188962† | <i>IBD5 locus</i> , (18) |
| 85 | 5 | 141.51 | rs6863411† | <i>SPRY4, NDFIP1</i> , (5) |
| 86 | 5 | 150.27 | rs11741861† | <i>IRGM</i> , (10) |
| 87 | 5 | 158.8** | rs6871626† | IL12B, (3) |
| 88 | 5 | 176.79 | rs12654812 | DOK3, (17) |
| 89 | 6 | 14.71 | rs17119 | (0) |
| 90 | 6 | 20.77* | rs9358372† | (2) |
| 91 | 6 | 90.96 | rs1847472 | (1) |
| 92 | 6 | 106.43 | rs6568421† | (2) |
| 93 | 6 | 111.82 | rs3851228 | TRAF3IP2, (4) |
| 94 | 6 | 138 | rs6920220† | <i>TNFAIP3</i> , (1) |
| 95 | 6 | 143.9 | rs12199775 | <i>PHACTR2</i> , (5) |
| 96 | 6 | 167.37 | rs1819333† | CCR6, RPS6KA2, (4) |
| 97 | 7 | 50.245* | rs1456896 | <i>ZBPB, IKZF1</i> , (4) |
| 98 | 7 | 98.75 | rs9297145 | <i>SMURF1</i> , (6) |
| 99 | 7 | 100.34 | rs1734907† | EPO, (21) |
| 100 | 7 | 116.89 | rs38904† | (6) |
| 101 | 8 | 126.53 | rs921720† | <i>TRIB1</i> , (1) |
| 102 | 8 | 130.62 | rs1991866 | (2) |
| 103 | 9 | 4.98 | rs10758669 | JAK2, (4) |

| | | | | |
|-----|----|----------|---------------------|--|
| 104 | 9 | 93.92 | rs4743820† | <i>NFIL3</i> , (2) |
| 105 | 9 | 117.60** | rs4246905 | <i>TNFSF15</i> , (4) |
| 106 | 9 | 139.32* | rs10781499 † | <i>CARD9</i> , (22) |
| 107 | 10 | 6.08 | rs12722515† | <i>IL2RA</i> , <i>IL15RA</i> , (6) |
| 108 | 10 | 30.72 | rs1042058† | <i>MAP3K8</i> , (3) |
| 109 | 10 | 35.3 | rs11010067 † | <i>CREM</i> , (3) |
| 110 | 10 | 59.99 | rs2790216 | <i>CISD1</i> , <i>IPMK</i> , (2) |
| 111 | 10 | 64.51** | rs10761659 † | (3) |
| 112 | 10 | 75.67 | rs2227564† | (13) |
| 113 | 10 | 81.03 | rs1250546 † | (5) |
| 114 | 10 | 82.25 | rs6586030 † | <i>TSPAN14</i> , <i>C10orf58</i> , (4) |
| 115 | 10 | 94.43 | rs7911264 | (4) |
| 116 | 10 | 101.28 | rs4409764 | <i>NKX2-3</i> , (6) |
| 117 | 11 | 1.87 | rs907611 | <i>TNNI2</i> , <i>LSP1</i> , (17) |
| 118 | 11 | 58.33 | rs10896794 | <i>CNTF</i> , <i>LPXN</i> , (8) |
| 119 | 11 | 60.77 | rs11230563 | <i>CD6</i> , (14) |
| 120 | 11 | 61.56 | rs4246215 † | (15) |
| 121 | 11 | 64.12 | rs559928 | <i>CCDC88B</i> , (23) |
| 122 | 11 | 65.65 | rs2231884† | <i>RELA</i> , (25) |
| 123 | 11 | 76.29 | rs2155219 † | (5) |
| 124 | 11 | 87.12 | rs6592362 | (1) |
| 125 | 11 | 118.74 | rs630923† | <i>CXCR5</i> , (17) |
| 126 | 12 | 12.65 | rs11612508† | <i>LOH12CR1</i> , (8) |
| 127 | 12 | 40.77* | rs11564258 † | <i>MUC19</i> , (1) |
| 128 | 12 | 48.2 | rs11168249† | <i>VDR</i> , (8) |
| 129 | 12 | 68.49 | rs7134599 † | <i>IFNG</i> , (3) |
| 130 | 13 | 27.52 | rs17085007 † | (2) |

| | | | | |
|-----|----|---------|---------------------|----------------------------|
| 131 | 13 | 40.86** | rs941823 † | (3) |
| 132 | 13 | 99.95 | rs9557195 | <i>GPR183, GPR18, (6)</i> |
| 133 | 14 | 69.27 | rs194749† | <i>ZFP36L1, (4)</i> |
| 134 | 14 | 75.7 | rs4899554† | FOS, MLH3, (6) |
| 135 | 14 | 88.47 | rs8005161 | GPR65, GALC, (1) |
| 136 | 15 | 67.43 | rs17293632 † | <i>SMAD3, (2)</i> |
| 137 | 15 | 91.17 | rs7495132 | <i>CRTC3, (3)</i> |
| 138 | 16 | 11.54* | rs529866 † | SOCS1, LITAF, (11) |
| 139 | 16 | 23.86 | rs7404095 | PRKCB, (5) |
| 140 | 16 | 28.6 | rs26528 † | <i>IL27, (14)</i> |
| 141 | 16 | 86 | rs10521318† | <i>IRF8, (4)</i> |
| 142 | 17 | 32.59 | rs3091316 † | CCL13, CCL2, (5) |
| 143 | 17 | 37.91 | rs12946510 | <i>ORMDL3, (16)</i> |
| 144 | 17 | 40.53 | rs12942547 † | STAT3, (15) |
| 145 | 17 | 57.96 | rs1292053 † | <i>TUBD1, RPS6KB1, (9)</i> |
| 146 | 18 | 12.8 | rs1893217 † | (6) |
| 147 | 18 | 46.39 | rs7240004† | <i>SMAD7, (2)</i> |
| 148 | 18 | 67.53 | rs727088 | CD226, (2) |
| 149 | 19 | 10.49* | rs11879191 | TYK2, (27) |
| 150 | 19 | 33.73 | rs17694108 | <i>CEBPG, (8)</i> |
| 151 | 19 | 55.38 | rs11672983 | (19) |
| 152 | 20 | 30.75 | rs6142618† | <i>HCK, (10)</i> |
| 153 | 20 | 31.37 | rs4911259 | <i>DNMT3B, (8)</i> |
| 154 | 20 | 44.74 | rs1569723 † | CD40, (13) |
| 155 | 20 | 48.95 | rs913678 | <i>CEBPB, (5)</i> |
| 156 | 20 | 57.82 | rs259964 | <i>ZNF831, CTSZ, (5)</i> |
| 157 | 20 | 62.34 | rs6062504 | <i>TNFRSF6B, (26)</i> |

| | | | | |
|-----|----|--------|-------------------|-------------------------------|
| 158 | 21 | 16.81 | rs2823286† | (0) |
| 159 | 21 | 40.46 | rs2836878† | (3) |
| 160 | 21 | 45.62 | rs7282490 | <i>ICOSLG</i> , (9) |
| 161 | 22 | 21.92 | rs2266959 | (13) |
| 162 | 22 | 30.43 | rs2412970 | <i>LIF</i> , <i>OSM</i> , (9) |
| 163 | 22 | 39.69* | rs2413583† | (19) |

Tabelle 1.7: Bereits bekannte Suszeptibilitätsgene des M. Crohn und der Colitis ulcerosa modifiziert aus Jostins et al.¹⁹⁵

Die angegebene Position gibt die Mitte des Lokusfensters an.

* = zusätzlicher genomweit signifikant assoziierter SNP in der Region

** = zwei oder mehr zusätzliche genomweit signifikant assoziierte SNPs in der Region

‡ = Regionen mit überlappenden, aber unterschiedlichen Colitis ulcerosa- und M. Crohn-Signalen

† = Heterogenität von Odds Ratios

§ = M. Crohn-assoziiertes Allel ist bei Colitis ulcerosa signifikant protektiv

|| = Gen, wofür funktionelle Studien von assoziierten Allelen angegeben wurden. Neu entdeckte Loci. Fett gedruckte rs-Nummern weisen auf SNPs mit p-Werten $<10^{-13}$ hin. Die hier aufgelisteten Gene wurden durch eine oder mehr Kandidatengen-Analysen mit CED in Zusammenhang gebracht. Die fett gedruckten Gene wurden durch zwei oder mehr Kandidatengen-Analysen mit CED in Zusammenhang gebracht. Für jeden Locus sind die zwei wichtigsten Kandidatengene aufgelistet.

1.2.2.2 In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des *PTGER4*-Gens

rs4495224 und **rs7720838** auf Chromosom 5p13.1 sind SNPs in der M. Crohn-assoziierten Region, die das Expressionsniveau von *PTGER4* reguliert. In *in silico*-Analysen erwiesen sie sich als wesentlicher Bestandteil der Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und XBP1 (X-box binding protein 1), wobei die M. Crohn-Suszeptibilitäts-Allele eine erhöhte Bindungsrate zeigten. Dies stellte eine mögliche Erklärung für die erhöhte *PTGER4*-Expression bei M. Crohn-Patienten dar.

PTGER4 ist das rs4495224 und rs7720838 am nächsten gelegene bekannte Gen und 270 kb proximal lokalisiert¹⁹⁶. Es kodiert einen der vier bekannten Prostaglandin E₂- (PGE₂)-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren), der T-Zellen aktivieren kann. *PTGER4* kommt u.a. deshalb als starkes Kandidatengen für M. Crohn in Frage, da *Ptger4*-Knockout-Mäuse nach Dextran-Natrium-Sulfat-Behandlung eine schwere Kolitis entwickeln. Dies ist bei Mäusen, denen andere Prostanoid-Rezeptoren fehlen, nicht der

Fall. Bei Wildtyp-Mäusen, denen EP4-selektive Antagonisten verabreicht wurden, trat eine Kolitis auf, wohingegen EP4-selektive Agonisten protektiv wirkten. Auch diese Tatsache bestätigte *PTGER4* als Suszeptibilitätsgen⁷¹.

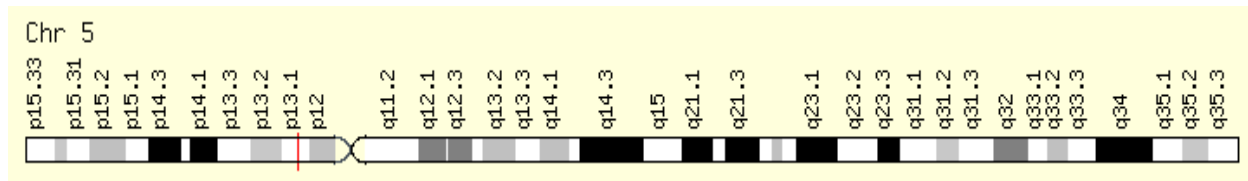


Abbildung 1.6: Lokalisation von *PTGER4* (roter Strich) auf Chromosom 5 (aus www.genecards.org)

Prostaglandine werden von den Enzymen Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) aus Arachidonsäure synthetisiert und spielen in der Regulierung der gastrointestinalen Homöostase und der CED-Pathogenese eine entscheidende Rolle¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Kürzlich durchgeführte GWAS replizierten den neuen M. Crohn-Suszeptibilitätsloкус 5p13.1 in der Nähe von *PTGER4* und identifizierten außerdem das Gen *NELL1* als ein weiteres potentiell Suszeptibilitätsgen für M. Crohn¹⁹³. *PTGER4* hat sich als ein bei *NELL1*-Knockout-Mäusen herunterreguliertes Schlüsselgen herausgestellt²⁰⁰. Das bestärkt die Hypothese, dass *PTGER4*-expressionsmodulierende Regionen in der 5p13.1-Region in die komplexe Pathogenese von M. Crohn miteinbezogen sind.

1.2.2.3 In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des *PHOX2B*-Gens

rs16853571 auf Chromosom 4p13 befindet sich in der Promotor-Region des *PHOX2B*-Gens, welches zu den Hox-Genen gehört. Diese Gene sind eine Untergruppe der homeotischen Gene, die evolutionär hoch konserviert sind. Der Tatsache, dass diese Gene sich im Laufe der Evolution kaum verändert haben, liegt die große Bedeutung der darin kodierten Erbinformationen zugrunde.

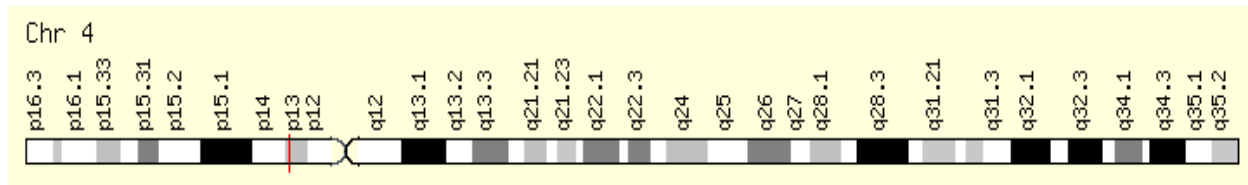


Abbildung 1.7: Lokalisation von *PHOX2B* (roter Strich) auf Chromosom 4 (aus www.genecards.org)

PHOX2B spielt bei der Entwicklung des vegetativen Nervensystems (Sympathikus, Parasympathikus und enterisches Nervensystem) eine ausschlaggebende Rolle. Der Sympathikus stammt aus der Neuralleiste, die aus transienten, multipotenten, migratorischen Zellpopulationen besteht. Diese wandern während der Entwicklung vom Neuralrohr zur Region der dorsalen Aorta²⁰¹⁻²⁰⁴. Dort werden Prozesse der Differenzierung zu noradrenergen Neuronen initiiert. *PHOX2B* kodiert für den Homeodomänen-Transkriptionsfaktor PHOX2B, der im Nervensystem exprimiert wird und dem bei diesen Differenzierungsprozessen eine entscheidende Rolle zukommt²⁰⁴⁻²⁰⁷. Studien an Maus- und Vogelmodellen konnten Phox2b als einen Schlüsselregulator in der Entwicklung von autonomen Nervenzellen identifizieren. Sein Fehlen führt in Mausmodellen aufgrund der ausbleibenden Sympathikusbildung zum Embryotod^{204,208,209}.



Abbildung 1.8: Genstruktur von *PHOX2B*: untranslatierter Bereich (orange Boxen), Introns (schwarze Linien) und kodierende Sequenzen (blaue Boxen) (aus <http://atlasgeneticsoncology.org>)

Phox2b spielt auch für das enterische Nervensystem eine wichtige Rolle^{210,211}. Die Vorläuferzellen von enterischen Neuralleistenzellen exprimieren Phox2b und die Expression bleibt postnatal in den Neuronen erhalten. Phox2b-exprimierende Zellen

finden sich im Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) zwischen Ring- und Längsmuskelschicht und im Plexus submucosus (Meissner-Plexus) in der Submukosa. Sie haben entsprechend der enterischen Neuronen-Morphologie große runde Zellkerne und sind NSE-positiv²¹². Phox2b spielt nicht nur während der embryonalen Entwicklung eine ausschlaggebende Rolle, sondern prägt auch den Phänotyp von reifen enterischen Neuronen. Die Entfernung von Phox2b während der Entwicklung führt zu einem Verlust von enterischen Ganglien im gesamten Darm^{208,208,213}.



Abbildung 1.9: Nachweis der Expression des Phox2b-H2BCFP-Transgens im Gastrointestinaltrakt eines Mäusembryos am 14.5dpc²¹³

1.2.2.4 In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des *NCF4*-Gens

rs4821544 auf Chromosom 22q13.1 ist ein SNP auf dem Gen *NCF4*, welches für das p40phox-Protein kodiert. Dieses Protein wird vorwiegend in Zellen der myeloischen Reihe exprimiert und interagiert mit NCF2/p67phox, um dann mit NCF1/p47phox einen Komplex zu bilden, der wiederum mit Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, einer Rho-

GTPase) interagiert und bei Zellstimulation in die Zellmembran wandert. Dieser Komplex aktiviert Flavocytochrom b, den membranständigen katalytischen Kern des Enzymkomplexes. Die PX-Domäne von p40phox kann Phospholipid-Produkte der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) binden. Daraus lässt sich schließen, dass das durch *NCF4* kodierte Protein in der durch PI3-Kinasen vermittelten Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielt.

Die NADPH-Oxidase überträgt Elektronen von intrazellulärem NADPH über die Zellmembran auf Sauerstoffmoleküle und bildet dadurch Hyperoxid-Anionen (O_2^-). Hyperoxide werden u.a. in Phagosomen gebildet, die Bakterien und Pilze aufgenommen haben, und dienen als reaktive Sauerstoffspezies (engl.: ROS) der Bekämpfung von Erregern. Die tödliche Wirkung von Hyperoxid auf Bakterien zeigt sich durch eine deutlich abgeschwächte Virulenz von Erregern, denen das Superoxid-Dismutase (SOD)-Gen fehlt. Neutrophile von *p40phox*-Knockout-Mäusen zeigen Defekte in der Regulierung der NADPH-Oxidase und in der sauerstoffabhängigen Bekämpfung von Bakterien¹²⁵. Neben der Tatsache, dass SNPs in *NCF4* die Suszeptibilität für M. Crohn erhöhen, konnte bei M. Crohn-Patienten mit rs4821544-Varianten eine verminderte ROS-Bildung nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin GM-CSF (engl.: granulocyte macrophage colony-stimulating factor) beobachtet werden^{214,215}.

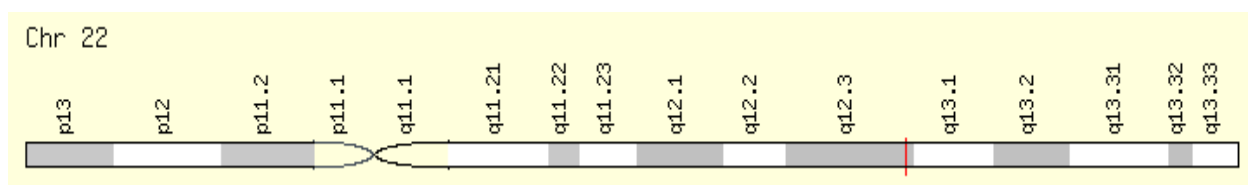


Abbildung 1.10: Lokalisation von *NCF4* (roter Strich) auf Chromosom 22 (aus www.genecards.org). Von Basenpaar 36 860 987 bis 36 878 016.

1.2.2.5 In dieser Arbeit untersuchte Varianten der intergenetischen Region auf Chromosom 10

rs224136 auf Chromosom 10q21.1 ist ein nicht-kodierender SNP, der sich in einer intergenetischen Region von ungefähr 70kb befindet und keine bekannten

proteinkodierende Gene aufweist¹²¹. *ZNF365* und *EGR2* sind Nachbargene dieses SNP und kodieren Zinkfingerproteine. *EGR2* wurde als negativer Regulator von T-Zell-Aktivierung in Mäusen²¹⁶ postuliert und es wurde angenommen, rs224136 könne die T-Zell-Funktion über *EGR2*-Expimierung beeinflussen¹²¹. Diese Hypothese bedarf jedoch noch einer experimentellen Bestätigung.

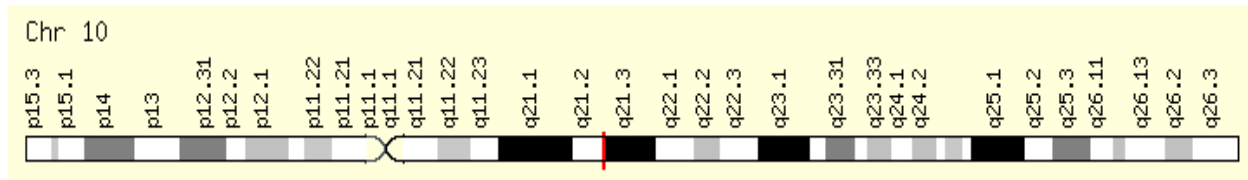


Abbildung 1.11: Lokalisation von *EGR2* (roter Strich) auf Chromosom 10 (aus www.genecards.org). Von Basenpaar 62 811 995 bis 62 893 516.

ZNF365 hingegen begünstigt die Stabilität von Telomeren und „fragile sites“ (FS). Als solche werden chromosomale Regionen bezeichnet, welche nach Induktion oder seltener auch spontan als Chromosomen- bzw. Chromatidbrüche in Metaphasen auftreten. Untersuchungen von p53-gesteuerten Genen, die im Rahmen von Telomerdysfunktionen aktiviert werden, identifizierten *ZNF365* als ein solches p53-Zielgen, welches zur Genomstabilität beiträgt²¹⁷. Einschließlich mit Telomerdysfunktionen in Zusammenhang gebrachte Keimbahn-Polymorphismen im *ZNF365*-Lokus sind mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert²¹⁷. *ZNF365* unterdrückt die Expression einer Untergruppe von „common fragile sites“ (CFS), u.a. Telomere. In Abwesenheit von *ZNF365* beteiligen sich defekte Telomere an einer anomalen Rekombination von Telomerenden, was zu einem erhöhten Telomer-Schwesterchromatidaustausch und der Ausbildung von anaphasischen DNA-Brücken und letztlich auch zu vermehrten Fehlern in der Zytokinese und zu Aneuploidie führt²¹⁷. Daraus lässt sich schließen, dass die p53-*ZNF365*-Achse im Rahmen von Telomerdysfunktionen zur Genomstabilität beiträgt²¹⁷.

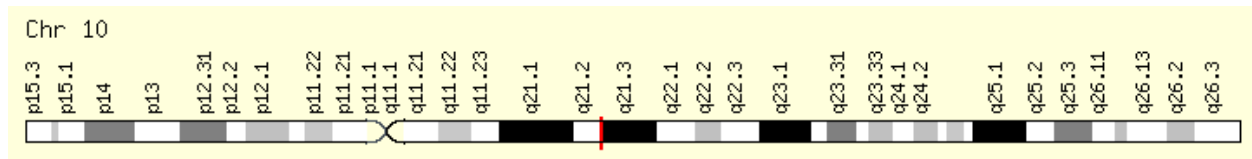


Abbildung 1.12: Lokalisation von *ZNF365* (roter Strich) auf Chromosom 10 (aus www.genecards.org). Von Basenpaar 62 374 156 bis 62 672 010.

1.2.2.6 In dieser Arbeit untersuchte Genvarianten des *FAM92B*-Gens

rs8050910 auf Chromosom 16q24.1 befindet sich innerhalb des Introns 4 des *FAM92B*-Gens. Die Funktionen des vom *FAM92B*-Gen kodierten Proteins wurden noch nicht herausgefunden.

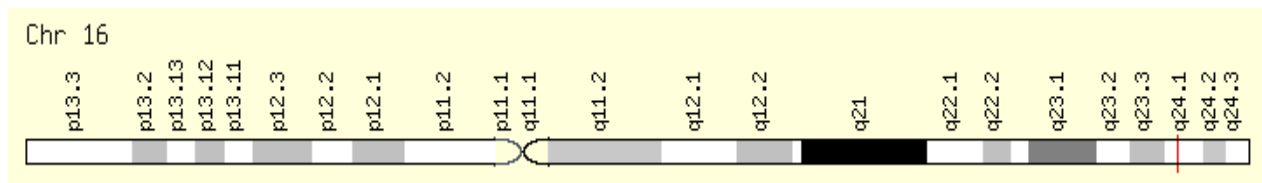


Abbildung 1.13: Lokalisation von *FAM92B* (roter Strich) auf Chromosom 16 (aus www.genecards.org)



Abbildung 1.14: Genstruktur von *FAM92B*: untranslatierter Bereich (grüne Balken), Introns (blaue Linien) und kodierende Sequenzen (rote Balken) (aus www.refgene.com)

2 ZIELSETZUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von fünf Genregionen (*PTGER4*, *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und einer intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1) bezüglich Suszeptibilität, Genotyp-Phänotyp-Korrelation und potentieller Gen-Gen-Interaktionen (Epistasie) bei CED näher untersucht. Spezifische Fragestellungen waren:

1. Analyse des Einflusses von sechs SNPs der fünf oben genannten Gene auf die Krankheitssuszeptibilität von M. Crohn und Colitis ulcerosa.
2. Analyse einer potentiellen Genotyp-Phänotyp-Korrelation.
3. Analyse einer potentiellen Gen-Gen-Interaktion zwischen den in dieser Studie als M. Crohn-Suszeptibilitätsgene identifizierten SNPs in *PTGER4* (rs4495224 und rs7720838), *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und auf Chromosom 10q21.1 und den Polymorphismen in den bereits in vorangegangenen Studien identifizierten M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen *NOD2*²¹⁸⁻²²⁰, *IL23R*²²¹, *ATG16L1*²²² und *SLC22A4/5*²²³.

Eine US-amerikanische GWAS¹²¹ konnte zeigen, dass drei neue Genvarianten in *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B* sowie ein SNP (rs224136) in der intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1 mit M. Crohn assoziiert sind, und eine belgisch-französische Studie¹⁹⁶ identifizierte eine *PTGER4*-Expressions-modulierende Region auf Chromosom 5p13.1 als eine Suszeptibilitäts-Region für M. Crohn. Der Einfluss dieser Genvarianten bei deutschen M. Crohn- bzw. Colitis ulcerosa-Patienten war bislang jedoch noch nicht bekannt.

Daher sollten diese neuen Suszeptibilitäts-Genvarianten in einem großen deutschen Untersuchungskollektiv mit CED-Patienten repliziert werden, um herauszufinden, ob die oben genannten sechs Gen-Varianten, die sich in Belgien bzw. in den USA als Suszeptibilitätsgene erwiesen haben^{121,196} (rs4495224 und rs7720838 in *PTGER4*, rs16853571 in *PHOX2B*, rs4821544 in *NCF4*, rs8050910 in *FAM92B* und rs224136 auf Chromosom 10q21.1), auch in der deutschen Bevölkerung die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen von M. Crohn und Colitis ulcerosa erhöhen.

Außerdem sollte hier in einer Genotyp-Phänotyp-Analyse untersucht werden, ob bestimmte Polymorphismen der bereits als solche identifizierten Suszeptibilitätsgene bei CED eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für gewisse phänotypische Ausprägungen bei M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa haben. Dazu gehören z.B. Alter, Geschlechterverteilung, Body-Mass-Index, Familienanamnese, Auftreten von Stenosen und Fisteln, Therapie mit Immunsuppressiva und extraintestinale Manifestationen.

Genomweite Studien bei Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa haben SNPs identifizieren können, welche die Suszeptibilität für das Entstehen einer CED signifikant erhöhen. Gen-Gen-Interaktionen können dazu führen, dass bei Vorhandensein von gleichzeitig zwei oder mehreren SNPs die Suszeptibilität für das Auftreten von CED erhöht bzw. verringert wird. In dieser Arbeit wird zusätzlich geprüft, ob sich eine Interaktion zwischen den in dieser Studie untersuchten SNPs in *PTGER4* (rs4495224 und rs7720838), in *PHOX2B* (rs16853571), in *NCF4* (rs4821544), in *FAM92B* (rs8050910) und SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1 und Polymorphismen in den bereits in vorangegangenen Studien identifizierten M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen *NOD2*²¹⁸⁻²²⁰, *IL23R*²²¹, *ATG16L1*²²² und *SLC22A4/5*²²³ nachweisen lässt.

3 METHODIK

3.1 Untersuchungskollektiv und Phänotypisierung

Das Untersuchungskollektiv (n=2833) schloss 1330 CED-Patienten und 1503 gesunde, nicht miteinander verwandte Kontrollpersonen ein. Das Patientenkollektiv bestand aus 854 M. Crohn-Patienten und 476 Colitis ulcerosa-Patienten. Die Patienten und Kontrollpersonen stammten aus Kohorten von zwei deutschen Universitätskliniken (Ludwig-Maximilians-Universität München und Ruhr-Universität Bochum) und waren alle europäischer Herkunft und deutscher Abstammung. Die Kontrollpersonen waren gesunde Blutspender und wurden bezüglich des Alters und des Geschlechts der Patientengruppe angeglichen.

| | Untersuchungskollektiv (n=2833) | | |
|--|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Patienten mit CED (n=1330) | | Kontrollgruppe (n=1503) |
| | Morbus Crohn (n=854) | Colitis ulcerosa (n=476) | |
| Geschlecht männlich % weiblich % | 48.7 51.3 | 48.0 52.0 | 63.4 36.6 |
| Lebensalter (a) Mittelwert ± SD Spannweite | 39.5±13.1 10-80 | 41.8±14.5 7-85 | 45.9±10.7 18-71 |
| Alter bei Erstdiagnose (a) Mittelwert ± SD Spannweite | 27.8±11.6 7-71 | 32.0±13.5 9-81 | |

Tabelle 3.1: Demografische Daten des Untersuchungskollektivs

Es wurden nur Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen die Diagnose einer CED gesichert war, die auf etablierten klinischen Leitlinien sowie auf endoskopischen, radiologischen und histopathologischen Kriterien beruhte und bei denen eine eindeutige

Zuordnung zu entweder M. Crohn oder Colitis ulcerosa möglich war. Patienten mit indeterminierter Kolitis (Colitis indeterminata) wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Phänotypische Merkmale beinhalteten demografische und klinische Parameter wie Krankheitsverlauf und Lokalisation der CED, krankheitsbedingte Komplikationen und chirurgische oder immunsuppressive Therapie. Die Erhebung dieser Phänotyp-Parameter erfolgte unabhängig von den genomischen Daten (verblindet) durch Auswertung der Patientenakten, durch detaillierte Fragebögen sowie in einem Patientengespräch bei der Aufnahme.

Die M. Crohn-Patienten wurden nach der Montreal-Klassifikation eingeteilt²²⁴. Dabei wurde das Alter (=age, A) dokumentiert, in dem der M. Crohn mit Hilfe von radiologischen, endoskopischen, histopathologischen und/oder chirurgischen Verfahren erstmals diagnostiziert wurde. Als Befallslokalisierung (=location, L) wurde die maximale Ausbreitung vor einem eventuellen chirurgischen Eingriff angegeben. Anhand der auftretenden Komplikationen (Fisteln, Stenosen) wurde der Krankheitsverlauf (=behaviour, B) beurteilt. Perianalfisteln wurden in der Montreal-Klassifikation (im Gegensatz zur vorausgegangenen Vienna-Klassifikation²²⁵) als Modifikatoren der Krankheitsverlauf-Eigenschaften aufgefasst, da sie nicht (wie in der Vienna-Klassifikation) zu den Fisteln allgemein gezählt werden können. Es hat sich gezeigt, dass es bei M. Crohn-Patienten mit Kolon-Befall (und nicht bei solchen mit Ileum-Befall) Assoziationen zwischen intestinalen Fisteln und Perianalfisteln gibt²²⁶, dass aber bei fast 80% der Patienten mit Perianalfisteln keine intestinalen Fisteln auftreten. Folgende Tabelle liefert eine Übersicht der Montreal-Klassifikation des M. Crohn.

| Alter bei Erstdiagnose (A) | |
|-----------------------------------|---------------|
| A1 | ≤ 16 Jahre |
| A2 | 17 – 40 Jahre |
| A3 | > 40 Jahre |

| Lokalisation (L) | |
|------------------------------|---|
| L1 | terminales Ileum |
| L2 | Kolon |
| L3 | Ileokolon |
| L4 | oberer Gastrointestinaltrakt |
| L1 + L4 | terminales Ileum + oberer Gastrointestinaltrakt |
| L2 + L4 | Kolon + oberer Gastrointestinaltrakt |
| L3 + L4 | Ileokolon + oberer Gastrointestinaltrakt |
| Krankheitsverlauf (B) | |
| B1 | keine Stenose, nicht penetrierend |
| B2 | Stenose |
| B3 | penetrierend |
| B1p | keine Stenose, nicht penetrierend + perianaler Befall |
| B2p | keine Stenose + perianaler Befall |
| B3p | penetrierend + perianaler Befall |

Tabelle 3.2: Montreal-Klassifikation des M. Crohn²²⁴

Patienten mit Colitis ulcerosa wurden ebenfalls nach der Montreal-Klassifikation eingeteilt. Hier wurde die Ausdehnung (=extent, E) der Krankheit berücksichtigt und das Patientenkollektiv in Patienten mit Proktitis (E1), mit Linksseitenkolitis (E2) und mit Pankolitis (E3) klassifiziert. Folgende Tabelle fasst die Montreal-Klassifikationskriterien für die Colitis ulcerosa zusammen.

| Ausdehnung (E) | |
|----------------|---|
| E1 | ulzerative Proktitis |
| E2 | Linksseitenkolitis (distale Colitis ulcerosa) |
| E3 | extensive Kolitis (Pankolitis) |

Tabelle 3.3: Montreal-Klassifikation der Colitis ulcerosa²²⁴

Durch die Fragebögen zur Erhebung phänotypischer Charakteristika wurden außerdem der Body-Mass-Index, die Medikamenteneinnahme, die chirurgischen Eingriffe, das Vorhandensein von Abszessen, die Raucheranamnese, die Familienanamnese, das Vorhandensein extraintestinaler Manifestationen (Arthropathien, Uveitiden, Hautbeteiligung, PSC, Aphthen) und bei M. Crohn-Patienten die Laborwerte ASCA und ANCA erfasst.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München genehmigt und hielt sich an die ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki für medizinische Forschung, die menschliche Probanden einschließt. Nach entsprechender Aufklärung wurde vor Beginn der Studie von dem gesamten Untersuchungskollektiv ein schriftliches Einverständnis für die genetische Analyse ihres Blutes eingeholt. Es bestand keine Überlappung zwischen der in dieser Studie untersuchten Kohorte und im Vorfeld publizierten GWAS in der deutschen Bevölkerung.

3.2 Materialien

3.2.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die verschiedenen Schritte der Genotypisierung verwendet:

| Gerätebezeichnung | Gerätetyp | Hersteller |
|-------------------------|---|---|
| Tischzentrifuge | Microfuge 18 Centrifuge | Beckman Coulter, Fullerton, USA |
| Kühlzentrifuge | Allegra X-15R Centrifuge | Beckman Coulter, Fullerton, USA |
| Kühlzentrifuge | Allegra 25R Centrifuge | Beckman Coulter, Fullerton, USA |
| Spektrophotometer | BioPhotometer | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Spektrophotometer | Nano Drop ND-1000 Spectrometer | Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA |
| Thermocycler | Light Cycler 480 | Roche, Mannheim, Deutschland |
| Steril-Arbeitsbank | Lamin Air Model 1,8 | Heto-Holten, Allerød, Dänemark |
| Gelelektrophoreseanlage | Power Pac 3000 | Bio-Rad, Hercules, USA |
| | Sub-Cell GT | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Thermocycler | Dyad DNA Engine, Peltier Thermal Cycler | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Automatische Pipetten | Pipetman | Gilson, Bad Camberg, Deutschland |
| Waage | | Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland |
| Gefrierschrank | Freezer -80°C Hera Freeze | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Pipetierroboter | Freedom EVO® series | Tecan, Männedorf, Schweiz |
| Pipetten | | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |

Tabelle 3.4: Geräte

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden für die Genotypisierung verwendet:

| Materialien | Hersteller |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| LightCycler® Reaktionsplatten | Roche, Mannheim, Deutschland |
| LightCycler® Plattenfolie | Roche, Mannheim, Deutschland |

Tabelle 3.5: Verbrauchsmaterialien

3.2.3 Reagenzien und Chemikalien

Folgende Tabelle ist eine Auflistung der Produkte, die für die verschiedenen experimentellen Schritte gebraucht wurden:

| Reagenz | Hersteller |
|---|---------------------------------------|
| DNA-Isolierung | |
| QIAamp® DNA Blood Mini Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | |
| LightCycler® 480 Genotyping Master | Roche, Mannheim, Deutschland |
| Primer | TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland |
| Sonden | TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland |
| Aqua ad iniectabilia Delta Select | Delta Select, Pfullingen, Deutschland |

| Sequenzierung | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| PCR-Puffer | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| dNTP-Mix | Sigma, Steinheim, Deutschland |
| HotStar Plus Taq™ DNA-Polymerase | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Primer | TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland |
| QIAquick® PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |

Tabelle 3.6: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

3.3 Genotypisierung

3.3.1 DNA-Isolierung

Genomische DNA wurde aus Leukozyten des peripheren Blutes mit dem DNA Blood Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) durch Standardverfahren isoliert.

3.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Unter der PCR versteht man die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes. Dazu wird eine Ausgangs-DNA (das sog. Template), zwei für die Zielsequenz spezifische Oligonukleotid-Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase, ein aus den vier Desoxyribonukleotridtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) zusammengestellter Mix und PCR-Puffer benötigt. In einem Denaturierungsschritt trennen sich durch Erhitzung die beiden Stränge der Template-DNA. Eine Abkühlung auf die sog. Primer-Hybridisierungstemperatur ermöglicht im Annealing-Schritt die Bindung der im Überschuss vorhandenen Primer an die einzelsträngige Template-DNA. Eine erneute Temperaturerhöhung auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase führt zur Verlängerung des Primers, der sog. Elongation, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleich²²⁷.

Durch die PCR wird eine ausreichende Menge des zu untersuchenden DNA-Abschnittes generiert, die man durch die Schmelzkurvenanalyse einem bestimmten Genotyp zuordnen kann. Hierbei wird die Methode des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) eingesetzt. Dazu benötigt man eine Sensor-Sonde, welche die variable Sequenz überdeckt, und eine deutlich bindungsstärkere Anker-Sonde, die nahe der Sensor-Sonde an den DNA-Einzelstrang bindet. Diese Sonden sind mit jeweils einem Donor- und einem Akzeptor-Fluoreszenz-Farbstoff markiert, wobei die Sensor-Sonde sowohl Donor als auch Akzeptor sein kann. Um das gewünschte Signal zu generieren, müssen beide Sonden binden. In dem Moment, in dem sich die Sonde vom DNA-Strang löst, gibt es kein Signal mehr, da Donor und Akzeptor nicht mehr nahe genug beieinanderliegen. An dem Punkt, an dem das Signal erlischt, ist die Temperatur erreicht, bei der sich die Sensor-Sonde löst. Je nach Genotyp wird sich die Sonde bei einer höheren oder niedrigeren Temperatur vom DNA-Einzelstrang lösen und es entstehen die Schmelzkurven, über die man die Patienten-DNA dem Wild-Typ, der Mutanten oder dem heterozygoten Typ zuordnen kann²²⁸.

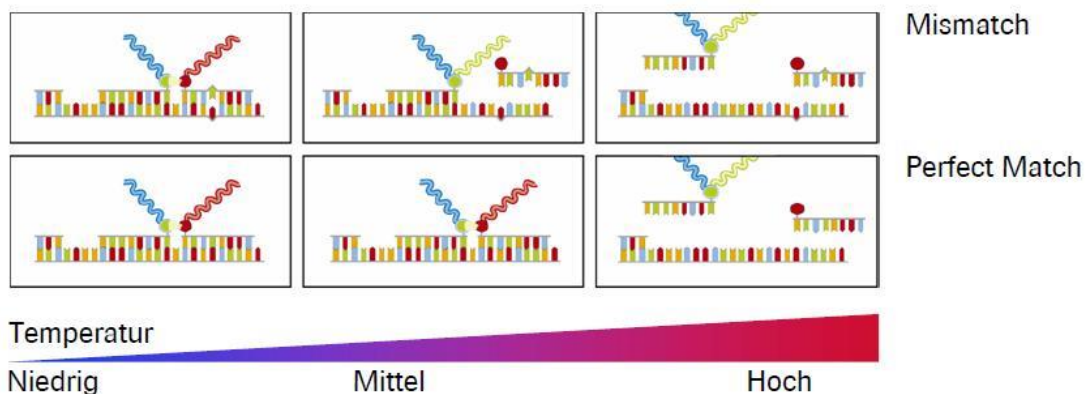


Abbildung 3.1: Mutationsanalyse mit Hybridisierungssonden (aus Roche Diagnostics²²⁹)

Die SNPs rs4495224, rs7720838, rs224136, rs4821544, rs8050910 und rs16853571, für die bereits in vorangegangenen Studien signifikante Assoziationen mit CED gezeigt worden waren^{121,196}, wurden durch PCR und Schmelzkurvenanalyse genotypisiert. Dazu

wurde in einem LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) ein Paar FRET-Proben benutzt. Das Gesamtvolumen der PCR betrug 5 µl, mit 25 ng genomischer DNA, 1x Light Cycler® 480 Genotyping Master (Roche Diagnostics), je 2.5 pmol der Primer und je 0.75 pmol der FRET-Proben (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland). Die im LightCycler® 480 ablaufende PCR bestand aus einem Denaturierungsschritt (95°C für 10 Min.) und 45 Zyklen (95°C für 10 Sek., 60°C (Primer-Hybridisierungstemperatur aller 6 untersuchten SNPs, s. Tabelle 3.7) für 10 Sek., 72°C für 15 Sek.). Die Schmelzkurvenerstellung umfasste eine anfängliche Denaturierung (95°C für 1 Min.), eine rasche Abkühlung auf 40°C, die 60 Sek. lang anhielt, und eine langsame Erhitzung (1 Akquirierung/°C) bis zum Erreichen von 80°C bei gleichzeitiger konstanter Messung der Fluoreszenzintensität.

Tabelle 3.7 zeigt die für die Genotypisierung benutzten Primer- und FRET-Proben-Sequenzen und die Primer-Hybridisierungstemperaturen.

| SNP | Primer/Sonden | Sequenz |
|-------------------------------|---------------|--|
| rs4495224 (PTGER4) | 5'-Primer | TGCTTTTTGTTGTTGTTTTTAAGGTA |
| | 3'-Primer | GGAGGTGAAGTCCTTGA ^C ACTTG |
| | Sensor | CACAGAGTTTAAATTGG ^C ACTT-FL |
| | Anker | LC610-CCCCTGAGGACCTGGACTCCA |
| rs7720838 (PTGER4) | 5'-Primer | GGAAAGACTCACCAAGGTTTCAT |
| | 3'-Primer | TGAGGAGAGAAGAGTGAGAGGC |
| | Sensor | CATTGGTGATG ^C CATGTCAA-FL |
| | Anker | LC640-GCCCTGGATTAGGACTCAGAAGACCTCA |
| rs16853571 (PHOX2B) | 5'-Primer | GGCTGAGATCGTCCAAGTTTC |
| | 3'-Primer | CCTTGGAGCCGAAATTCATCA |

| | | |
|--|-----------|--|
| rs16853571 (<i>PHOX2B</i>) | Sensor | TGCTGTAGGGTTT <u>A</u> CGCGC-FL |
| | Anker | LC640-TCCCTGCAGAAGAGAGTGACCAGGGGT |
| rs4821544 (<i>NCF4</i>) | 5'-Primer | GGTGCAGGAGCTGGGTAA |
| | 3'-Primer | GAACCCTGTACCCCAGAAAG |
| | Sensor | CGCAA <u>A</u> CTCGAA <u>C</u> CTTCC-FL |
| | Anker | LC610-AAGCAGCAGCTGTTTGAGGCTTGGGC |
| rs224136 (intergen. Region auf Chromosom 10q21.1) | 5'-Primer | CAAGGCACAATTAATAGGGCTGT |
| | 3'-Primer | CCAGACCTCTCGCTTGAGC |
| | Sensor | AACTTGAGTGCA <u>A</u> CTTCAACTCT-FL |
| | Anker | LC670- CCTTCTCTTTCTCTCATTTTCCACATCCAG |
| rs8050910 (<i>FAM92B</i>) | 5'-Primer | TTTCTGAATCACTCTGTCTCTAAACC |
| | 3'-Primer | TGTCTCACTCCAGTGACTGCTC |
| | Sensor | TTGATGACCC <u>A</u> ATTAGCAAGA-FL |
| | Anker | LC670-ACGTCCCTTGAGGCAGGAGAACTGGC |
| Primer-Hybridisierungstemperatur | | 60 °C für alle der sechs oben genannten SNPs |

Tabelle 3.7: Für die Genotypisierung gebrauchte Primer- und FRET-Proben-Sequenzen und die Primer-Hybridisierungstemperaturen

FL: Fluorescein; LC610: LightCycler Red 610; LC640: LightCycler Red 640; LC670: LightCycler Red 670. Die Polymorphimusposition im Sensor ist unterstrichen. Ein Phosphat ist an das 3'-Ende des Akzeptors gebunden, um eine Verlängerung durch die DNA-Polymerase in der PCR zu vermeiden.

3.3.3 Sequenzierung

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse wurden durch die Sequenzierung von Stichproben jedes möglichen Genotyps bestätigt. Bei der Sequenzierung betrug das

Gesamtvolumen der PCR 100 µl. Darin enthalten waren 250 ng genomische DNA, 1x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland), eine MgCl₂-Endkonzentration von 2 mM, 0.5 mM des dNTP-Mix (Sigma, Steinheim, Deutschland), 2.5 Einheiten von HotStar Plus Taq™ DNA-Polymerase (Qiagen) und je 10 pmol der Primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland).

Die PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt (95°C für 5 Min.), 35 Zyklen (Denaturierung bei 94°C für 30 Sek., Primer-Hybridisierung bei 55°C für 30 Sek., DNA-Verlängerung bei 72°C für 30 Sek.) und einem Endextensionsschritt (72°C für 10 Min.).

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und durch ein kommerzielles Sequenzierunternehmen (Sequiserie, Vaterstetten, Deutschland) sequenziert.

Die Primersequenzen für die Sequenzierung sind in Tabelle 3.8 wiedergegeben.

| Polymorphismus | Primer-Sequenz |
|---|----------------------------|
| rs4495224 (PTGER4) | TGTTATACAGAGCAGCAGAACTAGG |
| | CTGGGAAGTACAGCCCTTTATTC |
| rs7720838 (PTGER4) | GGGTGAATGATCAATGTAACCG |
| | AGATCAGGGTGAGTCCAGAGAAT |
| rs16853571 (PHOX2B) | GGCTGAGATCGTCCAAGTTTC |
| | CCTTGGAGCCGAAATTCATCA |
| rs4821544 (NCF4) | TCCTGAGCCTCAGAGCG |
| | GGTCAGCTCTCCGTGTCATC |
| rs224136 (intergen. Region auf Chromosom 10q21.1) | GGAAGTGAGTCAAGGGAGAATAGAC |
| | CCAGACCTCTCGCTTGAGC |
| rs8050910 (FAM92B) | CACCTTTCTGAATCACTCTGTCTCTA |
| | CCCTGCTAAGCAAGTCTCATT |

Tabelle 3.8: Für die Sequenzierung gebrauchte Primersequenzen

3.4 Statistische Auswertung

Jeder genetische Marker wurde auf eine Übereinstimmung mit dem vorhergesehenen Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der Kontrollgruppe getestet. Zum Vergleich zwischen kategorischen Variablen wurde, je nach Gruppengröße, der Fisher's-Exact-Test oder χ^2 -Test angewendet. Einzelmarker-Alleltests wurden mit Pearsons χ^2 -Test durchgeführt, während für quantitative Variablen der Student's t-Test angewendet wurde. Sämtliche angewendete Tests waren zweiseitig, p-Werte von <0.05 wurden als statistisch signifikant erachtet. Bei jedem SNP wurden für das seltenere Allel (Minor-Allel) Odds Ratio (OR) und 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) berechnet. Eine Bonferroni-Korrektur wurde für multiple Vergleiche angewendet. Zur Auswertung der Daten wurde die SPSS 13.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL) und das Programm R-2.4.1. (<http://cran.r-project.org>) benutzt. Interaktionen zwischen verschiedenen Polymorphismen wurden mit der Epistasis-Option in PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) getestet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Analyse der untersuchten Genvarianten bzgl. Krankheits-suszeptibilität

In dieser Studie wurden 6 SNPs von Genen oder intergenetischen Regionen untersucht, die in vorangegangenen Studien als Krankheitssuszeptibilitätsgene identifiziert worden waren. Jeder SNP hat zwei verschiedene Allele (z.B. P und Q), von denen eines häufiger (Major-Allel) und eines seltener (Minor-Allel) vorkommt. Aus den zwei Allelen können 3 verschiedene Genotypen abgeleitet werden: PP, PQ, QQ. Um die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung statistisch auswerten zu können, muss eine Normalverteilung der Allelfrequenz in der Kontrollpopulation nach dem Hardy-Weinberg-Prinzip vorliegen. Dieses Prinzip sagt bei Vorhandensein zweier verschiedener Allele und bestimmten Voraussetzungen folgendes Gleichgewicht der Allel- und Genotypisierung voraus: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Dabei ist p die Allelfrequenz von P und q die Allelfrequenz von Q. p^2 beschreibt die Frequenz der Homozygoten mit Merkmal P, q^2 die Frequenz der Homozygoten mit Merkmal Q und $2pq$ die Frequenz der Heterozygoten (Merkmale P und Q). Es wurden die Allelfrequenzen des Patientenkollektivs mit denen der Kontrollgruppe verglichen und bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ von einer statistisch signifikanten Assoziation ausgegangen. Wenn bei einer statistisch signifikanten Assoziation zwischen einem Polymorphismus und einem Krankheitsbild die Häufigkeit des selteneren Allels in der Patientengruppe mit einer OR (95%-KI) > 1 höher war als in der Kontrollgruppe, so wurde der untersuchte Polymorphismus als krankheitsprädisponierend eingeschätzt. Umgekehrt wurde dem untersuchten Polymorphismus ein krankheitsprotektiver Effekt zugesprochen, wenn die Häufigkeit des selteneren Allels in der Patientengruppe mit einer OR (95%-KI) < 1 niedriger war als in der Kontrollgruppe.

4.1.1 Analyse von *PTGER4*-Genvarianten bzgl. Krankheitssuszeptibilität von M. Crohn und Colitis ulcerosa

In allen drei Untersuchungsgruppen (M. Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen) war die Allel-Frequenz der SNPs rs4495224 und rs7720838 in *PTGER4* in Übereinstimmung mit dem vorhergesehenen Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. In den drei Gruppen konnte für rs4495224 das C-Allel und für rs7720838 das G-Allel als das Minor-Allel identifiziert werden. Beide kamen bei M. Crohn-Patienten signifikant seltener vor als in der C. ulcerosa- und der Kontrollgruppe und wurden als hoch signifikante M. Crohn-assoziierte Genvarianten identifiziert (s. Tabelle 4.1). In der M. Crohn-Gruppe trat das seltenere C-Allel des rs4495224-Polymorphismus mit einer Frequenz von 27.8% auf, in der Kontrollgruppe mit einer Frequenz von 33.5% ($p= 5.00 \times 10^{-5}$; OR: 0.76; 95%-KI: 0.67-0.87). Das seltenere G-Allel des rs7720838-Polymorphismus trat bei M. Crohn-Patienten mit einer Frequenz von 37.5% und bei den Kontrollpersonen mit einer Frequenz von 42.6% auf ($p= 8.80 \times 10^{-4}$; OR: 0.81; 95%-KI: 0.71-0.91). Die niedrigere MAF (engl.: minor allele frequency) in der M. Crohn-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe lässt auf einen protektiven Effekt beider Allele im Sinne einer reduzierten Anfälligkeit für M. Crohn schließen.

Im Gegensatz dazu wurden bei Colitis ulcerosa-Patienten keine Assoziationen der SNPs rs4495224 und rs7720838 mit Krankheitssuszeptibilität nachgewiesen. Das C-Allel des rs4495224-Polymorphismus und das G-Allel des rs7720838-Polymorphismus traten jeweils mit einer Frequenz von 35.3% ($p= 3.17 \times 10^{-1}$; OR: 1.08; 95%-KI: 0.93-1.26) und 44.6% ($p= 2.75 \times 10^{-1}$; OR: 1.09; 95%-KI: 0.94-1.26) auf.

Tabelle 4.1 fasst die Suszeptibilitäts-gen-Analyse der hier untersuchten sechs SNPs bei 854 M. Crohn- und 476 Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich mit 1503 gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen zusammen.

| | | | Morbus Crohn (n=854) | | | Colitis ulcerosa (n=476) | | | Kontr. (n=1503) |
|--------------------------|------------|-------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| Gen | SNP | Minor-Allel | MAF | p-Wert | OR (95%-KI) | MAF | p-Wert | OR (95%-KI) | MAF |
| <i>PTGER4</i> | rs4495224 | C | 0.278 | 4.10x10⁻⁵ | 0.76 (0.67-0.87) | 0.353 | 3.1x10 ⁻¹ | 1.08 (0.93-1.26) | 0.335 |
| <i>PTGER4</i> | rs7720838 | G | 0.375 | 6.91x10⁻⁴ | 0.81 (0.71-0.91) | 0.446 | 2.7x10 ⁻¹ | 1.09 (0.94-1.26) | 0.426 |
| <i>PHOX2B</i> | rs16853571 | C | 0.064 | 5.6x10 ⁻¹ | 1.07 (0.85-1.36) | 0.066 | 4.4x10 ⁻¹ | 1.12 (0.84-1.50) | 0.059 |
| <i>NCF4</i> | rs4821544 | C | 0.332 | 5.1x10 ⁻¹ | 1.04 (0.92-1.18) | 0.331 | 6.4x10 ⁻¹ | 1.04 (0.89-1.21) | 0.322 |
| Intergen. Region 10q21.1 | rs224136 | T | 0.141 | 3.6x10 ⁻¹ | 0.92 (0.79-1.09) | 0.143 | 5.7x10 ⁻¹ | 0.94 (0.77-1.15) | 0.151 |
| <i>FAM92B</i> | rs8050910 | G | 0.442 | 4.0x10 ⁻¹ | 1.05 (0.93-1.18) | 0.434 | 7.8x10 ⁻¹ | 0.98 (0.85-1.13) | 0.429 |

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Suszeptibilitätsgenanalyse bei 854 M. Crohn- u. 476 Colitis ulcerosa-Patienten verglichen mit 1503 gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen (Kontr.) Die Tabelle zeigt die Häufigkeit des Minor-Allels (MAF), die p-Werte des Alleltests und das Quotenverhältnis (Odds Ratio (OR) für das Minor-Allel) mit 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) für die M. Crohn- und die Colitis ulcerosa-Fall-Kontroll-Gruppe. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

4.1.2 Analyse von Genvarianten im *PHOX2B*-, *NCF4*- und *FAM92B*-Gen und einer intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1 bzgl. Krankheitssuszeptibilität von M. Crohn und Colitis ulcerosa

Die Vorkommenshäufigkeit der Genotypen für die untersuchten SNPs in *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und auf Chromosom 10q21.1 stimmten mit dem vorhergesehenen Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in allen drei Untersuchungsgruppen (M. Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollpersonen) überein (s. Tabelle 4.1). Sowohl für das M. Crohn-Patientenkollektiv als auch für die C. ulcerosa- und die Kontrollgruppe war in *PHOX2B* C das Minor-Allel (6.4%, 6.5% und 5.9%), in *FAM92B* war es G (44.2%, 43.4% und 42.9%), in *NCF4* C (33.2%, 33.1% und 32.2%) und auf der intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1 war es T (14.1%, 14.3% und 15.1%). In unserer Studie wurde bei

der Häufigkeit des Vorkommens dieser SNPs in M. Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv kein signifikanter Unterschied nachgewiesen (s. Tabelle 4.1). Eine Assoziation von rs16853571 (*PHOX2B*; $p=0.563$), rs4821544 (*NCF4*; $p=0.506$), rs8050910 (*FAM92B*; $p=0.401$) und rs224136 (intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1; $p=0.363$) mit M. Crohn konnte somit in der europäischen Bevölkerung nicht bestätigt werden (s. Tabelle 4.2).

| Gen | SNP | M. Crohn | |
|--------------------------|------------|----------------------|---------------------------|
| | | p-Wert (EU*) | p-Wert (US ⁺) |
| <i>PHOX2B</i> | rs16853571 | 5.6×10^{-1} | 8.4×10^{-3} |
| <i>NCF4</i> | rs4821544 | 5.1×10^{-1} | 9.0×10^{-3} |
| Intergen. Region 10q21.1 | rs224136 | 3.6×10^{-1} | 2.9×10^{-7} |
| <i>FAM92B</i> | rs8050910 | 4.0×10^{-1} | 8.5×10^{-3} |

Tabelle 4.2: Vergleich zwischen M. Crohn-assoziierten SNPs in der US-amerikanischen Studie von Rioux et al.¹²¹ und den Ergebnissen unserer europäischen Studie mit 854 M. Crohn-Patienten und 1503 gesunden Kontrollpersonen

* EU: europäische Bevölkerungsgruppe; + US: US-amerikanische Bevölkerungsgruppe
Die Studie von Rioux et al.¹²¹ schloss 945 M. Crohn-Patienten mit ilealem Befall und 977 Kontrollpersonen ein (genomweite Assoziationsstudie, GWAS), 530 Trios mit M. Crohn (Replikationskohorte 1) und 350 Patienten mit ilealem M. Crohn und 207 Kontrollpersonen (Replikationskohorte 2). Die p-Werte in der Studie von Rioux et al. wurden für das gesamte Untersuchungskollektiv (GWAS + Replikationskohorte 1 + Replikationskohorte 2) berechnet.

Anders als in der hier durchgeführten Studie wurden in der von Rioux et al.¹²¹ lediglich US-amerikanische M. Crohn-Patienten mit ilealem Befall eingeschlossen. Um auszuschließen, dass unsere Ergebnisse aufgrund dieses Unterschiedes die Ergebnisse von Rioux et al. nicht replizieren konnten, führten wir eine Subanalyse durch. In dieser Subanalyse wurden ausschließlich M. Crohn-Patienten untersucht, bei denen ein ilealer Befall durch Ileokoloskopie, MRT-Enteroklysma bzw. einen chirurgischen Eingriff diagnostiziert wurde. Allerdings konnte auch diese Subanalyse, die 529 Patienten mit L1-

Phänotyp (Befall des terminalen Ileum) bzw. L3-Phänotyp (Befall des Ileokolons) nach der Montreal-Klassifikation²²⁴ einschloss, keine Assoziation zwischen den vier SNPs (in *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und rs224136 auf Chromosom 10q21.1) und einer erhöhten M. Crohn-Suszeptibilität nachweisen (s. Tabelle 4.3).

| | | | Ilealer M. Crohn (n = 529) | | | Kontrolle (n = 1503) |
|--------------------------------|------------|-------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Gen | SNP | Minor-Allel | MAF | p-Wert | OR (95%-KI) | MAF |
| <i>PHOX2B</i> | rs16853571 | C | 0.055 | 7.00×10^{-1} | 0.93 (0.68–1.26) | 0.059 |
| <i>NCF4</i> | rs4821544 | C | 0.324 | 9.08×10^{-1} | 1.01 (0.87–1.18) | 0.322 |
| Intergen. Region 10q21.1 | rs224136 | T | 0.140 | 4.20×10^{-1} | 0.92 (0.75–1.12) | 0.151 |
| <i>FAM92B</i> | rs8050910 | G | 0.434 | 7.99×10^{-1} | 1.01 (0.88–1.17) | 0.429 |

Tabelle 4.3: Krankheitssuszeptibilitätsanalyse von M. Crohn-Patienten mit ilealem Befall (kombiniert L1- und L3-Phänotyp nach der Montreal-Klassifikation²²⁴) verglichen mit gesunden, nicht miteinander verwandten Kontrollpersonen

4.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse

4.2.1 Genotyp-Phänotyp-Analyse bzgl. *PTGER4*-Genvarianten in rs4495224 und rs7720838

Bis heute sind die phänotypischen Auswirkungen der *PTGER4*-Genvarianten in der 5p13.1-Region nicht untersucht worden. Es ist nicht bekannt, ob es einen Zusammenhang zwischen dem rs4495224- und dem rs7720838-Genotyp und CED-Phänotypen gibt. Daher wurde hier eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudie bei CED-Patienten durchgeführt. In M. Crohn-Patienten zeigte die Analyse keine signifikanten Assoziationen der SNPs rs4495224 und rs7720838 mit phänotypischen Charakteristika

wie Alter, Geschlechterverteilung, Body-Mass-Index, Familienanamnese, Auftreten von Stenosen und Fisteln, Gebrauch von Immunsuppressiva und extraintestinalen Manifestationen (s. Tabelle 4.4 und Tabelle 4.5).

Tabelle 4.4 zeigt die Assoziation zwischen dem rs4495224-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von M. Crohn.

| rs4495224 Genotyp-Status | (1) AA n=433 (%) | (2) AC n=350 (%) | (3) CC n=59 (%) | (1) vs. (2) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (3) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (2) + (3) p-Wert OR (95%-KI) |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Männliches Geschlecht n (%) | 187/364 (51.4) | 155/300 (51.7) | 27/52 (51.9) | 1.000 1.01 (0.74-1.37) | 1.000 1.02 (0.57-1.83) | 0.940 1.01 (0.76-1.36) |
| Alter bei Erst-diagnose (Jahre) Mittelwert ± SD Spannweite | 27.4±11.0 9-70 | 28.0±12.5 1-78 | 27.0±11.8 7-71 | 0.545 | 0.862 | 0.620 |
| Krankheitsdauer (J) Mittelwert ± SD Spannweite | 12.2±8.5 0-40 | 11.3±8.4 1-33 | 10.6±9.2 1-44 | 0.279 | 0.376 | 0.217 |
| Alter bei Erst-diagnose (Jahre) ≤16 Jahre (A1) | 113/317 (35.6) | 66/244 (27.0) | 18/41 (43.9) | 0.036 0.67 (0.47-0.96) | 0.306 1.41 (0.73-2.73) | 0.118 0.75 (0.53-1.06) |
| 17-40 Jahre (A2) | 177/317 (55.8) | 152/244 (62.3) | 19/41 (46.3) | 0.142 1.31 (0.93-1.84) | 0.317 0.68 (0.36-1.31) | 0.322 1.19 (0.86-1.64) |
| >40 Jahre (A3) | 27/317 (8.5) | 26/244 (10.7) | 4/41 (9.8) | 0.467 1.28 (0.73-2.26) | 0.768 1.16 (0.38-3.50) | 0.407 1.26 (0.73-2.18) |
| Lokalisation | | | | | | |
| Terminales Ileum (L1) | 43/318 (13.5) | 44/254 (17.3) | 5/45 (11.1) | 0.241 1.34 (0.85-2.12) | 0.816 0.80 (0.30-2.14) | 0.366 1.25 (0.80-1.95) |
| Kolon (L2) | 45/318 (14.2) | 34/254 (13.4) | 8/45 (17.8) | 0.809 0.94 (0.58-1.51) | 0.502 1.31 (0.57-3.00) | 1.000 0.99 (0.63-1.56) |
| Ileokolon (L3) | 226/318 (71.1) | 170/254 (66.9) | 30/45 (66.7) | 0.316 0.82 (0.58-1.18) | 0.601 0.81 (0.42-1.58) | 0.296 0.82 (0.58-1.16) |
| oberer GI-Trakt (L4) | 4/318 (1.3) | 6/254 (2.4) | 2/45 (4.4) | 0.351 1.90 (0.53-6.80) | 0.163 3.65 (0.65-20.53) | 0.250 2.16 (0.64-7.24) |
| Befall des Ileokolons | 269/318 (84.6) | 214/254 (84.3) | 35/45 (77.8) | 0.908 0.97 (0.62-1.53) | 0.279 0.64 (0.30-1.37) | 0.662 0.91 (0.59-1.39) |

| | | | | | | |
|--|-------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Krankheitsverlauf¹ | | | | | | |
| nicht stenosierend, nicht penetrierend (B1) | 58/312 (18.6) | 60/243 (24.7) | 10/41 (24.4) | 0.094 1.44 (0.95-2.16) | 0.400 1.41 (0.66-3.04) | 0.073 1.43 (0.97-2.12) |
| stenosierend (B2) | 89/312 (28.5) | 56/243 (23.0) | 14/41 (34.1) | 0.173 0.75 (0.51-1.10) | 0.468 1.30 (0.65-2.59) | 0.308 0.82 (0.57-1.18) |
| penetrierend (B3) | 165/312 (52.9) | 127/243 (52.2) | 17/41 (41.5) | 0.932 0.96 (0.70-1.36) | 0.186 0.63 (0.33-1.22) | 0.623 0.92 (0.66-1.26) |
| Gebrauch von Immunsuppressiva² | 180/222 (81.1) | 148/181 (81.8) | 20/27 (74.1) | 0.898 1.05 (0.63-1.73) | 0.441 0.67 (0.26-1.68) | 1.000 0.98 (0.61-1.59) |
| Chirurgische Ein- griffe wegen MC³ | 163/300 (54.3) | 136/237 (57.4) | 20/40 (50.0) | 0.486 1.13 (0.80-1.59) | 0.617 0.84 (0.43-1.63) | 0.675 1.08 (0.78-1.50) |
| Fisteln | 165/307 (53.7) | 127/238 (53.4) | 17/41 (41.5) | 0.931 0.98 (0.70-1.38) | 0.183 0.61 (0.31-1.18) | 0.620 0.92 (0.66-1.27) |
| Stenosen | 199/306 (65.0) | 151/243 (62.1) | 26/41 (63.4) | 0.532 0.88 (0.62-1.25) | 0.863 0.93 (0.47-1.83) | 0.549 0.89 (0.64-1.24) |

Tabelle 4.4: Assoziation zwischen dem rs4495224-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von M. Crohn, definiert nach der Montreal-Klassifikation²²⁴.

¹ Der Krankheitsverlauf wurde nach der Montreal-Klassifikation²²⁴ eingeteilt. Ein stenosierender Phänotyp zeigt Stenosen, jedoch keine Fisteln. Die Diagnose „Stenose“ erfolgte chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch (mit MRT-Enteroklysma).

² Zu den Immunsuppressiva zählten Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, Infliximab und/oder Adalimumab.

³ Nur MC-spezifische chirurgische Maßnahmen (z.B. Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie) wurden berücksichtigt.

Schwache Assoziationen mit dem Auftreten der Krankheit unter 16 Jahren bei für rs4495224 heterozygote M. Crohn-Patienten sowie seltener auftretender Kolonbefall (definiert nach der Montreal-Klassifikation²²⁴) in heterozygoten Trägern der Genvariante in rs7720838 konnten die Signifikanzkriterien nach Bonferroni-Korrektur nicht erfüllen (s. Tabelle 4.4 und Tabelle 4.5).

In Tabelle 4.5 wird die Assoziation zwischen dem rs7720838-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von M. Crohn dargestellt.

| rs7720838 Genotyp- Status | (1) TT n=315 (%) | (2) GT n=419 (%) | (3) GG n=104 (%) | (1) vs. (2) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (3) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (2) + (3) p-Wert OR (95%-KI) |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|--|--|
| Männliches Geschlecht n= (%) | 141/271 (52.0) | 173/349 (49.6) | 51/92 (55.4) | 0.571 0.91 (0.66-1.24) | 0.629 1.15 (0.71-1.84) | 0.758 0.95 (0.70-1.29) |
| Alter bei Erst- diagnose (Jahre) Mittelwert ± SD Spannweite | 27.6±11.2 6-70 | 27.8±12.6 7-78 | 27.0±9.4 1-52 | 0.884 | 0.630 | 0.992 |
| Krankheitsdauer (J) Mittelwert ± SD Spannweite | 12.6±8.7 1-37 | 11.7±8.5 0-44 | 9.6±7.5 1-40 | 0.305 | 0.015 | 0.115 |
| Alter bei Erst- diagnose (Jahre) ≤16 Jahre (A1) | 87/236 (36.9) | 85/289 (29.4) | 25/75 (33.3) | 0.076 0.71 (0.49-1.03) | 0.679 0.86 (0.49-1.48) | 0.092 0.74 (0.52-1.05) |
| 17-40 Jahre (A2) | 129/236 (54.7) | 172/289 (59.5) | 45/75 (60.0) | 0.287 1.22 (0.86-1.73) | 0.427 1.24 (0.73-2.11) | 0.237 1.22 (0.88-1.70) |
| >40 Jahre (A3) | 20/236 (8.5) | 32/289 (11.1) | 5/75 (6.7) | 0.379 1.34 (0.75-2.42) | 0.808 0.77 (0.28-2.13) | 0.569 1.22 (0.69-2.16) |
| Lokalisation Terminales Ileum (L1) | 31/238 (13.0) | 54/299 (18.1) | 7/77 (9.1) | 0.123 1.47 (0.91-2.38) | 0.326 0.61 (0.26-1.44) | 0.298 1.29 (0.81-2.06) |
| Kolon (L2) | 42/238 (17.6) | 32/299 (10.7) | 13/77 (16.9) | 0.023 0.56 (0.34-0.92) | 1.000 0.95 (0.48-1.88) | 0.057 0.63 (0.40-1.00) |
| Ileokolon (L3) | 162/238 (68.1) | 206/299 (68.9) | 55/77 (71.4) | 0.852 1.04 (0.72-1.50) | 0.671 1.17 (0.67-2.06) | 0.722 1.06 (0.75-1.51) |
| oberer GI-Trakt (L4) | 3/238 (1.3) | 7/299 (2.3) | 2/77 (2.6) | 0.524 1.88 (0.48-7.34) | 0.599 2.10 (0.34-12.74) | 0.385 1.92 (0.51-7.17) |
| Befall des Ileokolons | 193/238 (81.1) | 260/299 (87.0) | 62/77 (80.5) | 0.073 1.55 (0.97-2.48) | 1.000 0.96 (0.50-1.85) | 0.144 1.39 (0.90-2.15) |
| Krankheitsverlauf ¹ nicht stenosierend, nicht penetrierend (B1) | 45/230 (19.6) | 65/291 (22.3) | 18/72 (25.0) | 0.452 1.18 (0.77-1.81) | 0.323 1.37 (0.73-2.56) | 0.358 1.22 (0.81-1.83) |
| stenosierend (B2) | 62/230 (27.0) | 77/291 (26.5) | 21/72 (29.2) | 0.921 0.97 (0.66-1.44) | 0.763 1.12 (0.62-2.00) | 1.000 1.00 (0.69-1.45) |
| penetrierend (B3) | 123/230 (53.4) | 149/291 (51.2) | 33/72 (45.8) | 0.659 0.91 (0.65-1.29) | 0.281 0.74 (0.43-1.25) | 0.449 0.87 (0.63-1.22) |
| Gebrauch von Immun-suppressiva ² | 129/160 (80.6) | 175/214 (81.8) | 41/53 (77.4) | 0.790 1.08 (0.64-1.82) | 0.693 0.82 (0.39-1.74) | 1.000 1.02 (0.62-1.67) |
| Chirurgische Eingriffe wegen MC ³ | 117/223 (52.5%) | 162/279 (58.1%) | 37/72 (51.4%) | 0.240 1.25 (0.88-1.79) | 0.893 0.96 (0.56-1.63) | 0.344 1.19 (0.85-1.66) |

| | | | | | | |
|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Fisteln | 123/226 (54.4%) | 149/285 (52.3%) | 33/72 (45.8%) | 0.656 0.92 (0.65-1.30) | 0.224 0.71 (0.42-1.21) | 0.444 0.87 (0.62-1.22) |
| Stenosen | 140/224 (62.5%) | 189/290 (65.2%) | 45/74 (60.8%) | 0.578 1.12 (0.78-1.61) | 0.890 0.93 (0.54-1.60) | 0.660 1.08 (0.76-1.52) |

Tabelle 4.5: Assoziation zwischen dem rs7720838-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von M. Crohn, definiert nach der Montreal-Klassifikation²²⁴.

¹ Der Krankheitsverlauf wurde nach der Montreal-Klassifikation²²⁴ eingeteilt. Ein stenosierender Phänotyp zeigt Stenosen, jedoch keine Fisteln. Die Diagnose „Stenose“ erfolgte chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch (mit MRT-Enteroklysma).

² Zu den Immunsuppressiva zählten Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, Infliximab und/oder Adalimumab.

³ Nur MC-spezifische chirurgische Maßnahmen (z.B. Fistulektomie, Kolektomie, Ileostomie) wurden berücksichtigt.

Zwischen homozygoten A-Allelträgern und homozygoten C-Allelträgern zeigten sich bei Colitis ulcerosa-Patienten bzgl. des Alters bei Erstdiagnose schwache Unterschiede in der Gruppe über 40 mit einem p-Wert von 4.7×10^{-2} (OR: 2.97; 95%-KI: 1.06-8.32). Nach Bonferroni-Korrektur fand sich jedoch keine signifikante Assoziation zwischen diesen zwei SNPs (rs4495224 und rs7720838) und den Hauptmerkmalen der Krankheit (s. Tabelle 4.4 und Tabelle 4.5).

Tabelle 4.6 zeigt die Assoziation zwischen dem rs4495224-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von Colitis ulcerosa.

| rs4495224 Genotyp-Status | (1) AA n=196 | (2) AC n=209 | (3) CC n=59 | (1) vs. (2) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (3) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (2) + (3) p-Wert OR (95%-KI) |
|--|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Männliches Geschlecht n= (%) | 52.0% | 53.1% | 47.7% | 0.909 1.04 (0.67-1.63) | 0.732 0.84 (0.43-1.65) | 1.000 1.00 (0.65-1.52) |
| Body-Mass-Index (kg/m ²) Mittelwert ± SD Spannweite | 23.7±4.1 15-37 | 24.0±4.5 16-41 | 24.2±3.7 16-31 | 0.742 | 0.600 | 0.653 |
| Alter bei Erst-diagnose (Jahre) Mittelwert ± SD | 31.5±13.9 | 32.0±13.1 | 35.2±12.8 | 0.784 | 0.147 | 0.449 |
| Krankheitsdauer (J) Mittelwert ± SD Spannweite | 10.6±7.9 1-40 | 10.8±8.3 1-35 | 8.6±5.7 2-28 | 0.870 | 0.156 | 0.763 |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Ausdehnung | | | | | | |
| Ulzerative Proktitis (E1) | 13/123 (10.6%) | 16/131 (12.2%) | 6/40 (15.0%) | 0.695 1.23 (0.57-2.67) | 0.399 1.56 (0.55-4.42) | 0.586 1.31 (0.63-2.70) |
| Linksseitenkolitis (E2) | 47/123 (38.2%) | 44/131 (33.6%) | 13/40 (32.5%) | 0.513 0.82 (0.49-1.37) | 0.575 0.78 (0.37-1.66) | 0.390 0.81 (0.50-1.31) |
| Extensive Kolitis (E3) | 63/123 (51.2%) | 71/131 (54.2%) | 21/40 (52.5%) | 0.706 1.13 (0.69-1.84) | 1.000 1.05 (0.51-2.15) | 0.723 1.11 (0.70-1.76) |
| Alter bei Erst-diagnose | | | | | | |
| ≤16 Jahre (A1) | 5/76 (6.6%) | 8/86 (9.3%) | 1/29 (3.4%) | 0.575 1.46 (0.45-4.66) | 1.000 0.51 (0.06-4.54) | 1.000 1.21 (0.39-3.75) |
| 17-40 Jahre (A2) | 61/76 (80.3%) | 62/86 (72.1%) | 19/29 (65.5%) | 0.271 0.63 (0.30-1.33) | 0.129 0.47 (0.18-1.21) | 0.175 0.59 (0.29-1.17) |
| >40 Jahre (A3) | 10/76 (13.2%) | 16/86 (18.6%) | 9/29 (31.0%) | 0.396 1.51 (0.64-3.56) | 0.047 2.97 (1.06-8.32) | 0.181 1.83 (0.82-4.08) |
| Gebrauch von Immunsuppressiva* | 53/75 (70.7%) | 69/88 (78.4%) | 23/29 (79.3%) | 0.281 1.51 (0.74-3.07) | 0.464 1.59 (0.57-4.44) | 0.231 1.53 (0.78-2.97) |

Tabelle 4.6: Assoziation zwischen dem rs4495224-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von Colitis ulcerosa, definiert nach der Montreal-Klassifikation²²⁴.

*Zu den Immunsuppressiva zählten Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Infliximab und/oder Adalimumab.

In Tabelle 4.7 wird die Assoziation zwischen dem rs7720838-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von Colitis ulcerosa dargestellt.

| rs7720838 Genotyp-Status | (1) TT n=141 | (2) GT n=232 | (3) GG n=91 | (1) vs. (2) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (3) p-Wert OR (95%-KI) | (1) vs. (2) + (3) p-Wert OR (95%-KI) |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Männliches Geschlecht n= (%) | 54.1% | 51.2% | 52.8% | 0.715 0.89 (0.55-1.44) | 0.881 0.95 (0.52-1.72) | 0.731 0.91 (0.58-1.42) |
| Body-Mass-Index (kg/m ²) Mittelwert ± SD Spannweite | 23.3±3.7 15-36 | 24.1±4.7 16-41 | 24.3±3.6 16-31 | 0.311 | 0.265 | 0.230 |
| Alter bei Erst-diagnose (Jahre) Mittelwert ± SD Spannweite | 32.6±13.5 15-81 | 31.4±13.7 9-68 | 33.0±12.9 16-64 | 0.549 | 0.856 | 0.697 |

| | | | | | | |
|---|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Krankheitsdauer (J) Mittelwert \pm SD Spannweite | 9.4 \pm 6.7 1-30 | 11.8 \pm 8.9 1-40 | 9.0 \pm 6.1 2-28 | 0.066 | 0.725 | 0.186 |
| Ausdehnung | | | | | | |
| Ulzerative Proktitis (E1) | 6/90 (6.7%) | 19/140 (13.6%) | 10/60 (16.7%) | 0.129 2.20 (0.84-5.74) | 0.062 2.80 (0.96-8.17) | 0.078 2.37 (0.95-5.94) |
| Linksseitenkolitis (E2) | 34/90 (37.8%) | 47/140 (33.6%) | 23/60 (38.3%) | 0.572 0.83 (0.48-1.45) | 1.000 1.02 (0.52-2.01) | 0.692 0.89 (0.53-1.48) |
| Extensive Kolitis (E3) | 50/90 (55.6%) | 74/140 (52.8%) | 27/60 (45.0%) | 0.786 0.90 (0.53-1.53) | 0.244 0.65 (0.34-1.26) | 0.448 0.82 (0.49-1.34) |
| Alter bei Erst- diagnose | | | | | | |
| \leq 16 Jahre (A1) | 2/62 (3.2%) | 11/89 (12.4%) | 1/40 (2.5%) | 0.074 4.23 (0.90-19.81) | 1.000 0.77 (0.07-8.77) | 0.233 3.08 (0.67-14.19) |
| 17-40 Jahre (A2) | 51/62 (82.3%) | 62/89 (69.7%) | 29/40 (72.5%) | 0.089 0.49 (0.22-1.09) | 0.324 0.57 (0.22-1.47) | 0.111 0.52 (0.24-1.10) |
| >40 Jahre (A3) | 9/62 (14.5%) | 16/89 (17.9%) | 10/40 (25.0%) | 0.660 1.29 (0.53-3.14) | 0.202 1.96 (0.72-5.37) | 0.426 1.49 (0.65-3.40) |
| Gebrauch von Immunsuppressiva* | 45/61 (73.8%) | 68/90 (75.6%) | 32/41 (78.0%) | 0.850 1.10 (0.52-2.32) | 0.648 1.26 (0.50-3.22) | 0.721 1.15 (0.57-2.31) |

Tabelle 4.7: Assoziation zwischen dem rs7720838-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von Colitis ulcerosa, definiert nach der Montreal-Klassifikation²²⁴.

*Zu den Immunsuppressiva zählten Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Infliximab und/oder Adalimumab.

Nach Bonferroni-Korrektur fand sich weder für den rs4495224-Genotyp noch für den rs7720838-Genotyp eine signifikante Assoziation zwischen der Colitis ulcerosa und den wesentlichen Krankheitsmerkmalen.

Trotz der ausgeprägten Gen-Gen-Interaktion zwischen *ATG16L1* und der 5p13.1-Region mit Auswirkung auf M. Crohn-Suszeptibilität konnte nach Bonferroni-Korrektur die Signifikanz dieser Gen-Gen-Interaktion auf den M. Crohn- bzw. den Colitis ulcerosa-Phänotyp nicht bestätigt werden (s. Tabelle 4.8 und 4.9). Dies war zum Teil auch durch die große Anzahl der untersuchten Interaktionen bedingt (n=189 für M. Crohn; n=144 für Colitis ulcerosa).

Tabelle 4.8 veranschaulicht die Gen-Gen-Interaktionen zwischen den SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und den SNPs im *ATG16L1*-Gen bezüglich M. Crohn-Eigenschaften mit einem Signifikanz-Niveau von $p < 0.05$.

| Interaktion | M. Crohn-Eigenschaft | p-Wert |
|---------------------------------------|--|--------|
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs1441090 | Body-Mass-Index | 0.014 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs12471449 | positive Familienanamnese für CED | 0.040 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs4663396 | positive Familienanamnese für CED | 0.016 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs2241879 | L2-Phänotyp (Kolonbefall) | 0.034 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs2289472 | L2-Phänotyp (Kolonbefall) | 0.043 |
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs12471449 | Fisteln | 0.026 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs13412102 | Stenosen | 0.015 |
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs1441090 | chirurgischer Eingriff aufgrund von M. Crohn | 0.041 |
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs2289472 | chirurgischer Eingriff aufgrund von M. Crohn | 0.043 |
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs2241879 | chirurgischer Eingriff aufgrund von M. Crohn | 0.042 |
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs3792106 | chirurgischer Eingriff aufgrund von M. Crohn | 0.004 |

Tabelle 4.8: Gen-Gen-Interaktionen zwischen den SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und den SNPs im *ATG16L1*-Gen bzgl. M. Crohn-Eigenschaften mit einem Signifikanz-Niveau von $p < 0.05$.

Keine der getesteten Hypothesen ($n=189$) war nach Bonferroni-Korrektur signifikant.

Vor der Bonferroni-Korrektur zeigte die Präsenz von rs7720838 (5p13.1) und rs3792106 (*ATG16L1*) bei M. Crohn-Patienten die größte Assoziation mit M. Crohn-bedingten operativen Eingriffen ($p = 0.004$; s. Tabelle 4.8), während bei der Colitis ulcerosa das gleichzeitige Vorhandensein von rs4495224 (5p13.1) und rs4663396 (*ATG16L1*) eine Assoziation mit einem erhöhten Gebrauch von Immunsuppressiva zeigte ($p = 0.0007$; s. Tabelle 4.9). Dies deutete auf einen allgemein schwereren Krankheitsverlauf bei

gleichzeitigem Auftreten von Genvarianten in 5p13.1 und M. Crohn-assoziierten *ATG16L1*-Varianten hin.

Tabelle 4.9 zeigt Gen-Gen-Interaktionen zwischen den SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und den SNPs im *ATG16L1*-Gen bezüglich Colitis ulcerosa-Eigenschaften mit einem Signifikanz-Niveau von $p < 0.05$.

| Interaktion | Colitis ulcerosa-Eigenschaft | p-Wert |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--------|
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs12471449 | positive Familienanamnese für CED | 0.043 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs4663396 | Gebrauch von Immunsuppressiva | 0.0007 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs1441090 | Gebrauch von Immunsuppressiva | 0.026 |
| rs4495224 – <i>ATG16L1</i> rs12471449 | Gebrauch von Immunsuppressiva | 0.005 |
| rs7720838 – <i>ATG16L1</i> rs4663396 | Gebrauch von Immunsuppressiva | 0.041 |

Tabelle 4.9: Gen-Gen-Interaktionen zwischen den SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und den SNPs im *ATG16L1*-Gen bezüglich Colitis ulcerosa-Eigenschaften mit einem Signifikanz-Niveau von $p < 0.05$.

Keine der getesteten Hypothesen ($n=144$) war nach Bonferroni-Korrektur signifikant. Die berücksichtigten Immunsuppressiva waren Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Infliximab und Adalimumab.

4.2.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse bzgl. Genvarianten in *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und der intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1

In unserer gesamten M. Crohn-Patientenkohorte wurden die SNPs in *PHOX2B* (rs16853571), *NCF4* (rs4821544), *FAM92B* (rs8050910) und auf Chromosom 10q21.1 (rs224136) bzgl. einer Korrelation mit einem ilealen Phänotyp untersucht. Dabei konnten wir in unserem europäischen Patientenkollektiv keine solche Korrelation feststellen ($p > 0.05$ für alle vier SNPs).

Dagegen konnten die zuvor publizierten Ergebnisse über die Assoziation zwischen der *NOD2* p.Leu1007fsx1008-Variante mit ilealem M. Crohn²¹⁸ in unserer Patientengruppe bestätigt werden ($p = 0.023$; OR: 1.94; 95%-KI: 1.03-3.68).

4.3 Analyse der Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis)

Der Begriff „Epistasis“ wurde erstmals 1909 von William Bateson eingeführt und bezog sich auf die Fähigkeit eines Gens, die Ausprägung eines anderen Gens zu unterdrücken²³⁰⁻²³². 1918 beschrieb Ronald Aylmer Fisher die epistatische Interaktion zwischen Allelen an unterschiedlichen Genloci als Phänomen der nicht-additiven genetischen Varianz im Sinne eines Beitrages dieser Allele zur Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals^{230,231,233}. Heute ist bekannt, dass verschiedene genetische Faktoren und deren Interaktionen untereinander bzw. mit Umweltfaktoren eine Reihe komplexer Krankheitsbilder auslösen können^{230,231}. Vor allem Gen-Gen-Interaktionen, oft als epistatische Interaktionen oder Epistasis bezeichnet, werden in vielen Krankheitsbildern für häufig vorkommende pathogenetische Mechanismen gehalten.

Ein weiterer Teilaspekt dieser Studie war die Untersuchung von potentiellen Gen-Gen-Interaktionen der SNPs in *PHOX2B* (rs16853571), *NCF4* (rs4821544), *FAM92B* (rs8050910), SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1 und den SNPs in der 5p13.1-Region (rs4495224 und rs7720838) mit anderen bereits replizierten M. Crohn-assoziierten Genvarianten. Zu diesen Polymorphismen gehören die drei bekannten *NOD2*-Varianten p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008, zehn kürzlich als M. Crohn-Suszeptibilitätsgene identifizierte *IL23R*-Varianten²²¹, neun Varianten in *ATG16L1* und *SLC22A4/5*²²². Wir wollten analysieren, ob sich bei Patienten mit mehr als nur einem der bereits als solche definierten CED-Suszeptibilitätsgene eine Gen-Gen-Interaktion im Sinne einer Potenzierung und damit eine signifikant höhere oder signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von CED gezeigt hätte.

4.3.1 Gen-Gen-Interaktionen zwischen *PTGER4* und den bereits etablierten Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *IL23R*, *ATG16L1* und *SLC22A4/5*

Bei M. Crohn-Patienten konnte zwischen den beiden SNPs der 5p13.1-Region (rs4495224 und rs7720838) und den SNPs in dem *ATG16L1*-Gen eine signifikante Gen-Gen-Interaktion nachgewiesen werden (s. Tabelle 4.10). Besonders eindeutig waren die

Interaktionen zwischen rs7720838 und *ATG16L1*-Polymorphismen mit p-Werten, die von 7.81×10^{-3} bis 1.09×10^{-7} reichten. Die stärkste Interaktion von rs7720838 trat mit rs13412102 in der 5'-flankierenden Region ($p = 1.09 \times 10^{-7}$), mit rs6431660 in der 5'-Region des Gens ($p = 2.29 \times 10^{-7}$) und mit rs2241880 (p.Thr300Ala) in der zentralen Region von *ATG16L1* ($p = 5.99 \times 10^{-7}$) auf. Die Gen-Gen-Interaktion zwischen *ATG16L1* und rs4495224 war ebenfalls ausgeprägt, wenn auch nicht ganz so stark wie die von *ATG16L1* und rs7720838. Hier zeigte sich die signifikanteste Interaktion zwischen rs6431660 ($p = 8.37 \times 10^{-5}$) und dem kodierenden SNP rs2241880 (p.Thr300Ala; $p = 3.81 \times 10^{-4}$). Zusätzlich zeigte der in verschiedenen Studien mit M. Crohn assoziierte^{120,121,222} *ATG16L1*-SNP rs2241879 starke Interaktionen mit beiden 5p13.1-SNPs (rs7720838: $p = 1.10 \times 10^{-6}$, rs4495224: $p = 3.07 \times 10^{-4}$).

Ein Nachweis für Gen-Gen-Interaktionen zwischen den SNPs in der 5p13.1-Region und Gen-Varianten in *NOD2*, *IL23R* und *SLC22A4/5* konnte hingegen nach Bonferroni-Korrektur nicht gefunden werden.

Tabelle 4.10 stellt Gen-Gen-Interaktionen zwischen SNPs in der 5p13.1-Region (rs4495224 und rs7720838) und SNPs im *ATG16L1*-Gen bezüglich M. Crohn-Suszeptibilität dar.

| <i>ATG16L1</i> -SNPs | rs4495224 | rs7720838 |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| | p-Werte | |
| rs13412102 | 4.84×10^{-4} | 1.09×10^{-7} |
| rs12471449 | 1.09×10^{-2} | $1.39 \times 10^{-2*}$ |
| rs6431660 | 8.37×10^{-5} | 2.29×10^{-7} |
| rs1441090 | 8.36×10^{-2} | $5.66 \times 10^{-2*}$ |
| rs2289472 | 3.05×10^{-4} | 1.34×10^{-6} |
| rs2241880 (p.Thr300Ala) | 3.81×10^{-4} | 5.99×10^{-7} |
| rs2241879 | 3.07×10^{-4} | 1.10×10^{-6} |

| | | |
|-----------|-----------------------|------------------------|
| rs3792106 | 2.65×10^{-4} | 1.40×10^{-5} |
| rs4663396 | 9.86×10^{-3} | $7.81 \times 10^{-3*}$ |

Tabelle 4.10: Gen-Gen-Interaktionen zwischen SNPs in der 5p13.1-Region (rs4495224 und rs7720838) und SNPs im *ATG16L1*-Gen bzgl. M. Crohn-Suszeptibilität

Die angegebenen p-Werte sind nicht nach Bonferroni korrigiert. Nach Bonferroni-Korrektur waren bis auf die mit (*) markierten alle Assoziationen signifikant ($p < 0.05$).

4.3.2 Gen-Gen-Interaktionen zwischen *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und dem SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1 und den bereits etablierten Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*

In unserer Studie analysierten wir die bereits bekannten CED-Suszeptibilitätsgene *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* bzgl. Gen-Gen-Interaktionen mit den von uns untersuchten Genen *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1. Während alle untersuchten SNPs von *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* in unserem Untersuchungskollektiv eine starke Assoziation mit M. Crohn zeigten, gelang uns der Nachweis einer Korrelation mit Colitis ulcerosa nur bei rs1004819, rs7517847 und rs11209026 im *IL23R*-Gen (s. Tabelle 4.11).

| | | Morbus Crohn (n=854) | | | Colitis ulcerosa (n=476) | | | Kontr. (n=1503) |
|--|------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| Gen SNP | MA | MAF | p-Wert | OR [95%-KI] | MAF | p-Wert | OR [95%-KI] | MAF |
| <i>NOD2</i> rs2066844 (p.Arg702Trp) | T | 0.089 | 2.0×10^{-5} | 1.78 [1.35-2.34] | 0.053 | 7.4×10^{-1} | 1.07 [0.73-1.56] | 0.050 |
| <i>NOD2</i> rs2066845 (p.Gly908Arg) | C | 0.041 | 5.0×10^{-3} | 1.74 [1.17-2.60] | 0.020 | 5.4×10^{-1} | 0.83 [0.46-1.52] | 0.024 |
| <i>NOD2</i> rs2066847 (p.Leu1007fsX1008) | insC | 0.121 | 1.6×10^{-22} | 4.04 [2.90-6.62] | 0.021 | 3.8×10^{-1} | 0.77 [0.43-1.39] | 0.027 |
| <i>IL23R</i> rs1004819 | T | 0.360 | 3.5×10^{-11} | 1.56 [1.37-1.78] | 0.314 | 1.8×10^{-3} | 1.30 [1.10-1.53] | 0.265 |

| | | | | | | | | |
|--|---|-------|----------------------------|---------------------|-------|----------------------------|---------------------|-------|
| <i>IL23R</i> rs7517847 | G | 0.356 | 1.2x10⁻⁹ | 0.68 [0.60-0.76] | 0.381 | 3.2x10⁻⁴ | 0.75 [0.65-0.88] | 0.448 |
| <i>IL23R</i> rs11209026 (p.Arg381Gln) | A | 0.030 | 3.0x10⁻⁸ | 0.43 [0.31-0.59] | 0.049 | 3.6x10⁻² | 0.70 [0.50-0.98] | 0.068 |
| <i>ATG16L1</i> rs2241879 | C | 0.412 | 3.2x10⁻⁵ | 0.78 [0.69-0.87] | 0.449 | 1.4x10 ⁻¹ | 0.90 [0.77-1.03] | 0.486 |
| <i>ATG16L1</i> rs2241880 (p.Thr300Ala) | A | 0.410 | 4.0x10⁻⁵ | 0.78 [0.69-0.88] | 0.449 | 2.0x10 ⁻¹ | 0.87 [0.78-1.05] | 0.482 |

Tabelle 4.11: Zusammenfassung der Genotypisierung von *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* in 854 M. Crohn- und 476 *C. ulcerosa*-Patienten verglichen mit 1503 gesunden, nicht miteinander verwandten Kontrollpersonen
Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. MA: Minor-Allel

Für Interaktionen hinsichtlich M. Crohn-Suszeptibilität zwischen den SNPs in *PHOX2B* (rs16853571), *NCF4* (rs4821544), *FAM92B* (rs8050910) und SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1 und Polymorphismen in den bereits etablierten M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* konnte nach der Korrektur für multiples Testen jedoch keine signifikante Evidenz nachgewiesen werden.

5 DISKUSSION

5.1 Suszeptibilitätsanalyse

5.1.1 *PTGER4* ist ein Suszeptibilitätsgen für M. Crohn

Diese detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse eines großen deutschen Untersuchungskollektivs (n=2833) bestätigt die 5p13.1-Region als einen Suszeptibilitätsloкус für M. Crohn. Dieses Ergebnis stimmt mit den neuesten GWAS von Libioule et al.¹⁹⁶ und Franke et al.¹⁹³ überein und bestärkt somit die Validität Chip-basierter Technologie zur schnellen Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen bei CED. In der Studie von Libioule et al.¹⁹⁶ zeigten die krankheitsassoziierten Allele eine Korrelation mit dem Expressionsniveau von *PTGER4*, dem der Assoziationsregion am nächsten gelegenen Gen. Bemerkenswert dabei ist, dass sich *PTGER4* als eines der herunterregulierten Schlüsselgene in *Nell1*-Knockout-Mäusen erwiesen hat²⁰⁰. *NELL1* wiederum ist ein kürzlich identifiziertes neues Suszeptibilitätsgen für M. Crohn¹⁹³. Die Erkenntnis, dass *PTGER4* ein wichtiges M. Crohn-Zielgen in der 5p13.1-Region ist, steht mit Berichten über *Ptger4*-Knockout-Mäuse im Einklang, die eine schwere Dextran-Natrium-Sulfat-induzierte Kolitis entwickelten^{71,234}.

Für den M. Crohn liegen die in Tabelle 4.1 vermerkten ORs für das Minor-Allel der zwei analysierten *PTGER4*-SNPs unter dem Wert von 1.0 und wirken daher am ehesten protektiv, wohingegen die Major-Allele die M. Crohn-Risiko-Allele für beide SNPs darstellen. Die rs4495224 A- und rs7720838 T-Risiko-Allele (Major-Allele) wurden in der Studie von Libioule et al.¹⁹⁶ mit einer erhöhten *PTGER4*-Expression assoziiert.

Auch wenn EP4 protektive Funktionen bei Entzündung zugeschrieben wurden^{71,234-236}, berichteten andere Studien von einer proinflammatorischen Rolle von EP4 in Tiermodellen mit rheumatoider Arthritis bzw. experimenteller autoimmuner Enzephalitis²³⁷⁻²³⁹. Es wurde gezeigt, dass EP4 die Differenzierung von Th1-Zellen und die Proliferation von Th17-Zellen antreibt²³⁸⁻²⁴⁰. Da diese zwei proinflammatorischen T-Zell-Untergruppen eine sehr wichtige Rolle in der Pathogenese von M. Crohn spielen¹⁵⁰, sind eine gesteigerte Expression von *PTGER4* und eine erhöhte EP4-Signalwirkung in

Trägern der M. Crohn-Risiko-Allele der zwei SNPs rs4495224 und rs7720838 plausibel. Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und XBP1 wurden als sehr wahrscheinliche Kandidaten für die Bindung an die jeweilige genomische Region identifiziert, was folglich zu einer Erhöhung der *PTGER4*-Expression führt. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der an vielen inflammatorischen Signalwegen beteiligt ist und mit der Pathogenese von CED in Verbindung gebracht wurde²⁴¹. XBP1 wurde unlängst als ein wichtiger Transkriptionsfaktor beschrieben, der Stress im endoplasmatischen Retikulum und die Entwicklung von intestinaler Entzündung in Verbindung bringt²⁴². Dennoch sind weitere funktionelle Studien für ein tieferes Verständnis sowohl des Einflusses dieser Transkriptionsfaktoren auf die *PTGER4*-Expression als auch der Rolle dieser chromosomalen Region bei der M. Crohn-Pathogenese notwendig.

Prostaglandine sind Arachidonsäuremetaboliten, die von den Enzymen Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1 und COX-2) synthetisiert werden und die in der physiologischen Regulation von Entzündung und gastrointestinaler Homöostase²⁴³⁻²⁴⁵ sowie in der Immunabwehr in der intestinalen Mukosa²⁴⁶ eine entscheidende Rolle spielen. Außerdem wurde ein Haplotyp der Prostaglandin-Synthase-2/Cyclooxygenase-2 als CED-Suszeptibilitätsfaktor¹⁹⁷ und eine Überexpression der mikrosomalen Prostaglandin-E-Synthase-1 bei CED¹⁹⁸ festgestellt. Interessanterweise vermindert Prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ2 die Entstehung intestinaler Läsionen durch Dinitrobenzolsulfonsäure (DNBS) in Ratten¹⁹⁹. Um die Rolle dieser chromosomalen Region bei der M. Crohn-Pathogenese zu klären, sind funktionelle Studien über die Auswirkungen genetischer Varianten in der 5p13.1-Region auf die *PTGER4*-Expression in verschiedenen Geweben und Studien über eine mögliche Verbindung zwischen dem *PTGER4*-Expressionsniveau und M. Crohn-Suszeptibilität notwendig.

Kürzlich wurde eine Assoziation zwischen *PTGER4*-Polymorphismen und Asthma²⁴⁷, einschließlich dem Aspirin-induzierten-Asthma²⁴⁸, entdeckt. Dies lässt auch auf eine Rolle dieses Gens im Entzündungsprozess des Atemtraktes schließen. Es zeigte sich, dass der Signalübertragungsweg von Prostaglandin E₂-EP4 eine Schlüsselrolle in der Immunantwort der Haut spielt, indem die Migration und die Reifung der Langerhans-Zellen (spezialisierte antigenpräsentierende Zellen) gefördert werden²⁴⁹. Diese Studie zeigte eine durch EP4-Antagonisten ausgelöste Beeinträchtigung der Langerhans-

Zellakkumulation in *Ptger4*-Knockout-Mäusen sowie eine Verminderung der Langerhans-Zellakkumulation in regionalen Lymphknoten²⁴⁹. Da APC sowie dendritische Zellen für die Abwehr gegen intestinale bakterielle Erreger entscheidend sind⁹⁰, könnte der Prostaglandin E₂-EP4-Signalübertragungsweg über die Regulierung von intestinalen dendritischen Zellen zur Entstehung von CED beitragen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Fähigkeit von Makrophagen der Lamina propria, transepitheliale Dendriten zur Entnahme von luminalen Antigenen zu bilden, vom Chemokin-Rezeptor CX3CR1 abhängig ist⁹⁰. Dieser wurde kürzlich als ein wichtiger genetischer Modifikator des M. Crohn-Phänotypes identifiziert²⁵⁰. Daher kann angenommen werden, dass die 5p13.1-Region nicht nur durch Beeinträchtigung der Prostaglandin-Rezeptor-Synthese, sondern auch durch eine gestörte Funktion der intestinalen dendritischen Zellen und Makrophagen zur M. Crohn-Suszeptibilität beiträgt.

Eine Beteiligung der 5p13.1-Region auf die Colitis ulcerosa-Suszeptibilität, die unlängst in Metaanalysen von GWAS^{251,252} nachgewiesen wurden, konnten wir nicht replizieren. Dies könnte an der begrenzten Probengröße unserer Untersuchungsgruppe und der schwächeren Wirkung der 5p13.1-Region auf die Colitis ulcerosa-Suszeptibilität im Vergleich zur M. Crohn-Suszeptibilität liegen. Vor kurzem hat die größte Metaanalyse, die je für CED durchgeführt wurde und mehr als 75000 Patienten und Kontrollpersonen einschloss, eine Assoziation mit Colitis ulcerosa gezeigt, die überzeugend bestätigt, dass es eine sehr starke Assoziation des *PTGER4*-Lokus mit M. Crohn gibt ($p = 1.81 \times 10^{-82}$). Dahingegen zeigte sich mit Colitis ulcerosa nur eine schwache Assoziation ($p = 1.68 \times 10^{-5}$ für die ImmunoChip-Colitis ulcerosa-Kohorte), die außerdem erst nach der Zusammenlegung sämtlicher Colitis ulcerosa-Kohorten genomweite Signifikanz erreichte ($p = 1.36 \times 10^{-10}$ nach Zusammenfügung sämtlicher Colitis ulcerosa-Kohorten)¹⁹⁵. Dies zeigt, dass äußerst große Untersuchungskollektive erforderlich sind, um signifikante Ergebnisse für schwache Assoziationen wie für *PTGER4* und Colitis ulcerosa zu zeigen. Zusammenfassend bestätigt diese Analyse die 5p13.1-Region als einen Suszeptibilitätsloкус für M. Crohn, zeigt aber auch, dass die 5p13.1-Region in der deutschen Bevölkerung keine Suszeptibilitätsregion für Colitis ulcerosa ist.

5.1.2 Die intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1, *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B* sind keine CED-Suszeptibilitätsloci in der deutschen Bevölkerung

In dieser Studie wurde erstmals versucht, die Ergebnisse der nordamerikanischen GWAS¹²¹ und der belgisch-französischen Studie¹⁹⁶ in einer großen deutschen Kohorte zu replizieren. Im Gegensatz zu Rioux et al.¹²¹ konnte jedoch keine Assoziation zwischen *PHOX2B* (rs16853571), *NCF4* (rs4821544), *FAM92B* (rs8050910) und rs224136 in der intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1 mit M. Crohn nachgewiesen werden. Da in der nordamerikanischen GWAS nur M. Crohn-Patienten mit ilealem Befall eingeschlossen waren¹²¹, wurde zusätzlich analysiert, ob die SNPs in *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und rs224136 mit einem ilealen Phänotyp bei M. Crohn assoziiert sind. In unserer M. Crohn-Patientenkohorte zeigte jedoch keiner dieser SNPs eine Assoziation mit ilealem Befall.

Eine Subanalyse, die ausschließlich Patienten mit ilealem Befall (L1- und L3-Phänotyp entsprechend der Montreal-Klassifikation des M. Crohn²²⁴) einschloss, konnte keine Assoziation zwischen M. Crohn-Suszeptibilität und einer der vier o.g. SNPs nachweisen. Dies lässt vermuten, dass die genetischen Unterschiede zwischen der europäischen und der nordamerikanischen M. Crohn-Population nicht primär auf die Selektion eines Krankheitsphänotyps zurückzuführen sind, sondern vielmehr von intrinsischen ethnischen Unterschieden dieser Untersuchungspopulationen abhängen.

Zusätzlich wurde der Einfluss von rs16853571 (*PHOX2B*), rs4821544 (*NCF4*), rs8050910 (*FAM92B*) und rs224136 (Chromosom 10q21.1) auf eine erhöhte Suszeptibilität bei Colitis ulcerosa getestet. Ähnlich wie bei den Ergebnissen in der M. Crohn-Patientengruppe war keiner dieser SNPs bei den 476 Colitis ulcerosa-Patienten mit Krankheitssuszeptibilität assoziiert.

Neue europäische GWAS^{120,122,193,194}, in denen sich keiner der vier neuen von Rioux et al.¹²¹ als Suszeptibilitätsgene beschriebenen SNPs in den „top hits“ der mit M. Crohn assoziierten SNPs befand, bestätigen die Ergebnisse unserer Studie. Eine aufwendige Metaanalyse der ersten drei GWAS von M. Crohn-Patienten⁷³, welche neben der US-amerikanischen¹²¹ auch die belgisch-französische Studie¹⁹⁶ und die Wellcome Trust Case Control Cohort Daten¹⁹⁴ mit einschloss, zeigte, ähnlich wie in unseren Ergebnissen, dass sich rs16853571 (*PHOX2B*), rs4821544 (*NCF4*), rs8050910 (*FAM92B*) und rs224136

(intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1) nicht unter den mit M. Crohn hochassozierten Suszeptibilitätsgenen befinden. In dieser Metaanalyse wurden jedoch *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* als Suszeptibilitätsloci für M. Crohn bestätigt.

5.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse

5.2.1 *PTGER4*-Polymorphismen sind nicht mit bestimmten phänotypischen Charakteristika von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert

In unserer Studie konnten wir keinen spezifischen CED-Phänotyp einem der beiden SNPs im *PTGER4*-Gen (rs4495224 und rs7720838) zuordnen, obwohl in diesem Untersuchungskollektiv andere starke Assoziationen wie die der *NOD2*-Varianten p.Leu1007fsX1008 mit ilealem M. Crohn, Stenosen und der Notwendigkeit chirurgischer Eingriffe überzeugend nachgewiesen werden konnten^{218,219,253,254}. Dies lässt den Schluss zu, dass die Probengröße der M. Crohn-Patientengruppe groß genug gewesen ist, klinisch relevante Assoziationen zu erfassen.

5.2.2 Die intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1, *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B* sind nicht mit einem ilealen Phänotyp assoziiert

Defekte in der Autophagozytose und in der intrazellulären Prozessierung von Bakterien scheinen für das Auftreten eines ilealen Befalls bei M. Crohn einen Schlüsselmechanismus darzustellen, da es vom terminalen Ileum zum Zökum einen 10³- bis 10⁴-fachen Anstieg in der luminalen Bakteriendichte gibt. Die starke Assoziation bestimmter *NOD2*-Varianten wie p.Leu1007fsX1008 mit einem ilealen Phänotyp^{255,256} bestärkt diese Aussage. Neueste Studien zeigen eine Assoziation zwischen *ATG16L1*-Varianten und einem ilealen Phänotyp²⁵⁷ und *TLR4*-Varianten und ilealen Stenosen²⁵⁸. Dies unterstützt die wichtige Rolle von Autophagozytoseproteinen und PRR in der Pathogenese des ilealen M. Crohn. Vor allem den ilealen dendritischen Zellen und Makrophagen wird eine wichtige Bedeutung als Auslöser des ilealen Befalls bei M. Crohn zugesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass CX3CR1-exprimierende ileale

Makrophagen für die Phagozytose von luminalen Bakterien von entscheidender Bedeutung sind⁹⁰, wohingegen eine bestimmte *CX3CR1*-Genvariante sehr stark mit einem ilealen M. Crohn-Phänotyp assoziiert ist²⁵⁰. Ileale dendritische Zellen synthetisieren außerdem IL-23, und unlängst wurde eine Assoziation zwischen der *IL23R*-Variante rs1004819 und ilealem M. Crohn nachgewiesen²²¹. *NCF4* wurde mit Phagozytose und antibakterieller Immunantwort in Verbindung gebracht und in der Studie von Rioux et al.¹²¹ mit ilealen M. Crohn-Patienten als Suszeptibilitätsgen identifiziert. Dies stellt einen zusätzlichen genetischen Zusammenhang zwischen ilealem Befall und Defekten in der Phagozytose von intestinalen Mikrobiota dar¹²⁵. In unserer Studie jedoch konnten wir die Assoziation mit *NCF4*, selbst als M. Crohn-Patienten mit nicht-ilealem Befall in einer getrennten Subanalyse ausgeschlossen wurden, nicht bestätigen.

Unterschiede zwischen unserer Studie und der GWAS von Rioux et al.¹²¹ könnten u.a. durch die größere Kohorte von M. Crohn-Patienten mit ilealem Befall in der US-amerikanischen Studie erklärt werden. Das erhöht die statistische Aussagekraft für diesen bestimmten M. Crohn-Subtyp, vor allem wenn man bedenkt, dass die meisten SNPs in der nordamerikanischen Studie¹²¹ nur sehr geringe Veränderungen in den Odds Ratios für M. Crohn-Suszeptibilität zeigten. Die Studie von Rioux et al. basierte auf der Analyse von 946 Fällen mit ilealem M. Crohn und 977 Kontrollpersonen, erweiterte sich in deren Replikationskohorte 1 auf 530 Trios und in deren Replikationskohorte 2 auf 350 Fälle mit ilealem M. Crohn und 207 Kontrollpersonen¹²¹.

Obwohl in unserer Studie fast genauso viele Studienteilnehmer eingeschlossen waren (n = 2833, einschließlich 854 M. Crohn-Patienten, 476 Colitis ulcerosa-Patienten und 1503 gesunde, nicht verwandte Kontrollpersonen), war hier die Patientenzahl mit nachgewiesenem ilealem M. Crohn wesentlich niedriger (n=529). Allerdings zeigte eine Kalkulation der statistischen Power, dass bei Annahme eines einseitigen Typ I-Fehlers von $\alpha=0.05$ und ähnlichen Odds Ratios wie von Rioux et al. für deren Replikationskohorte publiziert¹²¹, unsere M. Crohn-Probengröße für alle vier SNPs eine statistische Aussagekraft von weit über 80% lieferte (rs16853571 / *PHOX2B*: 84%; rs4821544 / *NCF4*: 92%; rs8050910 / *FAM92B*: 94%; rs224136 auf Chromosom 10q21.1: 100%), um die Ergebnisse von Rioux et al.¹²¹ zu replizieren, so dass die Größe unserer Kohorte durchaus ausreichend war.

Aufgrund der kleineren Anzahl an M. Crohn-Patienten mit eindeutig nachgewiesenem ilealem Phänotyp könnten die Unterschiede zur US-amerikanischen Studie an einer mangelnden Teststärke der Untergruppe mit ilealem Phänotyp liegen.

Unsere Studie ist zurzeit der umfangreichste Replikationsversuch der genannten US-amerikanischen Studie¹²¹, hat aber betreff des ilealen M. Crohn eine kleinere Teststärke als die nordamerikanische GWAS¹²¹. Vergleicht man die von Rioux et al.¹²¹ gelieferten Odds Ratios mit den Odds Ratios der vier neuen in unserer Studie untersuchten SNPs, so fällt nur die Odds Ratio eines einzigen SNP (*PHOX2B*: rs16853571; OR= 0.69 in der nordamerikanischen Studie) in das 95%-KI, das für die ileale Untergruppe in unserer Studie (OR: 0.93; 95%-KI: 0.68-1.26) berechnet wurde. Auch wenn diese Odds Ratio an der unteren Grenze unseres 95%-KI ist, können wir einen Unterschied zwischen unseren Berechnungen und denen von Rioux et al.¹²¹ nicht definitiv ausschließen.

Weiterhin konnte auch eine vor kurzem in Neuseeland durchgeführte Studie keine Assoziation zwischen M. Crohn und *PHOX2B* oder *FAM92B* nachweisen²⁶². Diese Studie legte jedoch eine Assoziation zwischen *NCF4* (rs4821544) und ilealem M. Crohn (p= 0.009; OR: 1.425; 95%-KI: 1.092-1.859) nahe²⁶² und ließ darauf schließen, dass dieses Gen besonders in dieser Untergruppe (M. Crohn-Patienten mit ilealem Befall) ein genetischer Risikofaktor ist. Man muss allerdings bedenken, dass die p-Werte dieser Studie aus Neuseeland nicht auf multiples Testen korrigiert wurden und dass deren Untersuchungskollektiv kleiner war als unsere M. Crohn-Gruppe.

Folglich könnten neben bestimmten Krankheitssubphänotypen ethnische Unterschiede der wichtigste Faktor für die Ergebnisunterschiede der diversen Studien sein. Dies wurde bereits in vorangegangenen Studien mit Bevölkerungsgruppen aus geographisch nahegelegenen Orten festgestellt. Varianten in *DLG5* waren zum Beispiel in der norddeutschen Bevölkerung mit M. Crohn assoziiert²⁶³, während in unserer süddeutschen CED-Kohorte²²³ und in vielen anderen Untersuchungskollektiven keine Assoziation nachgewiesen werden konnte (s. Metaanalyse²⁶⁴). Überdies zeigte *DLG5* in den neuesten GWAS^{121,194,196} keine Assoziationen mit M. Crohn. Es ist bemerkenswert, dass die Allelfrequenz unserer Kontrollpersonen für den 10q21.1-SNP (rs224136) niedriger war (0.151) als in den zwei Kontrollgruppen in der US-amerikanischen Erststudie (jeweils 0.191 und 0.230)¹²¹. Dies weist auf ethnische Unterschiede bezüglich bestimmter SNPs

hin. Interessanterweise war ein anderer SNP auf Chromosom 10q21 (rs10761659) in der GWAS des Wellcome Trust Case Control Consortium, mit ungefähr 2000 M. Crohn-Fällen und 3000 Kontrollpersonen die derzeit größte genomweite Assoziationsanalyse mit M. Crohn-Patienten¹⁹⁴, signifikant mit M. Crohn assoziiert.

Daher ist eine detaillierte Analyse weiterer SNPs nahe von rs224136 auf Chromosom 10q21.1, rs16853571 (*PHOX2B*), rs4821544 (*NCF4*) und rs8050910 (*FAM92B*) notwendig, bevor man eine Bedeutung dieser Genloci für M. Crohn-Suszeptibilität definitiv ausschließen kann.

Zusammenfassend ist diese Studie der erste spezifische Versuch, die Ergebnisse der US-amerikanischen GWAS von Rioux et al.¹²¹ in einer großen europäischen CED-Gruppe zu replizieren. In einer großen deutschen M. Crohn-Gruppe konnte jedoch keine Assoziation von *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und rs224136 in der intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1 mit M. Crohn oder mit einem ilealen Phänotyp bei M. Crohn nachgewiesen werden. Somit konnte eine Rolle dieser SNPs in der deutschen CED-Bevölkerung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse weiterer europäischer Studien (GWAS)^{194,196} und einer aktuellen Metaanalyse⁷³ könnten auf ethnische Unterschiede zwischen der nordamerikanischen und der europäischen CED-Bevölkerung zurückzuführen sein. Unsere Studie zeigte außerdem keine Assoziation dieser SNPs zu Colitis ulcerosa. Um diese potentiellen M. Crohn-Suszeptibilitätsgene zu bestätigen und deren Rolle in der Pathogenese von M. Crohn zu bestimmen, sind Replikationsstudien in verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen sowie funktionelle Analysen von großer Bedeutung.

5.3 Analyse der Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis)

5.3.1 *PTGER4* und *ATG16L1* zeigen Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis)

Diese Studie liefert die erste Beschreibung einer starken Gen-Gen-Interaktion zwischen den *PTGER4*-expressionsmodulierenden SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und des *ATG16L1*-Gens und bestätigt somit M. Crohn als ein polygenetisches Krankheitsbild.

Die stärkste Interaktion zwischen rs7720838 und rs13412102 ist mit einem p-Wert von 1×10^{-7} das bislang stärkste dokumentierte Epistasissignal und fast drei Zehnerpotenzen stärker als die wichtigste Gen-Gen-Interaktion, die in der Metaanalyse von Barrett et al. beschrieben wurde⁷³. Allerdings konnte diese Gen-Gen-Interaktion lediglich im deutschen Untersuchungskollektiv und weder in der US-amerikanischen noch in der deutschen Replikationskohorte beobachtet werden. Dies legt nahe, dass die Epistasie zwischen den zwei Genregionen kein allgemeingültiges Phänomen ist, welches in allen Populationen zur M. Crohn-Suszeptibilität beiträgt. Auch kürzlich durchgeführte GWAS-Metaanalysen konnten keine Epistasie zwischen SNPs in den *PTGER4*- und *ATG16L1*-Regionen nachweisen^{73,265}. Die nicht replizierbare Gen-Gen-Interaktion zwischen *PTGER4*- und *ATG16L1*-Regionen könnte auf Unterschiede in den Bevölkerungsgruppen zurückzuführen sein. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit zwischen der süd- und der norddeutschen Bevölkerung, die hier jeweils das Untersuchungskollektiv und die Replikationskohorte darstellen, ist dies jedoch unwahrscheinlich. Allerdings zeigten sich geringfügige genetische Unterschiede in den hier analysierten Populationen (z.B. die lediglich in der norddeutschen Bevölkerung nachgewiesene Assoziation von M. Crohn mit *DLG5*^{223,263} und nur in der nordamerikanischen¹²¹, nicht jedoch in der deutschen Bevölkerung¹⁸⁸ nachgewiesenen Assoziationen mit *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B*). Ferner könnten methodologische Faktoren eine Erklärung für die mangelnde Reproduzierbarkeit der Gen-Gen-Interaktionen zwischen *PTGER4* und *ATG16L1* darstellen, da in der US-amerikanischen und in der deutschen M. Crohn-Replikationskohorte unterschiedliche Genotypisierungs-Plattformen benutzt wurden. Die Benutzung von Surrogatmarkern anstelle der originalen, im deutschen Untersuchungskollektiv benutzten SNPs könnte daher eine zusätzliche Erklärung für die gefundenen Unterschiede sein, wobei dies aufgrund des hohen Kopplungsungleichgewichtes zwischen originalen SNPs und Surrogatmarkern sehr unwahrscheinlich ist. Die hier beschriebene Gen-Gen-Interaktion könnte aber auch zufällig sein und legt die Notwendigkeit einer extrem großen Probengröße nahe, um überzeugende Assoziationen nachweisen und echte Signale frei von Verzerrungen durch mehrere phänotypisch prägende Genloci mit kleiner Effektstärke trennen zu können.

Die intergenetische Interaktion zwischen *ATG16L1* und der 5p13.1-Region ist insofern besonders interessant, als die genauen funktionalen Konsequenzen der Polymorphismen in der 5p13.1-chromosomalen Region größtenteils unbekannt sind. Es ist nicht klar, ob der Einfluss der SNPs in 5p13.1 auf M. Crohn-Suszeptibilität eine kombinierte Aktion multipler Suszeptibilitätsvarianten ist oder ob er durch noch unbekanntes, damit gekoppelte Genloci innerhalb der Region ausgelöst wird.

Die starke epistatische Wirkung der *PTGER4*-Expressions-modulierenden SNPs und der *ATG16L1*-Varianten auf die M. Crohn-Suszeptibilität könnte aber auch mit einem Defekt der Bakterienphagozytose zusammenhängen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass PGE₂, der Ligand von *PTGER4*, die Phagozytose der Alveolarmakrophagen durch einen E-Prostanoid 2-Rezeptor-vermittelten intrazellulären Anstieg an zyklischem AMP inhibiert²⁶⁶. Andererseits schützt PGE₂ die lysosomale Membranstabilität der gastrointestinalen Epithelzellen²⁶⁷. Dies könnte den pathogenetischen Zusammenhang zur *ATG16L1*-vermittelten Autophagozytose darstellen und die Gen-Gen-Interaktion zwischen *PTGER4*-Expressions-modulierenden Varianten und *ATG16L1* in Bezug auf die M. Crohn-Suszeptibilität erklären. Bei der Erforschung der M. Crohn-Pathogenese haben sich nicht nur die Funktion von Th17-Zellen und Th17-Zytokinen^{143,259,268-270} und verwandten SNPs einschließlich Varianten in *IL23R* und *IL12B*, sondern auch Defekte in der Autophagozytose und der Prozessierung luminaler Bakterien zu einer wichtigen Thematik entwickelt¹²².

Durch die sehr starke Gen-Gen-Interaktion zwischen den SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und dem *ATG16L1*-Gen konnte der M. Crohn als polygenetisches Krankheitsbild identifiziert werden. Die einzige zuvor beschriebene Interaktion zwischen replizierten M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen war eine sehr schwache Assoziation zwischen rs2241880 im *ATG16L1*-Gen und den bekannten *NOD2*-Suszeptibilitäts-Varianten ($p=0.039$)¹²⁰, die außerdem in anderen Studien nicht repliziert werden konnte^{222,257,271}. Daher liefert die Gen-Gen-Interaktion zwischen der 5p13.1-Region und den Gen-Varianten in *ATG16L1* den erstmaligen Beweis für eine hochsignifikante intergenetische Interaktion, welche die M. Crohn-Suszeptibilität beeinflusst. In Anbetracht der APC-Funktionsstörung in *Ptger4*^{-/-} Mäusen²⁴⁹ und der grundlegenden Rolle von *ATG16L1* in der Bakterien-Phagozytose¹²¹ könnte die erhöhte

Suszeptibilität für M. Crohn durch Gen-Gen-Interaktionen zwischen *PTGER4*-Expressions-modulierenden Varianten und *ATG16L1*-SNPs auf ein funktionelles Defizit in der intestinalen Bakterienprozessierung zurückzuführen sein, was zur Auslösung einer intestinalen Entzündung führt. Da dem *PTGER4*-Liganden PGE₂ für die lysosomale Membranstabilität eine wichtige Rolle zugesprochen wird²⁶⁷, könnten bestimmte *PTGER4*-Expressions-modulierende SNPs die potentiell schädliche Wirkung der *ATG16L1*-Varianten auf die Autophagozytose verstärken, indem die Clearance und die Immunantwort auf intestinale Bakterien verändert werden. Zur Feststellung der genauen Rolle von rs4495224 und rs7720838 in der M. Crohn-Pathogenese sind jedoch weitere funktionelle Studien erforderlich.

5.3.2 Die intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1, *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B* zeigen keine Gen-Gen-Interaktionen mit *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*

Da die intergenetische Region auf Chromosom 10q21.1, *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B* in vorangegangenen Studien¹²¹ als Suszeptibilitätsgene für CED identifiziert wurden, haben wir diese Gene bzw. diese intergenetische Region auf Gen-Gen-Interaktionen mit den bereits in mehreren Studien^{221,222,253,271} replizierten Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* untersucht.

Nach Bonferroni-Korrektur konnte keine signifikante Evidenz für eine Interaktion zwischen den SNPs in *PHOX2B* (rs16853571), *NCF4* (rs4821544), *FAM92B* (rs8050910) sowie dem SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1 und Polymorphismen in den bereits identifizierten Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* nachgewiesen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren wurden durch verschiedene GWAS (genomweite Assoziationsstudien) eine Vielzahl von Suszeptibilitätsgenen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen identifiziert. Eine in den USA durchgeführte Studie zeigte drei neue Genvarianten in *PHOX2B*, *NCF4* und *FAM92B* sowie einen SNP (rs224136) in der intergenetischen Region auf Chromosom 10q21.1, die mit M. Crohn assoziiert sind. Eine weitere in Belgien erfolgte GWAS konnte eine neue 250kb-Region auf Chromosom 5p13.1 bestimmen, die die Expression von *PTGER4* moduliert und die zur Suszeptibilität von M. Crohn beiträgt.

Ziel dieser Arbeit war die erstmalige Analyse dieser Gene in der deutschen Bevölkerung unter drei Aspekten: der Krankheitssuszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), der phänotypischen CED-Ausprägung und bzgl. potentieller Gen-Gen-Interaktionen (Epistasie) mit in anderen Studien bereits als solche identifizierte CED-Suszeptibilitätsgenen.

Für diese Untersuchungen wurde genomische DNA von 2833 deutschen Individuen (854 M. Crohn-Patienten, 476 Colitis ulcerosa-Patienten und 1503 gesunde, nicht verwandte Kontrollpersonen) bzgl. SNPs in *PHOX2B* (rs16853571), *NCF4* (rs4821544), *FAM92B* (rs8050910) und SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1 untersucht. Für die SNPs rs4495224 und rs7720838 auf Chromosom 5p13.1 wurden insgesamt 7073 Individuen genotypisiert: 844 M. Crohn-Patienten, 471 Colitis ulcerosa-Patienten und 1488 Kontrollpersonen. In diese Untersuchung wurden zwei Replikationskohorten miteinbezogen. Die eine schloss 684 M. Crohn-Patienten und 1440 Kontrollpersonen nordamerikanischer Herkunft ein, die andere 1098 M. Crohn-Patienten und 1048 Kontrollpersonen deutscher Herkunft.

Zusätzlich wurde eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse durchgeführt und die sechs SNPs hinsichtlich Gen-Gen-Interaktionen mit *NOD2*, *IL23R*, *ATG16L1* und *SLC22A4/5* analysiert.

In unserem Untersuchungskollektiv waren die SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region signifikant mit M. Crohn assoziiert (rs4495224: $p= 4.10 \times 10^{-5}$; OR: 0.76; 95%-KI: 0.67-0.87; rs7720838: $p= 6.91 \times 10^{-4}$; OR 0.81; 95%-KI: 0.71-0.91), jedoch nicht mit Colitis ulcerosa. Diese Ergebnisse konnten in beiden Replikationskohorten bestätigt werden. In *in silico*-Analysen zeigten sich rs4495224 und rs7720838 als essentielle Bestandteile der Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und XBP1 mit einer höheren Bindungswahrscheinlichkeit bei M. Crohn-Risikoallel-Trägern. Das könnte die erhöhte *PTGER4*-Expression durch diese SNPs erklären.

Im Gegensatz dazu konnte in unserem Untersuchungskollektiv keine Assoziation mit *PHOX2B* ($p= 0.563$), *NCF4* ($p= 0.506$), *FAM92B* ($p= 0.401$) und rs224136 ($p= 0.363$) und M. Crohn nachgewiesen werden. Ebenso war keiner dieser SNPs mit Colitis ulcerosa assoziiert. Für die SNPs in *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* hingegen konnten wir in unserem Untersuchungskollektiv eine starke Assoziation mit M. Crohn nachweisen (p -Werte: 5.0×10^{-3} bis 1.6×10^{-22}). Eine Gen-Gen-Interaktion mit Polymorphismen in *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und rs224136 auf Chromosom 10q21.1 konnten wir nicht feststellen.

Nach Bonferroni-Korrektur konnten keine signifikanten Auswirkungen von rs4495224 und rs7720838 auf phänotypische Charakteristika in Patienten mit CED beobachtet werden. Auch zwischen einem Ileumbefall in M. Crohn-Patienten und dem Vorhandensein (auch nur eines) der vier Polymorphismen (SNP rs16853571 in *PHOX2B*, SNP rs4821544 in *NCF4*, SNP rs8050910 in *FAM92B* und SNP rs224136 auf Chromosom 10q21.1) konnte keine signifikante Assoziation beobachtet werden ($p > 0.05$ für alle vier untersuchten SNPs).

Es konnten jedoch eine Reihe von Gen-Gen-Interaktionen zwischen Chromosom 5p13.1-Polymorphismen und SNPs innerhalb des *ATG16L1*-Gens festgestellt werden. Die stärksten Interaktionen bestanden zwischen rs7720838 und *ATG16L1*-Polymorphismen rs13412102 ($p= 1.09 \times 10^{-7}$), rs6431660 ($p= 2.29 \times 10^{-7}$) und rs2241880 (p.Thr300Ala; $p= 5.99 \times 10^{-7}$). Die Tatsache, dass diese Ergebnisse in den beiden Replikationskohorten nicht repliziert werden konnten, spricht jedoch gegen eine signifikante Rolle dieser Gen-Gen-Interaktionen in der Suszeptibilität für M. Crohn.

Im Gegensatz zur nordamerikanischen Bevölkerung sind in der europäischen Bevölkerung *PHOX2B*, *NCF4*, *FAM92B* und rs224136 nicht mit M. Crohn assoziiert. *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* hingegen zeigten in beiden Bevölkerungsgruppen eine starke Assoziation mit M. Crohn und qualifizieren sich somit als signifikante M. Crohn-Suszeptibilitätsgene in der europäischen Bevölkerung.

In unserer Studie konnten wir 5p13.1 als einen signifikanten M. Crohn-Lokus bestätigen und demonstrierten durch *in silico*-Analysen, dass rs4495224 und rs7720838 ein Bestandteil der Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und XBP1 sind. Weitere funktionelle Studien sind jedoch notwendig, um die Ergebnisse unserer *in silico*-Analysen zu bestätigen und zu untersuchen, ob Veränderungen in der *PTGER4*-Exprimierung die M. Crohn-Suszeptibilität modulieren.

Zusammenfassend konnten wir erstmals die 5p13.1-Region in der deutschen Bevölkerung als Risiko-Lokus für einen M. Crohn nachweisen.

7 ANHANG

7.1 Literaturverzeichnis

1. Fielding,J.F. (1988) Crohn's disease and Dalziel's syndrome. A history. *J. Clin. Gastroenterol.* 10, 279-285
2. Kirsner,J.B. (2001) Historical origins of current IBD concepts. *World J. Gastroenterol.* 7, 175-184
3. Fabry,W. Ex scirrho et ulcere cancioso in intestino coeco exorta iliaca passio. Opera, Observatio LXI, Centuriae 1. Frankfurt: J.L. Dufour, 1682:49
4. Morgagni,G.B.(1769) De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis
5. Combe,C. and Saunders,W. (1813) A singular case of stricture and thickening of ileum. *Med. Trans. Roy. Coll. Phys. Lond.* 4, 16-21
6. Abercrombie,J. (1828) Pathological and practical researches of the stomach, the intestinal tract, and other viscera: Edinburgh: Waugh and Innes
7. Colles,A. (1830) Practical observations upon certain diseases of intestines, colon and rectum. *Dublin Hosp Reports* 5, 131-157
8. Corrigan,D. (1853) Ulceration of the intestines. *Proc. Path. Soc. Dublin* 1, 245
9. Koch,R. (1882) Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift.* Bd. 19, Nr. 15, 221-230
10. Fenwick,S. (1889) Clinical lectures on some obscure diseases of the abdomen. London, Churchill
11. Braun,H. (1909) Über entzündliche Geschwülste am Darm. *Deutsche Zeitschr. f. Chirurgie.* 100, 1-12
12. Dalziel,T.K. (1989) Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Dis. Colon Rectum* 32, 1076-1078
13. Moschowitz,E. and Wilensky,A.O. (1923) Nonspecific granulomata of the intestine. *Am. J. Med. Sci.* 166, 48-66
14. Crohn,B.B. *et al.* (2000) Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt. Sinai J. Med.* 67, 263-268
15. Colp,R. (1934). *Surg. Clin. North Am.* 14, 443

16. Wells,C. (1952) Ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 11, 105-120
17. Lockhart-Mummery,H.E. and Morson,B.C. (1960) Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut* 1, 87-105
18. Baillie,M. (1793) The morbid anatomy of some of the most important parts of the human body. Printed for J. Johnson and G. Nicol, London
19. Wilks,S. (1859) Lectures on Pathological Anatomy. London, Longmans
20. Wilks,S. (1859) Morbid appearances in the intestines of Miss Bankes. *Med Times Gazette* 2, 264-265
21. Wilks,S. and Moxon,W. (1875) Lectures on Pathological Anatomy. 2nd Ed. Philadelphia Lindsay and Blakiston
22. Weir,R.F. (1902) A new use for the useless appendix in surgical treatment of obstinate colitis. *Medical Record* 62, 201
23. Lockhart-Mummery,J.P. (1907) The causes of colitis: with special reference to its surgical treatment, with an account of 36 cases. *Lancet* 1, 1638
24. Hawkins,H.P. (1909) An Address On the natural history of ulcerative colitis and its bearing on treatment. *Br. Med. J.* 1, 765-770
25. Sonnenberg,A. *et al.* (1991) Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 100, 143-149
26. Nerich,V. *et al.* (2006) Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12, 218-226
27. Shivananda,S. *et al.* (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, 690-697
28. Ott,C. *et al.* (2008) The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 917-923
29. Yapp,T.R. *et al.* (2000) Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 907-911
30. Loftus,C.G. *et al.* (2007) Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm. Bowel. Dis.* 13, 254-261

31. Bernstein,C.N. *et al.* (2006) The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1559-1568
32. Blanchard,J.F. *et al.* (2001) Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am. J. Epidemiol.* 154, 328-335
33. Arin,L.A. *et al.* (2008) [High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study]. *Gastroenterol. Hepatol.* 31, 111-116
34. Vlachonikolis,I.G. *et al.* (2001) Epidemiology of inflammatory bowel disease in Heraklion, Crete. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 1008
35. Göke,B. und Beglinger,C. (2007) Gastroenterologie systematisch, Uni Med Verlag, 2. Auflage
36. Ekbohm,A. (2004) The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? *Inflamm. Bowel. Dis.* 10 Suppl 1, S32-S34
37. Norlen,B.J. *et al.* (1970) An epidemiological study of Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 5, 385-390
38. Ekbohm,A. *et al.* (1991) The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 100, 350-358
39. Andres,P.G. and Friedman,L.S. (1999) Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 28, 255-81, vii
40. Rothfuss,K.S. *et al.* (2006) Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* 12, 4819-4831
41. Brand,S. (2015) [Medical therapy of ulcerative colitis]. *MMW. Fortschr. Med.* 157, 45-48
42. Bonen,D.K. and Cho,J.H. (2003) The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124, 521-536
43. Newman,B. and Siminovitch,K.A. (2005) Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21, 401-407
44. Russel,M.G. (2000) Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur. J. Intern. Med.* 11, 191-196
45. Shanahan,F. (2002) Crohn's disease. *Lancet* 359, 62-69
46. Stockbrugger,R.W. *et al.* (2000) EC-IBD: a European effort in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Intern. Med.* 11, 187-190

47. Braat,H. *et al.* (2006) Immunology of Crohn's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072, 135-154
48. Bouma,G. and Strober,W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 521-533
49. Hanauer,S.B. (2006) Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12 Suppl 1, S3-S9
50. Karlinger,K. *et al.* (2000) The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur. J. Radiol.* 35, 154-167
51. Corrao,G. *et al.* (1998) Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int. J. Epidemiol.* 27, 397-404
52. Lindberg,E. *et al.* (1988) Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 29, 352-357
53. Russel,M.G. and Stockbrugger,R.W. (1996) Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand. J. Gastroenterol.* 31, 417-427
54. Farrell,R.J. and LaMont,J.T. (2002) Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 41-62
55. Krishnan,A. and Korzenik,J.R. (2002) Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 31, 21-39
56. Olszak,T. *et al.* (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489-493
57. Koutroubakis,I.E. *et al.* (2002) Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm. Bowel. Dis.* 8, 277-286
58. Loftus,E.V., Jr. *et al.* (2002) The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 51-60
59. Abraham,C. and Cho,J.H. (2009) Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 361, 2066-2078
60. Turner,J.R. (2006) Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am. J. Pathol.* 169, 1901-1909
61. Buhner,S. *et al.* (2006) Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 55, 342-347

62. Irvine,E.J. and Marshall,J.K. (2000) Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 119, 1740-1744
63. May,G.R. *et al.* (1993) Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 104, 1627-1632
64. Soderholm,J.D. *et al.* (2002) Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 50, 307-313
65. Xavier,R.J. and Podolsky,D.K. (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434
66. Wang,F. *et al.* (2006) IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology* 131, 1153-1163
67. Musch,M.W. *et al.* (2002) T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Clin. Invest* 110, 1739-1747
68. Bruewer,M. *et al.* (2003) Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* 171, 6164-6172
69. Dahan,S. *et al.* (2008) Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* 134, 192-203
70. Gassler,N. *et al.* (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 281, G216-G228
71. Kabashima,K. *et al.* (2002) The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J. Clin. Invest* 109, 883-893
72. Van der,S.M. *et al.* (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117-129
73. Barrett,J.C. *et al.* (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* 40, 955-962
74. McVay,L.D. *et al.* (2006) Absence of bacterially induced RELMbeta reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J. Clin. Invest* 116, 2914-2923
75. Ganz,T. (2003) Microbiology: Gut defence. *Nature* 422, 478-479
76. Selsted,M.E. and Ouellette,A.J. (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* 6, 551-557
77. Elphick,D.A. and Mahida,Y.R. (2005) Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 54, 1802-1809

78. Macpherson,A.J. *et al.* (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 288, 2222-2226
79. Wehkamp,J. *et al.* (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658-1664
80. Wehkamp,J. *et al.* (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 18129-18134
81. Zaph,C. *et al.* (2007) Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446, 552-556
82. Itoh,H. *et al.* (1999) A paradoxical reduction in susceptibility to colonic injury upon targeted transgenic ablation of goblet cells. *J. Clin. Invest* 104, 1539-1547
83. Salzman,N.H. *et al.* (2007) Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin. Immunol.* 19, 70-83
84. Weiner,H.L. *et al.* (1994) Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 809-837
85. Marth,T. *et al.* (1999) [Mechanisms and applications of oral tolerance]. *Z. Gastroenterol.* 37, 165-185
86. Rakoff-Nahoum,S. *et al.* (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241
87. Vijay-Kumar,M. *et al.* (2007) Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest* 117, 3909-3921
88. Lee,J. *et al.* (2006) Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 1327-1336
89. Bashir,M.E. *et al.* (2004) Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J. Immunol.* 172, 6978-6987
90. Niess,J.H. *et al.* (2005) CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258
91. Chieppa,M. *et al.* (2006) Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.* 203, 2841-2852
92. Abreu,M.T. (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131-144

93. Van,L.J. *et al.* (2007) Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 13, 338-355
94. Mahida,Y.R. and Rolfe,V.E. (2004) Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease. *Clin. Sci. (Lond)* 107, 331-341
95. Hugot,J.P. *et al.* (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603
96. Franchimont,D. *et al.* (2004) Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 987-992
97. Vermeire,S. *et al.* (2002) CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 74-83
98. Inohara *et al.* (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 355-383
99. Kobayashi,K. *et al.* (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416, 194-199
100. Abraham,C. and Cho,J.H. (2006) Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12, 641-650
101. Kobayashi,K.S. *et al.* (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731-734
102. Barnich,N. *et al.* (2005) GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 19021-19026
103. Chen,C.M. *et al.* (2004) Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 279, 25876-25882
104. Mayor,A. *et al.* (2007) A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat. Immunol.* 8, 497-503
105. McDonald,C. *et al.* (2005) A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 40301-40309
106. Pan,Q. *et al.* (2006) NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect. Immun.* 74, 2121-2127

107. Cario,E. *et al.* (2000) Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J. Immunol.* 164, 966-972
108. Hisamatsu,T. *et al.* (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 993-1000
109. Yoshida,M. *et al.* (2006) Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J. Clin. Invest* 116, 2142-2151
110. Neish,A.S. *et al.* (2000) Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B-alpha ubiquitination. *Science* 289, 1560-1563
111. Kelly,D. *et al.* (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat. Immunol.* 5, 104-112
112. Johansson,C. and Kelsall,B.L. (2005) Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin. Immunol.* 17, 284-294
113. Smythies,L.E. *et al.* (2005) Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J. Clin. Invest* 115, 66-75
114. van,W.F. and Cheroutre,H. (2010) Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 6, 559-566
115. Masopust,D. *et al.* (2006) Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J. Immunol.* 176, 2079-2083
116. Levine,B. and Deretic,V. (2007) Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 767-777
117. Mizushima,N. and Klionsky,D.J. (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 19-40
118. Gutierrez,M.G. *et al.* (2007) Protective role of autophagy against Vibrio cholerae cytolysin, a pore-forming toxin from V. cholerae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 1829-1834
119. Ogawa,M. *et al.* (2005) Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* 307, 727-731
120. Hampe,J. *et al.* (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* 39, 207-211

121. Rioux, J.D. *et al.* (2007) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* 39, 596-604
122. Parkes, M. *et al.* (2007) Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 39, 830-832
123. Singh, S.B. *et al.* (2006) Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313, 1438-1441
124. Taylor, G.A. (2007) IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* 9, 1099-1107
125. Ellson, C.D. *et al.* (2006) Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J. Exp. Med.* 203, 1927-1937
126. Matute, J.D. *et al.* (2005) p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 291-302
127. Stuart, L.M. and Ezekowitz, R.A. (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 22, 539-550
128. Lorenz, R.G. and Newberry, R.D. (2004) Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029, 44-57
129. Iwata, M. *et al.* (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity.* 21, 527-538
130. Mora, J.R. *et al.* (2003) Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424, 88-93
131. Jaensson, E. *et al.* (2008) Small intestinal CD103⁺ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* 205, 2139-2149
132. Johansson-Lindbom, B. *et al.* (2003) Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J. Exp. Med.* 198, 963-969
133. Ince, M.N. and Elliott, D.E. (2007) Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surg. Clin. North Am.* 87, 681-696
134. Szabo, S.J. *et al.* (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669

135. Zheng,W. and Flavell,R.A. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596
136. Ivanov,I.I. *et al.* (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126, 1121-1133
137. Williams,L.M. and Rudensky,A.Y. (2007) Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* 8, 277-284
138. Makita,S. *et al.* (2004) CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* 173, 3119-3130
139. Izcue,A. *et al.* (2006) Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* 212, 256-271
140. Elson,C.O. *et al.* (2005) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol. Rev.* 206, 260-276
141. Elson,C.O. *et al.* (2007) Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 132, 2359-2370
142. Annunziato,F. *et al.* (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204, 1849-1861
143. Fujino,S. *et al.* (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70
144. Hue,S. *et al.* (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 203, 2473-2483
145. Nguyen,D.D. *et al.* (2007) Lymphocyte-dependent and Th2 cytokine-associated colitis in mice deficient in Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Gastroenterology* 133, 1188-1197
146. Saruta,M. *et al.* (2007) Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J. Immunol.* 178, 3293-3300
147. Yen,D. *et al.* (2006) IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest* 116, 1310-1316
148. Kobayashi,T. *et al.* (2008) IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57, 1682-1689

149. Fuss, I.J. *et al.* (2004) Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest* 113, 1490-1497
150. 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, 1152-1167
151. Gionchetti, P. *et al.* (2003) Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124, 1202-1209
152. Sutherland, L. *et al.* (1991) Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 32, 1071-1075
153. Barnich, N. *et al.* (2007) CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest* 117, 1566-1574
154. Darfeuille-Michaud, A. *et al.* (1998) Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115, 1405-1413
155. Onderdonk, A.B. *et al.* (1977) The role of the intestinal microflora in experimental colitis. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1819-1825
156. Sellon, R.K. *et al.* (1998) Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.* 66, 5224-5231
157. Gill, S.R. *et al.* (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312, 1355-1359
158. Eckburg, P.B. and Relman, D.A. (2007) The role of microbes in Crohn's disease. *Clin. Infect. Dis.* 44, 256-262
159. Frank, D.N. *et al.* (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 13780-13785
160. Goh, K. and Xiao, S.D. (2009) Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J. Dig. Dis.* 10, 1-6
161. Appleyard, C.B. *et al.* (2004) Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflamm. Bowel. Dis.* 10, 106-111
162. Yang, S.K. *et al.* (2008) Epidemiology of inflammatory bowel disease in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-2005: a KASID study. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14, 542-549

163. Bjornsson,S. and Johannsson,J.H. (2000) Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 31-38
164. Kurata,J.H. *et al.* (1992) Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 102, 1940-1948
165. Roth,M.P. *et al.* (1989) Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* 96, 1016-1020
166. Yang,H. *et al.* (2001) Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol. Genet. Metab* 74, 1-21
167. Yang,H. *et al.* (1993) Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 34, 517-524
168. Farmer,R.G. *et al.* (1980) Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol.* 9, 271-277
169. Monsen,U. *et al.* (1991) Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 26, 302-306
170. Russel,M.G. *et al.* (1997) Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* 223, 88-91
171. Orholm,M. *et al.* (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 84-88
172. Peeters,M. *et al.* (1996) Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 111, 597-603
173. Satsangi,J. *et al.* (1994) Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 35, 696-700
174. Binder,V. (1998) Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis.* 16, 351-355
175. Yang,H. *et al.* (1993) Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers. *J. Clin. Invest* 92, 1080-1084
176. Shanahan,F. *et al.* (1992) Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* 103, 456-461
177. Shanahan,F. (1994) Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: are they important? *Gastroenterology* 107, 586-589

178. Satsangi, J. *et al.* (1998) The presence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 4, 18-26
179. Duerr, R.H. *et al.* (1991) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* 100, 1590-1596
180. Bansi, D.S. *et al.* (1996) Absence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in relatives of UK patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 111-116
181. Lindberg, E. *et al.* (1992) Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut* 33, 909-913
182. McKenzie, H. *et al.* (1990) Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut* 31, 536-538
183. Quinton, J.F. *et al.* (1998) Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 42, 788-791
184. Sendid, B. *et al.* (1996) Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 3, 219-226
185. Sendid, B. *et al.* (1998) Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 1306-1310
186. Thompson, N.P. *et al.* (1996) Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 312, 95-96
187. Tysk, C. *et al.* (1988) Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29, 990-996
188. Glas, J. *et al.* (2009) rs224136 on chromosome 10q21.1 and variants in PHOX2B, NCF4, and FAM92B are not major genetic risk factors for susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 665-672
189. Cho, J.H. and Weaver, C.T. (2007) The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 133, 1327-1339
190. Sartor, R.B. (2006) Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 390-407

191. Ogura, Y. *et al.* (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606
192. Duerr, R.H. *et al.* (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463
193. Franke, A. *et al.* (2007) Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS. One.* 2, e691
194. The Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-678
195. Jostins, L. *et al.* (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119-124
196. Libioulle, C. *et al.* (2007) Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS. Genet.* 3, e58
197. Cox, D.G. *et al.* (2005) Haplotype of prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 is involved in the susceptibility to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 11, 6003-6008
198. Subbaramaiah, K. *et al.* (2004) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.* 279, 12647-12658
199. Cuzzocrea, S. *et al.* (2003) The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ2 attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 138, 678-688
200. Desai, J. *et al.* (2006) Nell1-deficient mice have reduced expression of extracellular matrix proteins causing cranial and vertebral defects. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1329-1341
201. Le Douarin, N.M. *et al.* (2004) Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637-4650
202. Bronner-Fraser, M. (2003) Hierarchy of events regulating neural crest induction. *Harvey Lect.* 99, 129-144
203. Rohrer, H. (2011) Transcriptional control of differentiation and neurogenesis in autonomic ganglia. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1563-1573
204. Pei, D. *et al.* (2013) Distinct neuroblastoma-associated alterations of PHOX2B impair sympathetic neuronal differentiation in zebrafish models. *PLoS. Genet.* 9, e1003533

-
205. Morikawa,Y. *et al.* (2009) BMP signaling regulates sympathetic nervous system development through Smad4-dependent and -independent pathways. *Development* 136, 3575-3584
 206. Pattyn,A. *et al.* (1997) Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* 124, 4065-4075
 207. Guillemot,F. *et al.* (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463-476
 208. Pattyn,A. *et al.* (1999) The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399, 366-370
 209. Stanke,M. *et al.* (1999) The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons. *Development* 126, 4087-4094
 210. Borghini,S. *et al.* (2007) Transcriptional regulation of TLX2 and impaired intestinal innervation: possible role of the PHOX2A and PHOX2B genes. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 848-855
 211. Holzinger,A. *et al.* (2005) A novel 17 bp deletion in the PHOX2B gene causes congenital central hypoventilation syndrome with total aganglionosis of the small and large intestine. *Am. J. Med. Genet. A* 139, 50-51
 212. Young,H.M. *et al.* (1998) A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev. Biol.* 202, 67-84
 213. Corpening,J.C. *et al.* (2008) A Histone2BCerulean BAC transgene identifies differential expression of Phox2b in migrating enteric neural crest derivatives and enteric glia. *Dev. Dyn.* 237, 1119-1132
 214. Muise,A.M. *et al.* (2012) NADPH oxidase complex and IBD candidate gene studies: identification of a rare variant in NCF2 that results in reduced binding to RAC2. *Gut* 61, 1028-1035
 215. Somasundaram,R. *et al.* (2012) Linking risk conferring mutations in NCF4 to functional consequences in Crohn's disease. *Gut* 61, 1097-1098
 216. Safford,M. *et al.* (2005) Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat. Immunol.* 6, 472-480
 217. Zhang,Y. *et al.* (2013) ZNF365 promotes stability of fragile sites and telomeres. *Cancer Discov.* 3, 798-811

-
218. Seiderer, J. *et al.* (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, 1421-1432
 219. Seiderer, J. *et al.* (2006) Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12, 1114-1121
 220. Schnitzler, F. *et al.* (2006) Eight novel CARD15 variants detected by DNA sequence analysis of the CARD15 gene in 111 patients with inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 58, 99-106
 221. Glas, J. *et al.* (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
 222. Glas, J. *et al.* (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, 682-691
 223. Torok, H.P. *et al.* (2005) Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 54, 1421-1427
 224. Silverberg, M.S. *et al.* (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
 225. Gasche, C. *et al.* (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
 226. Sachar, D.B. *et al.* (2005) Is perianal Crohn's disease associated with intestinal fistulization? *Am. J. Gastroenterol.* 100, 1547-1549
 227. Cornel Mülhardt: Der Experimentator; Molekularbiologie/Genomics, 5. Auflage, Elsevier Verlag
 228. <http://www.tib-molbiol.de/de/lightcycler/design/genotyping.html>, downloaded on 27.04.2014
 229. Nukleinsäure Quantifizierung und Genotypisierung mit dem LightCycler®PCR Analysesystem, Genotypisierung, Martiensried 2006
 230. Wu, M. and Jiang, R. (2014) Detecting epistatic interactions in metagenome-wide association studies by metaBOOST. *Biomed. Res. Int.* 2014, 398147

-
231. Cordell,H.J. (2002) Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2463-2468
 232. Bateson (1909) Discussion on the Influence of Heredity on Disease, with special Reference to Tuberculosis, Cancer, and Diseases of the Nervous System: Introductory Address. *Proc. R. Soc. Med.* 2, 22-30
 233. Fisher,R.A. (1918) The Correlation Between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh.* 52 (02), 399-433.
 234. Nitta,M. *et al.* (2002) Expression of the EP4 prostaglandin E2 receptor subtype with rat dextran sodium sulphate colitis: colitis suppression by a selective agonist, ONO-AE1-329. *Scand. J. Immunol.* 56, 66-75
 235. Jiang,G.L. *et al.* (2007) The prevention of colitis by E Prostanoid receptor 4 agonist through enhancement of epithelium survival and regeneration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 22-28
 236. Okamoto,T. *et al.* (2012) Prevention of trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis by oral administration of a poly(lactic-coglycolic acid) microsphere containing prostaglandin E(2) receptor subtype 4 agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 340-349
 237. Clark,P. *et al.* (2008) MF498 [N-{{[4-(5,9-Diethoxy-6-oxo-6,8-dihydro-7H-pyrrolo[3,4-g]quinolin-7-yl)-3-methylbenzyl]sulfonyl}-2-(2-methoxyphenyl)acetamide], a selective E prostanoid receptor 4 antagonist, relieves joint inflammation and pain in rodent models of rheumatoid and osteoarthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 425-434
 238. Chen,Q. *et al.* (2010) A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br. J. Pharmacol.* 160, 292-310
 239. Yao,C. *et al.* (2009) Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat. Med.* 15, 633-640
 240. Boniface,K. *et al.* (2009) Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J. Exp. Med.* 206, 535-548
 241. Atreya,I. *et al.* (2008) NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J. Intern. Med.* 263, 591-596
 242. Kaser,A. *et al.* (2008) XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756

243. Morteau,O. (2000) Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 48, 473-480
244. Dey,I. *et al.* (2006) Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br. J. Pharmacol.* 149, 611-623
245. Gookin,J.L. *et al.* (2003) PG-mediated closure of paracellular pathway and not restitution is the primary determinant of barrier recovery in acutely injured porcine ileum. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 285, G967-G979
246. Morteau,O. *et al.* (2000) Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest* 105, 469-478
247. Kurz,T. *et al.* (2006) Fine mapping and positional candidate studies on chromosome 5p13 identify multiple asthma susceptibility loci. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118, 396-402
248. Kim,S.H. *et al.* (2007) Association between polymorphisms in prostanoid receptor genes and aspirin-intolerant asthma. *Pharmacogenet. Genomics* 17, 295-304
249. Kabashima,K. *et al.* (2003) Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat. Med.* 9, 744-749
250. Brand,S. *et al.* (2006) Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 99-106
251. McGovern,D.P. *et al.* (2010) Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 332-337
252. Anderson,C.A. *et al.* (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat. Genet.* 43, 246-252
253. Glas,J. *et al.* (2010) The NOD2 single nucleotide polymorphisms rs2066843 and rs2076756 are novel and common Crohn's disease susceptibility gene variants. *PLoS. One.* 5, e14466
254. Jurgens,M. *et al.* (2010) The presence of fistulas and NOD2 homozygosity strongly predict intestinal stenosis in Crohn's disease independent of the IL23R genotype. *J. Gastroenterol.* 45, 721-731
255. Seiderer,J. *et al.* (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, 1421-1432

256. Seiderer, J. *et al.* (2006) Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm. Bowel. Dis.* 12, 1114-1121
257. Prescott, N.J. *et al.* (2007) A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 132, 1665-1671
258. Brand, S. *et al.* (2005) The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11, 645-652
259. Seiderer, J. *et al.* (2008) Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14, 437-445
260. Dambacher, J. *et al.* (2007) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* 13, 71-82
261. Seiderer, J. *et al.* (2008) Genotype-phenotype analysis of the CXCL16 p.Ala181Val polymorphism in inflammatory bowel disease. *Clin. Immunol.* 127, 49-55
262. Roberts, R.L. *et al.* (2008) Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun.* 9, 561-565
263. Stoll, M. *et al.* (2004) Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 36, 476-480
264. Browning, B.L. *et al.* (2008) Gender-stratified analysis of DLG5 R30Q in 4707 patients with Crohn disease and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts. *J. Med. Genet.* 45, 36-42
265. Franke, A. *et al.* (2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 1118-1125
266. Aronoff, D.M. *et al.* (2004) Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J. Immunol.* 173, 559-565
267. Saitoh, O. *et al.* (1994) Effects of 16, 16-dimethyl prostaglandin E2 on lysosomal membrane stability in rat stomach. *J. Gastroenterol.* 29, 703-709
268. Schmechel, S. *et al.* (2008) Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm. Bowel. Dis.* 14, 204-212

269. Brand,S. *et al.* (2006) IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 290, G827-G838
270. Brand,S. *et al.* (2006) Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J. Cell Biochem.* 97, 709-723
271. Cummings,J.R. *et al.* (2007) Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm. Bowel. Dis.* 13, 941-946

7.2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| 6-MP | 6-Mercaptopurin |
| 95%-KI | 95%-Konfidenzintervall |
| Abb. | Abbildung |
| AIEC | adhärent-invasiver <i>E. coli</i> |
| AK | Antikörper |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ANCA | Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper |
| APC | antigenpräsentierende Zelle(n) |
| ASCA | Antikörper gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>ATG16L1</i> | engl.: autophagy related 16-like 1 |
| BMI | Body-Mass-Index |
| BOOP | Bronchiolitis-obliterans-organisierende Pneumonie |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| <i>C. ulcerosa</i> | Colitis ulcerosa |
| <i>CARD15</i> | engl.: caspase activation recruitment domain-containing protein 15 |
| CED | chronisch entzündliche Darmerkrankung(en) |
| CFS | engl.: common fragile sites |
| COP | Kryptogene organisierende Pneumonie |
| COX | Cyclooxygenase |
| CT | Computertomographie |
| CU | Colitis ulcerosa |
| D | Deutschland |
| d | Tag (engl: day) |
| DC | Dendritische Zelle(n) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid) |

| | |
|---------------|---|
| DNBS | Dinitrobenzolsulfonsäure |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dpc | Tag post Coitum (engl.: day post coitum) |
| E. coli | Escherichia coli |
| EP4 | Prostaglandin E-Rezeptor 4 |
| <i>FAM92B</i> | engl.: family with sequence similarity 92, member B |
| FoxP3 | Forkhead box protein 3 |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer |
| FS | engl.: fragile sites |
| g | Gramm |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GI-Trakt | Gastrointestinaltrakt |
| GM-CSF | engl.: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| GWAS | Genomweite Assoziationsstudie(n) |
| h | Stunde (engl.: hour) |
| H2BCFP | Histone2BCerulean |
| IBD | engl.: inflammatory bowel disease |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| intergen. | Intergenetisch |
| i.v. | intravenös |
| J | Jahr(e) |
| kb | Kilobasen |
| KG | Körpergewicht |
| kg | Kilogramm |
| KI | Konfidenzintervall |
| ko | knock out |
| Kontr. | Kontrollgruppe |
| LRR | leucine rich repeat |

| | |
|-------------------|--|
| M. | Morbus |
| MAF | Häufigkeit des selteneren Allels (engl.: minor allele frequency) |
| MAP | Mitogen Aktiviertes Protein |
| max. | maximal(e) |
| Mb | Megabasen |
| MC | Morbus Crohn |
| MDP | Muramyl-Dipeptid |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| Min. | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NADPH-Oxidase | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase |
| <i>NCF4</i> | engl.: neutrophil cytosolic factor 4 |
| NF-κB | Nuclearfactor-κB |
| ng | Nanogramm |
| NLRs | NOD-like Rezeptoren |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOD | nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne |
| NOD2 | Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 |
| o.g. | oben genannt(e/n) |
| OR | Odds Ratio |
| PAMPs | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PGE ₂ | Prostaglandin-E ₂ |
| <i>PHOX2B</i> | engl.: paired-like homeobox 2b |
| PI3-Kinase | Phosphoinositid-3-Kinase |
| pmol | Picomol |
| p.o. | per os |
| PPAR _γ | Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ |

| | |
|---------------|--|
| PRRs | pattern-recognition receptors |
| PSC | Primär sklerosierende Cholangitis |
| <i>PTGER4</i> | engl.: prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) |
| RELM β | engl.: resistin-like molecule beta |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: Reactive oxygen species) |
| SD | Standardabweichung (engl.: Standard deviation) |
| Sek. | Sekunde(n) |
| SNP(s) | Single Nucleotide Polymorphismus(en) |
| sog. | sogenannte |
| Tab. | Tabelle |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| THF | Tetrahydrofolsäure |
| TLRs | toll-like-Rezeptoren |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| u.a. | unter anderem |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: United States of America) |
| v.a. | vor allem |
| XBP1 | X-box binding protein 1 |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

7.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.1: Jährliche Inzidenz von Colitis ulcerosa und M. Crohn in Uppsala, Schweden, 1945-1983 (Abbildung modifiziert aus Ekblom ³⁶)..... | 4 |
| Abbildung 1.2.: Die drei Hauptbausteine in der Entstehung von CED: „Genetik“, „Immunantwort“ und „Umweltfaktoren“..... | 11 |
| Abbildung 1.3: Das intestinale Immunsystem im Gesundheits- (A) und Krankheitszustand (B) (Abbildung aus Abraham ⁵⁹)..... | 16 |
| Abbildung 1.4: Das intestinale Immunsystem (Abbildung aus Abraham ⁵⁹)..... | 20 |
| Abbildung 1.5: Die Dysbalance von pro- und anti-entzündlichen Zytokinen bei M. Crohn (Abbildung aus Brand ¹⁵⁰)..... | 22 |
| Abbildung 1.6: Lokalisation von <i>PTGER4</i> (roter Strich) auf Chromosom 5 (aus www.genecards.org)..... | 34 |
| Abbildung 1.7: Lokalisation von <i>PHOX2B</i> (roter Strich) auf Chromosom 4 (aus www.genecards.org)..... | 35 |
| Abbildung 1.8: Genstruktur von <i>PHOX2B</i> : untranslatierter Bereich (orange Boxen), Introns (schwarze Linien) und kodierende Sequenzen (blaue Boxen) (aus http://atlasgeneticsoncology.org)..... | 35 |
| Abbildung 1.9: Nachweis der Expression des Phox2b-H2BCFP-Transgens im Gastrointestinaltrakt eines Mäuseembryos am 14.5dpc ²¹³ | 36 |
| Abbildung 1.10: Lokalisation von <i>NCF4</i> (roter Strich) auf Chromosom 22 (aus www.genecards.org). Von Basenpaar 36 860 987 bis 36 878 016..... | 37 |
| Abbildung 1.11: Lokalisation von <i>EGR2</i> (roter Strich) auf Chromosom 10 (aus www.genecards.org). Von Basenpaar 62 811 995 bis 62 893 516..... | 38 |
| Abbildung 1.12: Lokalisation von <i>ZNF365</i> (roter Strich) auf Chromosom 10 (aus www.genecards.org). Von Basenpaar 62 374 156 bis 62 672 010..... | 39 |
| Abbildung 1.13: Lokalisation von <i>FAM92B</i> (roter Strich) auf Chromosom 16 (aus www.genecards.org)..... | 39 |
| Abbildung 1.14: Genstruktur von <i>FAM92B</i> : untranslatierter Bereich (grüne Balken), Introns (blaue Linien) und kodierende Sequenzen (rote Balken) (aus www.refgene.com)..... | 39 |
| Abbildung 3.1: Mutationsanalyse mit Hybridisierungs-Sonden (aus Roche Diagnostics ²²⁹)..... | 49 |

7.4 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1.1: Historische Daten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen..... | 3 |
| Tabelle 1.2: Inzidenz und Prävalenz bei M. Crohn und Colitis ulcerosa in Europa ^{26,27} | 4 |
| Tabelle 1.3: Inzidenz und Prävalenz bei M. Crohn und Colitis ulcerosa in Deutschland ³⁵ | 4 |
| Tabelle 1.4: Altersgipfel der Erstmanifestation und Geschlechterverhältnis bei CED ³⁵ | 5 |
| Tabelle 1.5: Gegenüberstellung verschiedener klinischer Aspekte bei M. Crohn und Colitis ulcerosa (Tabelle modifiziert aus Göke und Beglinger | 7 |
| Tabelle 1.6: Medikamentöse Therapieansätze bei M. Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) (Tabelle modifiziert aus Göke ^{35,41}) | 9 |
| Tabelle 1.7: Bereits bekannte Suszeptibilitätsgene des M. Crohn und der Colitis ulcerosa modifiziert aus Jostins et al. ¹⁹⁵ | 33 |
| Tabelle 3.1: Demografische Daten des Untersuchungskollektivs | 42 |
| Tabelle 3.2: Montreal-Klassifikation des M. Crohn ²²⁴ | 44 |
| Tabelle 3.3: Montreal-Klassifikation der Colitis ulcerosa ²²⁴ | 45 |
| Tabelle 3.4: Geräte | 46 |
| Tabelle 3.5: Verbrauchsmaterialien..... | 47 |
| Tabelle 3.6: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Enzyme | 48 |
| Tabelle 3.7: Für die Genotypisierung gebrauchte Primer- und FRET-Proben-Sequenzen und die Primer-Hybridisierungstemperaturen | 51 |
| Tabelle 3.8: Für die Sequenzierung gebrauchte Primersequenzen..... | 52 |
| Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Suszeptibilitätsgenanalyse bei 854 M. Crohn- u. 476 Colitis ulcerosa-Patienten verglichen mit 1503 gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen (Kontr.) | 56 |
| Tabelle 4.2: Vergleich zwischen M. Crohn-assoziierten SNPs in der US-amerikanischen Studie von Rioux et al. ¹²¹ und den Ergebnissen unserer europäischen Studie mit 854 M. Crohn- Patienten und 1503 gesunden Kontrollpersonen | 57 |
| Tabelle 4.3: Krankheitssuszeptibilitätsanalyse von M. Crohn-Patienten mit ilealem Befall (kombiniert L1- und L3-Phänotyp nach der Montreal-Klassifikation ²²⁴) verglichen mit gesunden, nicht miteinander verwandten Kontrollpersonen | 58 |
| Tabelle 4.4: Assoziation zwischen dem rs4495224-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von M. Crohn, definiert nach der Montreal-Klassifikation ²²⁴ | 60 |
| Tabelle 4.5: Assoziation zwischen dem rs7720838-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von M. Crohn, definiert nach der Montreal-Klassifikation ²²⁴ | 62 |
| Tabelle 4.6: Assoziation zwischen dem rs4495224-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von Colitis ulcerosa, definiert nach der Montreal-Klassifikation ²²⁴ | 63 |
| Tabelle 4.7: Assoziation zwischen dem rs7720838-Genotyp und phänotypischen Charakteristika von Colitis ulcerosa, definiert nach der Montreal-Klassifikation ²²⁴ | 64 |
| Tabelle 4.8: Gen-Gen-Interaktionen zwischen den SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und den SNPs im <i>ATG16L1</i> -Gen bzgl. M. Crohn-Eigenschaften mit einem Signifikanz-Niveau von $p < 0.05$ | 65 |
| Tabelle 4.9: Gen-Gen-Interaktionen zwischen den SNPs rs4495224 und rs7720838 in der 5p13.1-Region und den SNPs im <i>ATG16L1</i> -Gen bezüglich Colitis ulcerosa-Eigenschaften mit einem Signifikanz-Niveau von $p < 0.05$ | 66 |
| Tabelle 4.10: Gen-Gen-Interaktionen zwischen SNPs in der 5p13.1-Region (rs4495224 und rs7720838) und SNPs im <i>ATG16L1</i> -Gen bzgl. M. Crohn-Suszeptibilität..... | 69 |
| Tabelle 4.11: Zusammenfassung der Genotypisierung von <i>NOD2</i> , <i>IL23R</i> und <i>ATG16L1</i> in 854 M. Crohn- und 476 C. ulcerosa-Patienten verglichen mit 1503 gesunden, nicht miteinander verwandten Kontrollpersonen | 70 |

7.5 Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Stephan Brand, der mir immer sehr hilfsbereit beratend zur Seite stand, mich durch die Labor- und Schreibarbeit geführt, und mich stets in den Plänen meiner medizinischen Laufbahn unterstützt hat.

Kerstin Maier und Laurian Tonenchi danke ich von ganzem Herzen für die Einweisung in die verschiedenen Laborgeräte und -verfahren, aber auch für die vielen schönen gemeinsam verbrachten Stunden innerhalb und außerhalb des Labors.

Bei Simone Breitenreicher bedanke ich mich für die Beratung während der Auswertung der Aktendaten und die Kaffeepausen zwischendurch.

An Priv. Doz. Dr. med. Dipl.-Biol. Jürgen Glas geht mein Dank für die Betreuung im Labor.

Mia Brandlhuber und Fabrice Laviolette danke ich für deren stetige Bereitschaft, mir bei Fragen bzgl. Formatierung und Gestaltung zur Seite zu stehen, und für deren Freundschaft.

Meiner Familie möchte ich danken, weil sie die Verwirklichung meiner Pläne ermöglicht hat und weil sie mir von klein auf, und später über nah und fern, immer zur Seite stand und meine Entscheidungen stets bedingungslos unterstützt hat.

7.6 Publikationen

Glas J, Seiderer J, **Pasciuto G**, Tillack C, Diegelmann J, Pfennig S, Konrad A, Schmechel S, Wetzke M, Török HP, Stallhofer J, Jürgens M, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Mussack T, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. rs224136 on chromosome 10q21.1 and variants in PHOX2B, NCF4, and FAM92B are not major genetic risk factors for susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol.* 2009 Mar;104(3):665-72.

Glas J, Seiderer J, Czamara D, **Pasciuto G**, Diegelmann J, Wetzke M, Olszak T, Wolf C, Müller-Myhsok B, Balschun T, Achkar JP, Kamboh MI, Franke A, Duerr RH, Brand S. PTGER4 expression-modulating polymorphisms in the 5p13.1 region predispose to Crohn's disease and affect NF-kappaB and XBP1 binding sites. *PLoS One.* 2012;7(12):e52873.

Mueller S, Weichert N, Stoecklein V, Hammitzsch A, **Pasciuto G**, Krug C, Holzer M, Pfeiffer M, Siebeck M, Schmidmaier R. Evaluation of effectiveness of instruction and study habits in two consecutive clinical semesters of the medical curriculum Munich (MeCuM) reveals the need for more time for self study and higher frequency of assessment. *BMC Med Educ.* 2011 Aug 26;11:62.

Glas J, Seiderer J, **Pasciuto G**, Tillack C, Diegelmann J, Pfennig S, Konrad A, Schmechel S, Wetzke M, Török HP, Stallhofer J, Jürgens M, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Mussack T, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. Significant differences in the genetic susceptibility to Crohn's disease between North American and European populations regarding rs224136 on chromosome 10q21.1 and gene variants in PHOX2B, NCF4, and FAM92B (abstract). Presented at the Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (Digestive Disease Week) in San Diego, U.S.A., May 17-22, 2008. *Gastroenterology* 2008;134 (4; Suppl. 1).

Glas J, Seiderer J, **Pasciuto G**, Tillack C, Diegelmann J, Pfennig S, Roeske D, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, Wetzke M, Török HP, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Mussack T, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. 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 (abstract). Presented at the Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (Digestive Disease Week) in San Diego, U.S.A., May 17-22, 2008. *Gastroenterology* 2008;134 (4; Suppl. 1).

Seiderer J, Glas J, Diegelmann J, **Pasciuto G**, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Konrad A, Török H, Schiemann U, Griga T, Klein W, Epplen JT, Mussack T, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. The NOD2 variants rs2066843 and rs2076756 are novel independent Crohn's disease susceptibility gene variants associated with severe penetrating disease phenotype resulting in frequent need for surgery (abstract). Presented at the 4th Congress of ECCO – the European Crohn's and Colitis Organisation in Hamburg, Germany, February 5-7, 2009. *Journal of Crohn's and Colitis* 2009, Volume 3, Issue 1.

Diegelmann J, Glas J, Seiderer J, **Pasciuto G**, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Konrad A, Wetzke M, Török HP, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Mussack T, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. The CARD15 variants rs2066843 and rs2076756 are new independent Crohn's disease susceptibility genes associated with severe penetrating disease phenotype and frequent need for surgery. *Gastroenterology*, April 2008 Volume 134, Issue 4, Supplement 1, Page A-458

Diegelmann J, Glas J, Seiderer J, **Pasciuto G**, Tillack C, Konrad A, Török HP, Pfennig S, Schiemann U, Klein W, Epplen JT, Griga T, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. The disease susceptibility risk mediated by gene variants in PHOX2B, NCF4, FAM92B, and in the intergenic region on chromosome 10q21. 1 differs between North American and European patients with Crohn's disease (abstract). Presented at the 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in Berlin, Germany, October 1-4, 2008. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2008, 46(09), P028.

Seiderer J, Glas J, **Pasciuto G**, Diegelmann J, Tillack C, Pfennig S, Roeske D, Wetzke M, Jürgens M, Török HP, Griga T, Schiemann U, Klein W, Epplen JT, Mussack T, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Müller-Myhsok B, Brand S. First evidence for strong epistasis between two Crohn's disease susceptibility loci: PTGER4-expression-modulating polymorphisms in the 5p13. 1 region enhance ATG16L1-associated susceptibility to Crohn's disease (abstract). Presented at the 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in Berlin, Germany, October 1-4, 2008. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2008, 46(09), P022.

Eidesstattliche Versicherung

Pasciuto, Giulia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Neue Krankheitssuszeptibilitätsgene bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
und deren phänotypische Auswirkungen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berlin, 10.02.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand