

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

**Der Einfluss von *ATG16L1*-Polymorphismen auf die Suszeptibilität und
den Phänotyp von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

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

vorgelegt von
Frieder Schroff

aus
München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Brand

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael S. Kasparek

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Mai 2019

Teile dieser Dissertation wurden vorab wie folgt veröffentlicht:

Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, **Schroff F**, Wetzke M, Roeske D, Torok HP, Tonenchi L, Pfennig S, Haller D, Griga T, Klein W, Epplen JT, Folwaczny C, Lohse P, Goke B, Ochsenkuhn T, Mussack T, Folwaczny M, Muller-Myhsok B, Brand S. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol*. Mar 2008;103(3):682-691.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Epidemiologie, Klassifikation und Klinik.....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Überblick zu Morbus Crohn	1
1.1.1.1	Definition	1
1.1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.1.3	Klassifikation	2
1.1.1.4	Klinisches Bild des Morbus Crohn	2
1.1.1.5	Therapie des Morbus Crohn.....	3
1.1.2	Überblick zu Colitis ulcerosa.....	4
1.1.2.1	Definition	4
1.1.2.2	Epidemiologie	4
1.1.2.3	Klassifikation	5
1.1.2.4	Klinisches Bild der Colitis ulcerosa.....	5
1.1.2.5	Therapie der Colitis ulcerosa	6
1.2	<i>Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....</i>	<i>6</i>
1.2.1	Umweltfaktoren	7
1.2.2	Das intestinale Immunsystem	9
1.2.3	Intestinale Mikrobiota.....	14
1.2.4	Genetische Faktoren	14
1.2.4.1	<i>NOD2</i>	20
1.2.4.2	<i>SLC22A4 und SLC22A5 (OCTN1 und OCTN2)</i>	21
1.2.4.3	<i>IL23R</i>	21
1.2.4.4	<i>IRGM</i>	21
1.2.4.5	weitere CED-Suszeptibilitätsgene.....	22
1.3	<i>Das Gen ATG16L1.....</i>	<i>24</i>
1.3.1	Überblick zu <i>ATG16L1</i>	24
1.3.2	Autophagie.....	24
1.3.3	Funktion des ATG16L1-Proteins	28
1.3.4	Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	29
1.3.5	Der <i>ATG16L1</i> -Polymorphismus rs2241880 (T300A)	30
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	<i>31</i>
2	Material	32
2.1	<i>Studienpopulation.....</i>	<i>32</i>

2.2	<i>Material für molekularbiologische Experimente</i>	33
2.2.1	Materialien für die Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	33
2.2.1.1	Primer und Sonden zur Analyse der <i>ATG16L1</i> -Polymorphismen	33
2.2.1.2	Kits.....	35
2.2.2	Materialien für die Agarosegel-Elektrophorese.....	35
2.2.3	Materialien für die konventionelle PCR.....	36
2.3	<i>Verbrauchsmaterial</i>	36
2.4	<i>Geräte</i>	37
2.5	<i>Software</i>	38
3	Methoden	39
3.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	39
3.1.1	DNA-Isolierung.....	39
3.1.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	39
3.1.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion (real-time PCR)	40
3.1.4	Genotypisierung der <i>ATG16L1</i> -SNPs.....	42
3.1.4.1	FRET-Sonden und Primer.....	42
3.1.4.2	Schmelzkurventechnologie.....	43
3.1.4.3	RT-PCR-Programm	44
3.1.5	Agarosegel-Elektrophorese.....	46
3.1.6	Konventionelle PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte	46
3.1.7	Berechnung der Kopplungsungleichgewichte	47
3.1.8	Statistische Analysen.....	47
4	Ergebnisse	49
4.1	<i>Einfluss der untersuchten ATG16L1-SNPs auf die Krankheitssuszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen</i>	49
4.1.1	Signifikante Assoziation der <i>ATG16L1</i> -Polymorphismen mit Morbus Crohn.....	49
4.1.2	Keine Assoziation der <i>ATG16L1</i> -Polymorphismen mit Colitis ulcerosa in acht von neun Fällen	50
4.1.3	Absolute und relative Allelfrequenzen der <i>ATG16L1</i> -Polymorphismen.....	51
4.1.4	Absolute und relative Genotypfrequenzen der <i>ATG16L1</i> -Polymorphismen.....	52
4.1.5	Berechnung des Kopplungsungleichgewichts der <i>ATG16L1</i> -Polymorphismen.....	53
4.2	<i>Einfluss der ATG16L1-Polymorphismen auf den Phänotyp von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa</i>	55
4.2.1	Analyse bezüglich Genotyp-Phänotyp-Korrelation von <i>ATG16L1</i> mit Morbus Crohn ..	55

4.2.2	Analyse bezüglich Genotyp-Phänotyp-Korrelation von <i>ATG16L1</i> mit Colitis ulcerosa	57
4.3	<i>Sequenzierung</i>	57
4.4	Analyse zu Gen-Gen-Interaktionen (<i>Epistasis</i>) zwischen <i>ATG16L1</i> und <i>IL23R</i> , <i>NOD2</i> sowie <i>SLC22A4/5</i> bei Morbus Crohn-Patienten	58
5	Diskussion	60
5.1	<i>Einfluss von ATG16L1-Varianten auf die Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen</i>	60
5.2	<i>Genotyp-Phänotyp-Korrelation von ATG16L1 mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i>	63
5.3	<i>Expressionsanalysen</i>	65
5.4	<i>Weitere Untersuchungen zum Risikoallel ATG16L1-T300A in der Literatur zur Interaktion mit dem intestinalen Mikrobiom und zum Autophagieprozess</i>	68
6	Zusammenfassung	71
7	Literaturverzeichnis	73
8	Abbildungsverzeichnis	85
9	Tabellenverzeichnis	86
10	Abkürzungsverzeichnis	88
11	Danksagung	92
12	Anhang	93
	<i>Sequenzierung</i>	93
13	Curriculum Vitae	108

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Epidemiologie, Klassifikation und Klinik

Als chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) bezeichnet man immunvermittelte, chronische, in Schüben verlaufende Entzündungen des Darms. Unter ihnen sind Colitis ulcerosa und Morbus Crohn die beiden wichtigsten Vertreter. Die genauen Ursachen für diese Erkrankungen sind bisher nicht bekannt, jedoch hat die Ätiologie beider CED-Entitäten eine genetische Komponente. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, einen weiteren Teilaspekt der Genetik dieser beiden Krankheitsbilder aufzuklären.

Zunächst soll eine einleitende Übersicht zu Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gegeben werden. Im Anschluss wird bei der Pathogenese auf das intestinale Immunsystem und die Genetik eingegangen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Vorstellung des Autophagie-Prozesses mit dem maßgeblich daran beteiligten Protein ATG16L1 gelegt, das im Zentrum der Arbeit steht.

In der Folge werden verwendete Materialien beschrieben und Methoden vorgestellt, die bei Experimenten und Auswertungen Anwendung fanden. Nach der Präsentation der Ergebnisse folgt im Diskussionsteil eine Einordnung der Arbeit in den Kontext der aktuellen Forschung zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und eine abschließende Zusammenfassung.

1.1.1 Überblick zu Morbus Crohn

1.1.1.1 Definition

Morbus Crohn ist eine chronische, diskontinuierliche Entzündung, die über alle Wandschichten des Darms reicht. Sie kann disseminiert alle Teile des Gastrointestinaltrakts vom Mund bis zum After befallen, wobei die bevorzugte Lokalisation das terminale Ileum darstellt.

1.1.1.2 Epidemiologie

In Deutschland sind schätzungsweise knapp 100.000 Personen an Morbus Crohn erkrankt. Die Inzidenz liegt hier bei 3,0-6,6/100.000 pro Jahr, die Prävalenz bei 30,5-54,6/100.000 (Brandes 1983, Daiss 1989, Molodecky 2012, Ott 2008). Beide Geschlechter sind annähernd

mit gleicher Häufigkeit betroffen (Lapidus 2001), in einigen Arbeiten wird eine leichte weibliche Prädominanz beschrieben (Lapidus 1997, Lee 1985, Lindberg 1991, Löffler 1993, Shivananda 1996). Eine familiäre Häufung wird beschrieben (Bengtson 2009). Ein Erkrankungsgipfel liegt zwischen 15. und 30., ein zweiter zwischen 60. und 80. Lebensjahr (Loftus 2004). Von Baumgart et al. wird die Lebenserwartung als leicht reduziert beschrieben (Baumgart 2012). Im weltweiten Vergleich zeigen sich Inzidenz- und Prävalenzgipfel in Nordeuropa, Großbritannien und Nordamerika. Die Ursache für das in einer „European Collaborative Study“ beschriebene europäische Nord-Süd-Gefälle ist wohl weniger in dem geographischen Breitengrad als im sozioökonomischen Status der jeweiligen Länder zu suchen (Shivananda 1996).

1.1.1.3 Klassifikation

Die klinische Einteilung des Morbus Crohn erfolgt nach der Montreal-Klassifikation von 2005 (Silverberg 2005). Maßgeblich sind dafür Alter bei Diagnosestellung, Lokalisation und klinisches Bild.

	<i>Gruppe</i>	<i>Definition</i>
Alter bei Diagnosestellung (age)	A1	< 16 Jahre
	A2	17 – 40 Jahre
	A3	> 40 Jahre
Lokalisation (location)	L1	Ileum
	L2	Kolon
	L3	Ileum/Kolon
	L4	Isoliert oberer GI-Trakt*
Klinisches Bild (behavior)	B1	keine Stenosen, keine Penetrationen
	B2	Stenosen
	B3	Penetrationen
	p	perianaler Befall†

* L4 wird als Zusatz zu L1-3 verwendet bei gleichzeitigem Befall des oberen GI-Trakts

† p wird als Zusatz zu B1-3 verwendet bei gleichzeitigem perianalem Befall

Tabelle 1: Montreal-Klassifikation zur klinischen Einteilung des Morbus Crohn (Silverberg 2005)

1.1.1.4 Klinisches Bild des Morbus Crohn

Die für den Morbus Crohn typische transmurale Entzündung der Darmwand verläuft im Allgemeinen entweder akut oder chronisch. Wegen des variablen Ausmaßes des Befalls des Gastrointestinaltrakts stellt sich auch das klinische Erscheinungsbild sehr variabel dar. Zu den

häufigsten klinischen Symptomen zählen langanhaltende Diarrhöen, Bauchschmerzen, Fieber, Meteorismus und Flatulenz, Abgeschlagenheit und Müdigkeit sowie Gewichtsverlust (Mekhjian 1979). Bei Erstmanifestation kann das Auftreten dieser Symptome als akute Appendizitis fehlinterpretiert werden. Im Verlauf der Erkrankung entwickelt sich meist entweder ein fibrostenotisch obstruierendes oder ein penetrierendes Krankheitsbild mit Fistelbildung. Zu den extraintestinalen Begleiterkrankungen gehören Arthritis, Uveitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum sowie in seltenen Fällen die primär sklerosierende Cholangitis (Danese 2005). Bei ausgedehntem Befall scheint ähnlich wie bei der Colitis ulcerosa das Risiko für die Entstehung eines Kolonkarzinoms erhöht zu sein (Choi 1994, Lutgens 2008), Canavan et al. beschreiben auch ein erhöhtes Risiko für Dünndarm-Neoplasien (Canavan 2006).

1.1.1.5 Therapie des Morbus Crohn

Die Behandlung des Morbus Crohn besteht zum einen aus akuter Schubtherapie, zum anderen aus remissionserhaltender Therapie. Sie kann medikamentös, diätetisch und operativ erfolgen.

Schubtherapie des Morbus Crohn

Medikamentöse Therapie

- Glukokortikoide
- Antibiotika
- Biologika (Infliximab, Adalimumab, Vedolizumab)
- Elementardiät
- vollparenterale Ernährung
- (5-Aminosalicylsäure, kaum wirksam bei Morbus Crohn)

Operative Versorgung bei Komplikationen

Indikation: Stenosen, Fisteln, Abszesse, Karzinome und höhergradige Dysplasien

- Abszessdrainage
- Fistel- und Abszessspaltung
- Darmteilresektion (meist ileozökal)
- Konglomerattumorentfernung
- vorübergehendes Ileostoma, Kolostoma

Remissionstherapie des Morbus Crohn

Remissionserhaltende Therapie

- Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat)
- Biologika (Infliximab, Adalimumab, Vedolizumab)

Substitutionstherapie

- Substitution von Eisen, Calcium und Zink sowie Vitaminen, z.B. Vit. B₁₂, A, D, E, K)
 - Ggf. Bisphosphonate bei Osteoporose
-

Operative Versorgung

- permanentes Ileo- oder Kolostoma
 - Pouch und Proktokolektomie
-

Tabelle 2: Therapie des Morbus Crohn (modifiziert aus Göke 2007)

Gemäß einer Studie von Cleynen hat der Einsatz von Immunmodulatoren in den ersten drei Jahren nach Diagnosestellung einen protektiven Effekt bezüglich Stenosierungen und Morbus Crohn-assoziierten Operationen (Cleynen 2012).

In einer aktuellen Studie wurde für Träger von *NOD2*-Mutationen ein vergleichsweise schlechtes Ansprechen auf Steroide gezeigt, wobei eine Behandlung mit Immunsuppressiva gut möglich war (Niess 2012).

Die vielen Stufen und Komponenten des Entzündungsprozesses bieten Möglichkeiten zur Entwicklung einer Vielzahl neuer Medikamente und Stoffklassen. Beispielhaft seien hier die beiden Konzepte Blockade von Schlüssel-Zytokinen und die Blockade von Leukozyten-Migration, -Adhäsion und -Homing erwähnt, die im Falle von Vedolizumab schon Anwendung finden und zu denen weiterhin Medikamente entwickelt werden. Weiterhin spielen die Möglichkeiten von Stammzelltransplantationen eine Rolle in der Forschung und ersten klinischen Studien (Baumgart 2012). Eine autosomal-rezessiv vererbte Morbus Crohn-Form beruht auf einer *IL10*-Mutation. Durch Knochenmark-Transplantation konnte bei für diese Mutation homozygoten Kindern in mindestens einem Fall eine Remission erzielt werden (Glocker 2010, Glocker 2009).

1.1.2 Überblick zu Colitis ulcerosa

1.1.2.1 Definition

Colitis ulcerosa ist eine chronische, ulzeröse, vom Rektum ausgehende, sich kontinuierlich ausbreitende, rezidivierende Entzündung der Mukosa und Submukosa des Kolons.

1.1.2.2 Epidemiologie

Schätzungsweise 90.000 Menschen sind deutschlandweit an einer Colitis ulcerosa erkrankt. Die Prävalenz wird jedoch meist niedriger mit 24,8-48,8/100.000 angegeben. Die Inzidenz beträgt 1,3-5,8/100.000 Personenjahre (Brandes 1983, Daiss 1989, Molodecky 2012). Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen. Wie beim Morbus Crohn ist eine familiäre Häufung bekannt. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr, ein zweiter Erkrankungsgipfel um das 60. Lebensjahr wird diskutiert (Ekbohm 2004, Loftus 2004).

1.1.2.3 Klassifikation

Die klinische Einteilung erfolgt wie beim Morbus Crohn seit 2005 entsprechend der Montreal-Klassifikation nach Ausdehnung und Schweregrad (Silverberg 2005).

	<i>Gruppe</i>	<i>Definition</i>
Ausdehnung (extent)	E1 Ulzeröse Proktitis	Befall auf das Rektum begrenzt (d.h. die maximale proximale Ausdehnung ist distal des rekto-sigmoidalen Übergangs)
	E2 Linksseitige Colitis ulcerosa	Befall distal der Milzflexur
	E3 Ausgedehnte Colitis ulcerosa	Befall auch proximal der Milzflexur, Pankolitis
Schweregrad (severity)	S0 Klinische Remission	Asymptomatisch
	S1 Milder Verlauf	≤ 4 Stuhlpassagen/Tag (mit oder ohne Blut), Fehlen jeglicher systemischer Beschwerden, normale Entzündungswerte (BSG*)
	S2 Moderater Verlauf	> 4 Stuhlpassagen/Tag, minimale systemische Beschwerden
	S3 Schwerer Verlauf	≥ 6 blutige Stuhlpassagen/Tag, Puls ≥ 90/min, Temperatur ≥ 37,5 °C, Hämoglobin < 10,5 g/100ml, BSG* ≥ 30 mm/h

*BSG = Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit

Tabelle 3: Montreal-Klassifikation zur klinischen Einteilung der Colitis ulcerosa (nach Silverberg 2005)

1.1.2.4 Klinisches Bild der Colitis ulcerosa

Durch eine ulzeröse Entzündung von Mukosa und Submukosa kommt es zur Störung der intestinalen Barrierefunktion und verminderter Fähigkeit des Kolons, Salze und Wasser zu resorbieren. Das klinische Erscheinungsbild ist daher geprägt von blutigen, schleimigen Durchfällen, oft begleitet von Tenesmen und krampfartigen Bauchschmerzen. Bei isoliertem Befall des Rektums kann allerdings auch Obstipation führendes Krankheitssymptom sein. Der Schweregrad der Symptome sowie die Schmerzlokalisierung korrelieren meist mit der Ausdehnung des Kolonbefalls. Bei mittelgradiger oder schwerer Colitis ulcerosa können zusätzlich Gewichtsverlust, Fieber, Anämie, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen auftreten (Göke 2007). Extraintestinale Begleiterkrankungen sind u.a. die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), Arthritis, Uveitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum oder Perikarditis. Das Risiko für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms ist nach 8-10 Jahren signifikant erhöht und steigt zwischen dem zweiten und vierten Jahrzehnt

der Erkrankung um 0,5-1,0 % pro Jahr an (Eaden 2000). Nach 40 Jahren Pankolitis entwickeln 30-35 % der Patienten ein kolorektales Karzinom (Ekbom 1990).

1.1.2.5 Therapie der Colitis ulcerosa

Ähnlich wie bei Morbus Crohn beruht die Behandlung der Colitis ulcerosa auf der Therapie des akuten Schubes und der Remissionserhaltung. Sie sollte je nach Befallsmuster, Ausprägung, aktueller Symptomatik, Begleiterkrankungen und bisherigem Verlauf auf jeden Patienten individuell abgestimmt werden. Im Unterschied zur Therapie des Morbus Crohn steht für die Colitis ulcerosa eine kurative Behandlungsoption mittels Kolektomie zur Verfügung.

Zur Schubtherapie werden zum einen 5-ASA-Präparate wie Sulfasalazin, Mesalazin oder Olsalazin, zum anderen Steroide sowie Biologika (wie Infliximab, Adalimumab und Vedolizumab) eingesetzt. Als Ausweichpräparate stehen Cyclosporin (nur kurzfristige Therapie) und Tacrolimus zur Verfügung (Göke 2007).

Zur Remissionserhaltung werden ebenfalls 5-ASA-Präparate und darüber hinaus Immunsuppressiva wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin oder die oben genannten Biologika eingesetzt (Göke 2007).

Als symptomatische Therapie kommen Loperamid oder auch Tinctura Opii zum Einsatz, Mangelzustände von Vitamin und Spurenelementen wie insbesondere Eisen müssen gegebenenfalls ausgeglichen werden, Bisphosphonate kommen bei Patienten mit manifester Osteoporose zur Anwendung.

1.2 Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die genaue Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist noch nicht hinreichend geklärt. In der Literatur werden verschiedene Hypothesen diskutiert, einige sind sich jedoch die meisten Autoren darin, dass den Erkrankungen eine multifaktorielle Pathogenese zu Grunde liegt, also kein einzelner Mechanismus allein für die Krankheitsentstehung verantwortlich gemacht werden kann (Bonen 2003, Newman 2005, Russel 2000, Shanahan 2002, Stockbrügger 2000). Eine *Conditio sine qua non* konnte bisher nicht gefunden werden.

Als Hauptkomponenten der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stehen in aktuellen Publikationen in erster Linie immunologische Dysregulation und

genetische Disposition im Fokus. Insbesondere der mögliche Kausalzusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren ist derzeit Inhalt vieler Studien, so auch der vorliegenden Arbeit.

1.2.1 Umweltfaktoren

Umweltfaktoren haben nachgewiesenermaßen ebenfalls Einfluss auf das Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Belege dafür sind, dass bei Morbus Crohn zum einen die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen unter 50 % liegt, und zum anderen Angehörige der gleichen ethnischen Gruppe, die aber in verschiedenen Regionen leben, ein unterschiedliches Erkrankungsrisiko aufweisen (Shanahan 2002). Rauchen ist für Morbus Crohn ein mehrfach beschriebener Risikofaktor, während es für das Auftreten der Colitis ulcerosa einen protektiven Effekt zu haben scheint.

Epidemiologische Untersuchungen geben Hinweise zu weiteren möglichen pathogenetischen Zusammenhängen. So ist seit dem Ende des zweiten Weltkriegs die Inzidenz von Morbus Crohn in Deutschland von 3,0 auf 5,2 angestiegen (Brandes 1983, Goebell 1994, Timmer 1999). Eine ähnliche Entwicklung lässt sich für andere europäische Länder beobachten (Loftus 2004, Logan 1998, Russel 2000). Unabhängig vom zeitlichen Trend gibt es auch deutliche Unterschiede in der geographischen Verteilung. Weltweit durchgeführte Studien zeigen Inzidenz- und Prävalenzgipfel für Nordamerika, Nordeuropa und Großbritannien (Loftus 2004), was einen Zusammenhang mit dem geographischen Breitengrad vermuten lässt (Shivananda 1996). Genauere Untersuchungen dieses vermuteten Nord-Süd-Gefälles ergaben jedoch, dass eine Korrelation vielmehr mit sozioökonomischem Status bzw. Lebensweise und herrschenden Umweltfaktoren als mit divergierender genetischer Veranlagung besteht (Brandes 1983, Daiss 1989, Ekblom 1991, Kirsner 2001, Kyle 1980, Loftus 2004, Russel 2000, Shivananda 1996, Sonnenberg 1991, Stockbrügger 2000). Dass ursprünglich bekanntermaßen weniger stark betroffene ethnische Gruppen wie Asiaten oder Lateinamerikaner steigende Inzidenzzahlen zeigen, wenn sie in Gebiete ziehen, die traditionell hohe Inzidenzraten aufweisen, unterstützt diese Hypothese (Hou 2009, Joossens 2007). Auch eine geringere Sonnenexposition und damit verbundener Vitamin-D-Mangel könnte zu diesem Nord-Süd-Gefälle in der Erkrankungsprävalenz beitragen.

Die folgende Tabelle soll einen Überblick über diskutierte externe Faktoren der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen geben. Allerdings ist die Studienlage dazu in vielen Fällen nicht eindeutig.

Rauchen

- Positive Assoziation mit einer Erhöhung des Erkrankungsrisikos um das Zweifache bei Morbus Crohn, reziprok zur Colitis ulcerosa
 - Morbus Crohn:
 - Erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines klinischen, chirurgischen und endoskopischen Rückfalls
 - Größere Schwere des klinischen und endoskopischen Rezidivs
 - Höheres Operationsrisiko bereits nach kurzem Krankheitsverlauf
 - Ungünstige Effekte auf den Steroid- und Immunsuppressionsbedarf sowie die Infliximab-Therapie
 - Progression des entzündlichen Verlaufs zu stenosierender und fistulierender Manifestation; mehr Fisteln und Abszesse
 - Osteoporose-Risikofaktor bei Frauen
 - Rückläufigkeit dieser Trends nach Aufgabe des Rauchens
 - Die Rolle des Passivrauchens ist noch nicht hinreichend geklärt
-

Orale Kontrazeptiva

- Widersprüchliche Studienlage und somit allenfalls ein geringer Risikofaktor
 - Keine signifikante Beeinflussung der Krankheitsaktivität
 - Die ohnehin bestehende Hyperkoagulabilität bei aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung wird verstärkt und somit das Auftreten thromboembolischer Ereignisse noch weiter begünstigt
 - Die thrombogenen Eigenschaften der oralen Kontrazeptiva suggerieren eine pathogenetische Mitwirkung über multifokale mikrovaskuläre gastrointestinale Infarkte
 - Erhöhtes Risiko für CED bei Langzeiteinnahme in Dosisabhängigkeit bzw. bei Einnahme von Höchstdosis-Östrogen-Präparaten in einigen Studien
-

NSAR

- Weniger zweifelhafte Studienlage als bei den oralen Kontrazeptiva
 - NSAR-Gebrauch ist klar mit einem höheren Risiko für CED verbunden, insbesondere besteht die Gefahr eines klinischen Rückfalls bei bereits Erkrankten
-

Diätetische Faktoren

- Bislange ist eine Assoziation zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Diät-Komponenten nicht sicher bewiesen
 - Raffinierter Zucker, Schokolade, Cola, Margarine, Cornflakes, Kaugummi, Zahnpasta, Fette sind u.a. als potentielle diätetische Risikofaktoren untersucht worden, ohne einen schlüssigen Beleg für die Bedeutung diätetischer Faktoren liefern zu können
 - Mögliche protektive Wirkung von Früchten, insbesondere Zitrusfrüchten, Gemüse und Fasern
 - Ernährungstherapieversuche zeigen sich weniger effektiv als traditionelle Therapieansätze
-

Mikroorganismen

- Hygiene-Hypothese („Sheltered Child“): niedrige Inzidenz in Entwicklungsländern mit höherem Risiko für intestinale Infektionen; gute häusliche Hygiene, separate Toilette, Warmwasserleitung, Swimming-Pool-Benutzung, Kleinfamilien als Risikofaktoren durch fehlenden Trainingseffekt
 - Infektionshypothese: Es sind immer wieder bestimmte Keime in der Diskussion, insbesondere intrazellulär vorkommende Erreger wie Mykobakterien. Bislange konnte aber kein bestimmtes kausales Pathogen identifiziert werden. Eine Reihe von Argumenten sprechen sogar gegen ein spezifisches infektiöses Pathogen (Shanahan 2004). Weiterhin wird die Beteiligung von Masern und anderen Viren, Yersinien und Listerien an der Entwicklung von CED diskutiert, nicht zuletzt, weil sie zum Teil Zielobjekte für den Autophagieprozess darstellen (Sumpter 2010). Allerdings konnte ein sicherer Zusammenhang bisher nicht bestätigt werden (Baumgart 2012).
 - Auch für in diesem Kontext untersuchte Impfungen (z.B. Masern-Mumps-Röteln und BCG*-Impfung) konnte keine eindeutige kausale Bedeutung festgestellt werden
-

-
- Die Beteiligung der normalen kommensalen Mikroflora tritt im Rahmen des multifaktoriellen Entstehungskonzepts immer weiter in den Vordergrund (Shanahan 2004)
-

Appendektomie

- Positive Assoziation zu Morbus Crohn, protektiv bei Colitis ulcerosa
 - Eine Appendektomie nach einer perforierten Appendizitis scheint nach Ausbruch der Erkrankung einen aggressiveren Verlauf nach sich zu ziehen als bei Appendektomien aus anderen Gründen
-

Stillen

Inverse Assoziation des Stillen zu Morbus Crohn; frühes Abstillen als möglicher Risikofaktor mit geringer Evidenz

*BCG = *Bacille Calmette-Guérin* (Tuberkulose-Impfstoff)

Tabelle 4: Untersuchte exogene Risikofaktoren nach Staudinger 2008 (Birrenbach 2004, Calkins 1989, Bernstein 2007, Danese 2004, Fellermann 2003, Fiocchi 1998, Kirsner 2001, Loftus 2004, Rousseau 2008, Rutgeerts 2004, Thomas 1998, Timmer 2003)

1.2.2 Das intestinale Immunsystem

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen Fehlfunktionen im intestinalen Immunsystem. Zu den diskutierten Komponenten gehören dabei im Wesentlichen eine übermäßige Aktivierung und fehlende Gegenregulationsmechanismen der Immunantwort sowie Defekte in der Barrierefunktion der Darmschleimhaut (Mashimo 1996, Schmitz 1999).

Im mukosalen Immunsystem findet ein komplexes Zusammenspiel von residenter Flora, Darmepithel, Zytokinen, Lymphozyten und dendritischen Zellen statt, das bei Gesundheit ein ausgeglichenes Verhältnis hat. Seine Aufgabe besteht in der Abwehr schädlicher Umwelteinflüsse wie pathogener Bakterien, wichtig dabei ist jedoch gleichermaßen die Toleranz gegenüber unschädlichen Bestandteilen des Darminhaltes wie der physiologischen bakteriellen Flora oder Antigenen aus der Nahrung. Das Resultat ist gewissermaßen eine physiologische Hyporeagibilität des intestinalen Immunsystems. Kommt es durch Fehlregulierungen zu einem Ungleichgewicht in diesem System, kann ein Überwiegen von proinflammatorischen Prozessen und gleichzeitig mangelnder antiinflammatorischer Gegenregulation zu Entzündungen der Mukosa führen, wodurch sich eine CED entwickeln kann.

Die äußerste Abwehrschicht des intestinalen Immunsystems stellt ein einschichtiges Epithel dar, das mit einem von Goblet-Zellen produzierten Schleimfilm (Mucin) überzogen ist. In diesem Epithel ist bei CED-Patienten eine stärkere Durchsetzung mit Bakterien nachweisbar

als bei Gesunden (Moussata 2011). Eine im entzündeten ilealen Epithel bei Morbus Crohn-Patienten herabgesetzte Expression des Mucin-Gens *MUC1* lässt auf eine insuffiziente Mucin-Bildung schließen (Buisine 1999). Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) gestützt, die *MUC1*, *MUC19* und *PTGER4* (Prostaglandin Rezeptor EP4) mit der Erkrankung in Verbindung bringen (Franke 2010). Die epitheliale Barriere ist normalerweise durch Tight Junctions zwischen den Zellen abgedichtet. Diese werden bei Morbus Crohn durchlässig (Söderholm 2002), wodurch luminal Antigenen zur Lamina propria durchdringen können, die ihrerseits dicht mit Immunzellen besetzt ist. In *In-vitro*- und Tierstudien (Clayburgh 2005, Marchiando 2010, Weber 2010) werden Tight-junction-Proteine mit T-Zell-Aktivierung, TNF- α (Barreau 2010, Weber 2010) und Interferon- γ (Clayburgh 2005) sowie der Erkennung kommensaler Bakterien durch NOD2 (Barreau 2010) in Verbindung gebracht.

In den letzten Jahren sind die Vorgänge in den hochspezialisierten Paneth-Zellen stärker in den Fokus der CED-Forschung gerückt. Sie schützen das Epithel durch Exkretion antimikrobieller Peptid-Granula und regulieren auf diese Weise die Zusammensetzung der kommensalen Flora (Salzman 2010) und können die Überschreitung der epithelialen Grenze durch intestinale Mikroben begrenzen (Stappenbeck 2010). In Tierstudien werden Paneth-Zell-Fehlfunktion und ileale Entzündung mit *XBPI*- und *NOD2*-Polymorphismen in Verbindung gebracht (Biswas 2010, Kaser 2008). Nicht zuletzt scheinen Störungen im Autophagie-Prozess der Paneth-Zellen bei der Entstehung der CED beteiligt zu sein. (Cadwell 2009, Cadwell 2010b, Conway 2013, Lassen 2014b, Stappenbeck 2010, siehe Kapitel Autophagie)

In der Lamina propria und durch die intraepithelialen Zwischenräume hindurch werden Mikrobiota-assoziierte molekulare Bausteine wie Lipopolysaccharide (LPS), Muramyl-Dipeptide, Lipoteichonsäure, einzel- und doppelsträngige RNA und methylierte DNA (CpG), sowie luminal Nahrungsbestandteile durch verschiedene Zellen des angeborenen Immunsystems mittels Pattern-Recognition-Receptors (PRR) wie Toll-like-Receptors (TLR) oder Nucleotide binding Domain (NOD) like Receptors (NLR) erkannt. Dendritische Zellen und Makrophagen bilden die meisten PRR-Typen aus und vermitteln nach Auswertung der mikrobiellen Antigenen über weitere Immunzellen wahlweise eine Toleranz- oder Abwehrreaktion. Durch die Ausbildung transepithelialer Dendriten sind Makrophagen in der Lage, direkten Kontakt mit luminalen Antigenen herzustellen (Niess 2005). Verteilung (Baumgart 2011) und Phänotyp (Baumgart 2011, Baumgart 2009) der dendritischen Zellen korrelieren mit der Morbus Crohn-Aktivität (Baumgart 2005). Ihre Fähigkeit,

toleranzvermittelnde T_{reg}-Zellen zu induzieren, scheint bei Morbus Crohn beeinträchtigt zu sein (Iliev 2009).

Zytosolische NLR sind wichtige PRRs. Polymorphismen des NLR-Vertreters *NOD2* sind bekanntermaßen stark mit Morbus Crohn verknüpft (Franke 2010). Mit diesen wird eine abgeschwächte Zytokin-Antwort auf Muramyl-Dipeptide (van Heel 2005b) und eine uneffektive Autophagie (Cooney 2010) in Verbindung gebracht.

In der Pathogenese von Morbus Crohn geht man auch von einer überschießenden Immunantwort von T-Helferzellen 1 (Th1-Zellen) aus. Diese wird durch IL-12-bildende antigenpräsentierende Zellen induziert und ist gekennzeichnet durch die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Die Folge ist eine Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen mit gesteigerter Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine, wodurch unter anderem Matrix-Metallo-Proteinasen aktiviert werden, die zu lokaler Entzündung und Gewebedestruktionen führen (Shanahan 2002). Auch Th17-Zellen scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Sie exprimieren den IL-23-Rezeptor (IL-23R) an ihrer Oberfläche und produzieren unter dem Einfluss von IL-23 die proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-26 (Cho 2007, Elson 2007, Yen 2006). Bestimmte Polymorphismen des *IL23R* sind mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa assoziiert (Duerr 2006, Glas 2007).

Aktiviert T-Zellen werden üblicherweise durch zwei Mechanismen kontrolliert, die beide bei Morbus Crohn gestört zu sein scheinen. Zum einen soll die Immunantwort durch das Zusammenwirken von Effektor- und Suppressorzellen im Gleichgewicht gehalten werden. Man vermutet, dass Suppressorzellen autoimmune Reaktionen verhindern, zu ihrer Aktivierung allerdings die Zytokine IL-10 und TGF- β sowie das CTLA-4-Antigen benötigen. Durch die Anwesenheit von Th1-Zellen wird die Anzahl der Suppressorzellen verringert. Zum anderen findet eine Kontrolle der T-Zellen über den programmierten Zelltod, die Apoptose, statt. Man nimmt an, dass auch dieser Mechanismus, bei dem IL-6 und IL-12 eine wichtige Rolle spielen, bei Morbus Crohn gestört ist, und die T-Zellen die Entzündung weiter aufrechterhalten (Shanahan 2002).

In den beiden folgenden Abbildungen sind die komplexen Vorgänge im intestinalen Immunsystem beim Gesunden und anschließend bei Morbus Crohn dargestellt. (Baumgart 2012)

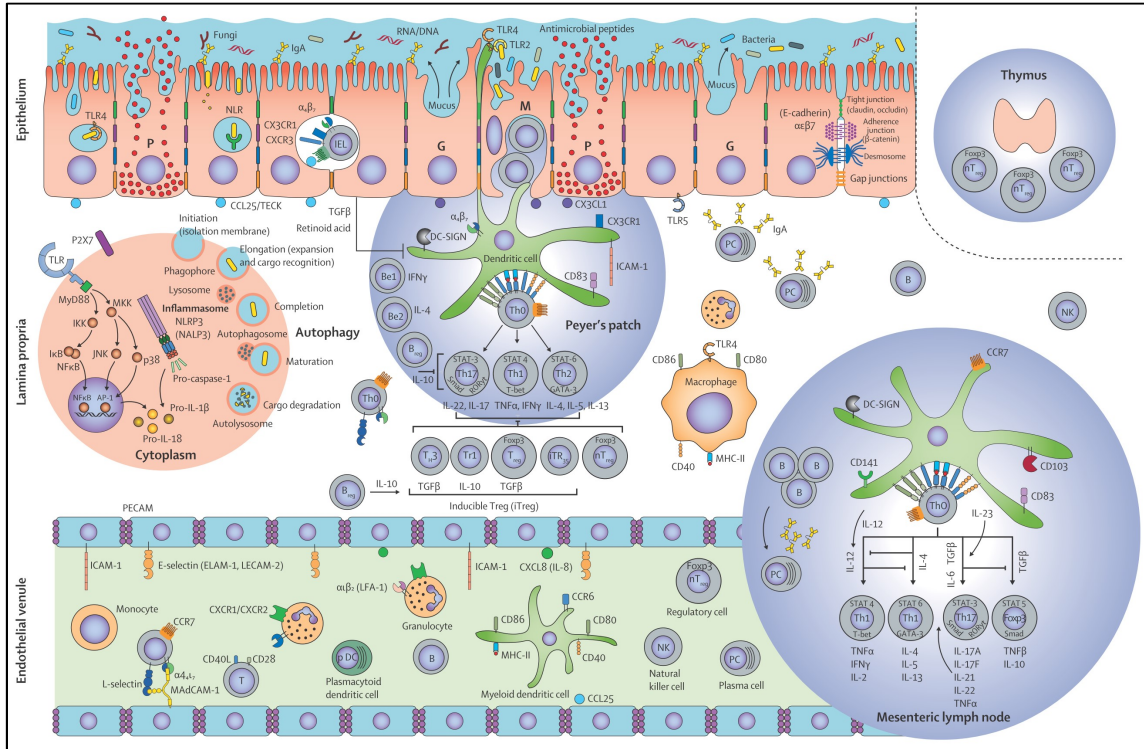


Abbildung 1: Funktionelles Schema zum gesunden intestinalen Immunsystem, Abbildung aus Baumgart et al. (Baumgart 2012). Antigene werden aus dem Darmlumen über M-Zellen des Follikel-assoziierten Epithels unverändert resorbiert, in den darunter liegenden Follikeln über antigenpräsentierende Zellen der Peyerschen Plaques prozessiert und der spezifischen Immunabwehr präsentiert. Es kommt zur Stimulierung von naiven T-Zellen, die unter dem Einfluss von Zytokinen, unter anderem IL-23, IL-4 und IFN- γ , aktiviert werden und zu reifen T-Zellen differenzieren (Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen). Durch intestinale Epithelzellen werden zusätzlich Antigene resorbiert, welche über MHC-II Moleküle zur T-Zell-Aktivierung an ihrer Oberfläche präsentiert werden. B=B-Zelle. B_c=B-Effektor-Zelle. B_{reg}=regulatorische B-Zelle. CD=cluster of differentiation. G=Goblet-Zelle. IFN=Interferon. Ig=Immunglobulin. IL=Interleukin. IEL=Intraepitheliale Lymphozyten. M=M-Zelle (microfold cell). NF κ B=Nuclear Factor κ B. NK=Natürliche Killerzelle. NLR=Nucleotide binding domain like receptor. p38=p38 mitogen-activated protein kinases. P=Paneth-Zelle. PC=Plasmazelle. T=T-Zelle. nT_{reg}=Natürliche regulatorische T-Zellen. iT_{reg}=induzierbare regulatorische T-Zellen. T_{reg}= regulatorische T-Zellen. TGF β =transforming growth factor β . Th=T-Helfer-Zelle. TNF α =Tumornekrosefaktor α . TLR=Toll-like-Receptor.

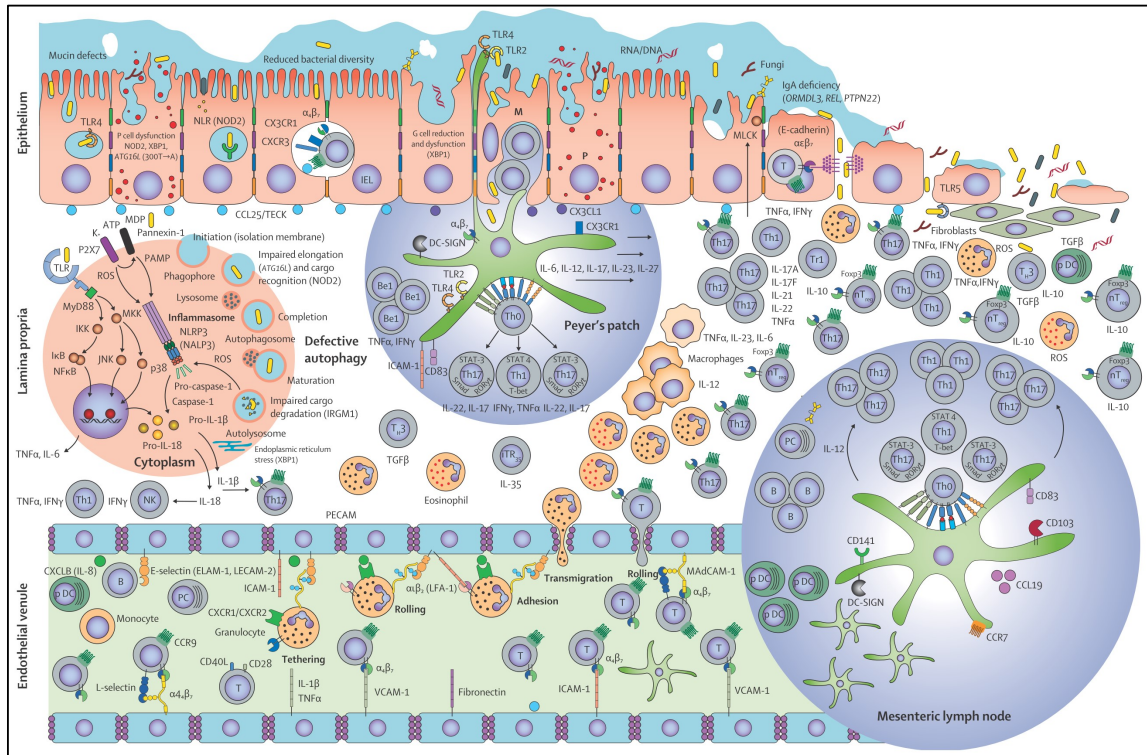


Abbildung 2: Das intestinale Immunsystem bei Morbus Crohn, Abbildung aus Baumgart et al. (Baumgart 2012). Weitere Erläuterungen siehe Text. B=B-Zelle. B_c=B-Effektor-Zelle. B_{reg}=regulatorische B-Zelle. CD=cluster of differentiation. G=Goblet-Zelle. IFN=Interferon. Ig=Immunglobulin. IL=Interleukin. IEL=Intraepitheliale Lymphozyten. M=M-Zelle (microfold cell). MDP=Muramyldipeptid. NFκB=Nuclear Factor κB. NK=Natürliche Killerzelle. NLR=Nucleotide binding domain like receptor. NOD2=Nucleotide-binding Oligomerization Domain. p38=p38 mitogen-activated protein kinases. P=Paneth-Zelle. PC=Plasmazelle. T=T-Zelle. nT_{reg}=Natürliche regulatorische T-Zellen. iT_{reg}=induzierbare regulatorische T-Zellen. T_r=regulatorische T-Zellen. TGFβ=transforming growth factor β. Th=T-Helfer-Zelle. TNFα=Tumornekrosefaktor α. TLR=Toll-like-Receptor.

Die Immunreaktion bei Colitis ulcerosa entspricht einer atypischen Th2-Antwort, die durch die Produktion der Zytokine IL-5, IL-13 und TGF-β, jedoch nicht IL-4, gekennzeichnet ist. Sie löst im Unterschied zu Morbus Crohn eine eher oberflächliche Schleimhautentzündung aus. Weiterhin werden IL-6 und EBI₃, ein Zytokin mit IL-12-antagonisierender Wirkung, ausgeschüttet. Die gesteigerte Produktion von Th2-assoziierten Zytokinen wie IL-5 könnte u.a. für die B-Zell-Aktivierung verantwortlich sein und zur Bildung von Autoantikörpern führen (Farrell 2002, Holtmann 2002, Podolsky 2002, Shanahan 2002). IL-13 gilt in aktuellen Studien als zentraler Vermittler der Entzündungsreaktion bei Colitis ulcerosa und wird als Mediator der intestinalen Epithelschädigung gesehen (Fuss 2004, Heller 2008, Kawashima 2011, Mannon 2011).

1.2.3 Intestinale Mikrobiota

Auch intestinale Mikrobiota spielt in der Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine wichtige Rolle. So wurde bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn eine signifikante Reduktion anaerober Bakterien und Laktobazillen nachgewiesen (Fiocchi 1998). Des Weiteren trat in einer Studie von *IL10*-Knockout-Mäusen, die in steriler Umgebung gehalten wurden, keine Kolitis auf, während es bei den Vergleichstieren zu einem sehr schnellen Krankheitsverlauf kam. Zudem hatte eine frühzeitige Antibiotikatherapie der Knockout-Mäuse einen protektiven Effekt auf die spätere Entwicklung einer Kolitis (Madsen 2001).

1.2.4 Genetische Faktoren

Dass es in der Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine erbliche Komponente gibt, legen viele Beobachtungen nahe (Bonen 2003). Eine erste Untersuchung zum familiär gehäuften Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wurde bereits 1963 von Kirsner veröffentlicht (Ahmad 2001, Kirsner 1963). Sie beschrieb ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Angehörige der Betroffenen, insbesondere ersten Grades, während für Ehepartner das Risiko gering war. Insgesamt weisen 5 bis 32 % der Erkrankungsfälle eine positive Familienanamnese auf (Ahmad 2001, Monsén 1991, Orholm 1991, Russel 1997). Umgekehrt scheint für Verwandte im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 14- bis 15-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko zu bestehen (Bonen 2003). Nicht blutsverwandte Familienmitglieder wie Ehepartner oder Adoptivkinder weisen hingegen keine erhöhte Prävalenz auf (Ahmad 2001, Orholm 1991, Tamboli 2003, Tysk 1988). Diese Erkenntnisse machen einen alleinigen Einfluss von Umweltfaktoren auf die Krankheitsentstehung unwahrscheinlich und sprechen für die Bedeutung endogener Komponenten.

Deutliche weltweite Unterschiede zwischen Bevölkerungsgruppen und Rassen in Prävalenz und Inzidenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind zwar wiederholt beschrieben worden, werden allerdings kontrovers diskutiert. Wie bereits erwähnt, können diese epidemiologischen Unterschiede auch auf divergierende Lebensgewohnheiten zurückgeführt werden (Bonen 2003, Loftus 2004). Weitaus mehr Aussagekraft haben die nachgewiesenen Assoziationen mit anderen Erkrankungen mit bekanntem genetischem Hintergrund, Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen und die Tatsache, dass eineiige Zwillinge bezüglich ihres Risikos, eine CED zu entwickeln, eine deutlich größere Übereinstimmung aufweisen als zweieiige Zwillingspaare (Bonen 2003, de Vlam 2000,

Kinouchi 2005, Newman 2005, Vermeire 2005).

Angesichts dieser Hinweise ist ein genetischer Einfluss auf die Ätiopathogenese als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Es ist bereits gelungen, einzelne veränderte Gene als alleinige Ursache für monogenetische Formen einer CED ausfindig zu machen: Eine *IL10R*-Mutation führt beispielsweise zur Erkrankung bei Kindern (Glocker 2009). In den meisten Fällen jedoch gibt es eine Vielzahl von genetischen Einflussgrößen, die auf komplexe genetische Zusammenhänge im Sinne einer polygenen Vererbung sowie Interaktionen zwischen verschiedenen Genmutationen einerseits und exogenen Faktoren andererseits schließen lassen.

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche GWAS zur Identifikation von CED-Loci und Suszeptibilitätsgenen durchgeführt. In der von Jostins et al. veröffentlichten Studie wurde die Zahl der CED-assoziierten Loci auf 163 erhöht (Jostins 2012), Liu et al. fügten 2015 weitere 38 hinzu (Liu 2015), wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist.

Chr	Position (Mb)	SNP	Source(s)	Type	Candidate Gene(s) ^d
1	1.24	rs12103	Jostins et al ^b	IBD	TNFRSF18,TNFRSF4,(30)
1	2.5	rs10797432	Jostins et al	UC	TNFRSF14,MMEL1,PLCH2,(8)
1	8.02	rs35675666	Jostins et al	IBD	TNFRSF9,(6)
1	20.15	rs6426833	Jostins et al	UC	(9)
1	22.7	rs12568930	Jostins et al	IBD	(3)
1	63.05	rs1748195	Liu et al ^c	CD	USP1
1	67.68	rs11209026	Jostins et al	IBD	IL23R,IL12RB2,(4)
1	70.99	rs2651244	Jostins et al	IBD	(3)
1	78.62	rs17391694	Jostins et al	CD	(5)
1	92.55	rs34856868	Liu et al	IBD	BTBD8
1	101.47	rs11583043	Liu et al	UC	SLC30A, EDG1
1	114.3	rs6679677	Jostins et al	CD	PTPN22,DCLRE1B,(7)
1	120.45	rs3897478	Jostins et al	CD	ADAM30,(5)
1	151.79	rs4845604	Jostins et al	IBD	RORC,(14)
1	155.67	rs670523	Jostins et al	IBD	UBQLN4,RIT1,MSTO1,(28)
1	160.85	rs4656958	Jostins et al	IBD	CD48,SLAMF1,ITLN1,CD244,F11R,USF1,SLAMF7,ARHGAP30,(8)
1	161.47	rs1801274	Jostins et al	IBD	FCGR2A,FCGR2B,FCGR3A,HSPA6,FCGR3B,FCRLA,(9)
1	169.52	rs6025	Liu et al	IBD	SELP, SELE, SELL
1	172.85	rs9286879	Jostins et al	CD	FASLG,TNFSF18,(0)
1	186.88	rs10798069	Liu et al	CD	PTGS2, PLA2G4A
1	197.6	rs2488389	Jostins et al	IBD	C1orf53,(2)
1	198.6	rs7555082	Liu et al	CD	PTPRC
1	200.09	rs2816958	Jostins et al	UC	(3)
1	200.87	rs7554511	Jostins et al	IBD	KIF21B,(6)
1	206.93	rs3024505	Jostins et al	IBD	IL10,IL20,IL19,IL24,PIGR,MAPKAPK2,FAIM3,RASSF5,(3)
2	25.12	rs6545800	Jostins et al	IBD	ADCY3,(6)
2	27.63	rs1728918	Jostins et al	CD	UCN,(23)
2	28.61	rs925255	Jostins et al	IBD	FOSL2,BRE,(1)
2	43.81	rs10495903	Jostins et al	IBD	(5)
2	61.2	rs7608910	Jostins et al	IBD	REL,C2orf74,KIAA1841,AHSA2,(6)
2	62.55	rs10865331	Jostins et al	CD	(3)
2	65.67	rs6740462	Jostins et al	IBD	SPRED2,(1)
2	102.86	rs917997	Jostins et al	IBD	IL1R2,IL18RAP,IL18R1,IL1R1,IL1RL1,IL1RL2,(3)
2	145.49	rs11681525	Liu et al	CD	-
2	160.79	rs4664304	Liu et al	IBD	MARCH7, LY75, PLA2R1
2	163.1	rs2111485	Jostins et al	IBD	IFIH1,(5)
2	191.92	rs1517352	Jostins et al	IBD	STAT1,STAT4,(2)
2	198.65	rs1016883	Jostins et al	UC	RFTN2,PLCL1,(7)
2	199.7	rs17229285	Jostins et al	UC	0
2	204.59	rs3116494	Liu et al	UC	ICOS, CD28, CTLA4
2	219.14	rs2382817	Jostins et al	IBD	SLC11A1,CXCR2,CXCR1,PNKD,ARPC2,TMBIM1,CTDSP1,(8)
2	228.66	rs111781203	Liu et al	IBD	CCL20
2	231.09	rs6716753	Jostins et al	CD	SP140,(5)
2	234.145	rs12994997	Jostins et al	CD	ATG16L1, INPP5D, (7)
2	241.57	rs3749171	Jostins et al	IBD	GPR35,(12)
2	242.74	rs35320439	Liu et al	CD	PDCD1, ATG4B
3	18.76	rs4256159	Jostins et al	IBD	0
3	46.46	rs113010081	Liu et al	UC	FLJ78302, LTF, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
3	48.96	rs3197999	Jostins et al	IBD	MST1,PFKFB4,MST1R,UCN2,GPX1,IP6K2,BSN,IP6K1,USP4,(56)
3	53.05	rs9847710	Jostins et al	UC	PRKCD,ITIH4,(8)
3	101.57	rs616597	Liu et al	UC	NFKBIZ
3	141.11	rs724016	Liu et al	CD	-
4	3.44	rs2073505	Liu et al	IBD	HGFAC
4	26.13	rs4692386	Liu et al	IBD	-
4	38.33	rs6856616	Liu et al	IBD	-
4	48.36	rs6837335	Jostins et al	CD	TXK,TEC,SLC10A4,(3)
4	74.85	rs2472649	Jostins et al	IBD	CXCL5,CXCL1,CXCL3,IL8,CXCL6,PF4,CXCL2,PF4V1,(3)
4	102.86	rs13126505	Jostins et al	CD	(1)
4	103.51	rs3774959	Jostins et al	UC	NFKB1,MANBA,(2)
4	106.08	rs2189234	Liu et al	UC	-
4	123.22	rs7657746	Jostins et al	IBD	IL2,IL21,(2)

Chr	Position (Mb)	SNP	Source(s)	Type	Candidate Gene(s) ²
5	0.59	rs11739663	Jostins et al	UC	SLC9A3,(8)
5	10.69	rs2930047	Jostins et al	IBD	DAP,(2)
5	38.87	rs395157	Liu et al	IBD	OSMR, FYB, LIFR
5	40.38	rs11742570	Jostins et al	IBD	PTGER4,(1)
5	55.43	rs10065637	Jostins et al	CD	IL6ST,IL31RA,(1)
5	71.69	rs4703855	Liu et al	IBD	-
5	72.54	rs7702331	Jostins et al	CD	(4)
5	96.24	rs1363907	Jostins et al	IBD	ERAP2,ERAP1,LNPEP,(2)
5	130.005	rs4836519	Jostins et al	IBD	(1)
5	131.19	rs2188962	Jostins et al	IBD	IRF1,IL13,CSF2,SLC22A4,IL4,IL3,IL5,PDLIM4,SLC22A5,ACSL6,(8)
5	134.44	rs254560	Jostins et al	UC	(6)
5	141.51	rs6863411	Jostins et al	IBD	SPRY4,NDFIP1,(5)
5	150.27	rs11741861	Jostins et al	IBD	TNIP1,IRGM,ZNF300P1,(8)
5	158.8	rs6871626	Jostins et al	IBD	IL12B,(3)
5	172.32	rs564349	Liu et al	IBD	C5orf4, DUSP1
5	173.34	rs17695092	Jostins et al	CD	CPEB4,(2)
5	176.79	rs12654812	Jostins et al	IBD	DOK3,(17)
6	0.38	rs7773324	Liu et al	CD	IRF4, DUSP22
6	3.42	rs13204048	Liu et al	CD	-
6	14.71	rs17119	Jostins et al	IBD	0
6	20.77	rs9358372	Jostins et al	IBD	(2)
6	21.42	rs12663356	Jostins et al	CD	(3)
6	31.27	rs9264942	Jostins et al	CD	HLA-C,PSORS1C1,NFKBIL1,MICB,(18)
6	32.595	rs6927022	Jostins et al	UC	HLA-DQB1,HLA-DRB1,HLA-DQA1,HLA-DRA,(12)
6	90.96	rs1847472	Jostins et al	IBD	(1)
6	106.43	rs6568421	Jostins et al	IBD	(2)
6	111.82	rs3851228	Jostins et al	IBD	TRAF3IP2,FYN,REV3L,(2)
6	127.45	rs9491697	Jostins et al	CD	(3)
6	128.24	rs13204742	Jostins et al	CD	(2)
6	138	rs6920220	Jostins et al	IBD	TNFAIP3,(1)
6	143.9	rs12199775	Jostins et al	IBD	PHACTR2,(5)
6	149.58	rs7758080	Liu et al	CD	MAP3K7IP2
6	159.49	rs212388	Jostins et al	CD	TAGAP,(5)
6	167.37	rs1819333	Jostins et al	IBD	CCR6,RPS6KA2,RNASET2,(3)
7	2.78	rs798502	Jostins et al	UC	CARD11,GNA12,TTYH3,(4)
7	17.44	rs1077773	Liu et al	UC	AHR
7	27.22	rs4722672	Jostins et al	UC	(14)
7	28.17	rs864745	Jostins et al	CD	CREB5,JAZF1,(1)
7	50.245	rs1456896	Jostins et al	IBD	ZPBP,IKZF1,(4)
7	98.75	rs9297145	Jostins et al	IBD	SMURF1,(6)
7	100.335	rs1734907	Jostins et al	IBD	EPO,(21)
7	107.45	rs4380874	Jostins et al	UC	DLD,(9)
7	116.89	rs38904	Jostins et al	IBD	(6)
7	128.57	rs4728142	Jostins et al	UC	IRF5,TNPO3,TSPAN33,(11)
7	148.22	rs2538470	Liu et al	IBD	CNTNAP2
7	26.88	rs10486483	Jostins et al	CD	(2)
8	27.23	rs17057051	Liu et al	IBD	PTK2B, TRIM35, EPHX2
8	49.13	rs7011507	Liu et al	UC	-
8	90.87	rs7015630	Jostins et al	CD	RIPK2,(4)
8	126.53	rs921720	Jostins et al	IBD	TRIB1,(1)
8	129.56	rs6651252	Jostins et al	CD	0
8	130.62	rs1991866	Jostins et al	IBD	(2)
9	4.98	rs10758669	Jostins et al	IBD	JAK2,(4)
9	93.92	rs4743820	Jostins et al	IBD	NFIL3,(2)
9	117.6	rs4246905	Jostins et al	IBD	TNFSF8,TNFSF15,TNC,(2)
9	139.32	rs10781499	Jostins et al	IBD	CARD9,PMPCA,SDCCAG3,INPP5E,(19)
10	6.08	rs12722515	Jostins et al	IBD	IL2RA,IL15RA,(6)
10	30.72	rs1042058?	Jostins et al	IBD	MAP3K8,(3)
10	35.295	rs11010067	Jostins et al	IBD	CREM,(3)
10	59.99	rs2790216	Jostins et al	IBD	CISD1,IPMK,(2)
10	64.51	rs10761659	Jostins et al	IBD	(3)

Chr	Position (Mb)	SNP	Source(s)	Type	Candidate Gene(s) [#]
10	75.67	rs2227564	Jostins et al	IBD	(13)
10	81.03	rs1250546	Jostins et al	IBD	(5)
10	82.25	rs6586030	Jostins et al	IBD	TSPAN14,C10orf58,(4)
10	94.43	rs7911264	Jostins et al	IBD	(4)
10	101.28	rs4409764	Jostins et al	IBD	NKX2-3,(6)
10	104.23	rs3740415	Liu et al	IBD	NFKB2, TRIM8, TMEM180
11	1.87	rs907611	Jostins et al	IBD	TNNI2,LSP1,(17)
11	58.33	rs10896794	Jostins et al	IBD	CNTF,LPXN,(8)
11	60.77	rs11230563	Jostins et al	IBD	CD6,CD5,PTGDR2,(12)
11	61.56	rs4246215	Jostins et al	IBD	C11orf9,FADS1,FADS2,(12)
11	64.12	rs559928	Jostins et al	IBD	CCDC88B,RPS6KA4,TRPT1,FLRT1,(20)
11	65.65	rs2231884	Jostins et al	IBD	RELA,FOSL1,CTSW,SNX32,(22)
11	76.29	rs2155219	Jostins et al	IBD	(5)
11	96.02	rs483905	Jostins et al	UC	JRKL,MAML2,(2)
11	114.38	rs561722	Jostins et al	UC	FAM55A,FAM55D,(5)
11	118.74	rs630923	Jostins et al	IBD	CXCR5,(17)
12	6.49	rs7954567	Liu et al	CD	CD27, TNFRSF1A, LTBR
12	12.65	rs11612508	Jostins et al	IBD	LOH12CR1,(8)
12	40.77	rs11564258	Jostins et al	IBD	LRRK2,MUC19
12	48.2	rs11168249	Jostins et al	IBD	VDR,(8)
12	68.49	rs7134599	Jostins et al	IBD	IFNG,IL26,IL22,(1)
12	112.01	rs653178	Liu et al	IBD	SH2B3, ALDH2, ATXN2
12	120.15	rs11064881	Liu et al	IBD	PRKAB1
13	27.52	rs17085007	Jostins et al	IBD	(2)
13	40.86	rs941823	Jostins et al	IBD	(3)
13	43.02	rs9525625	Liu et al	CD	AKAP1, TFSF11
13	44.45	rs3764147	Jostins et al	CD	LACC1,(3)
13	99.95	rs9557195	Jostins et al	IBD	GPR183,GPR18,(6)
14	69.27	rs194749	Jostins et al	IBD	ZFP36L1,(4)
14	75.7	rs4899554	Jostins et al	IBD	FOS,MLH3,(6)
14	88.47	rs8005161	Jostins et al	IBD	GPR65,GALC,(1)
15	38.89	rs16967103	Jostins et al	CD	RASGRP1,SPRED1,(2)
15	41.55	rs28374715	Jostins et al	UC	ITPKA,NDUFAF1,NUSAP1,(8)
15	67.43	rs17293632	Jostins et al	IBD	SMAD3,(2)
15	91.17	rs7495132	Jostins et al	IBD	CRTC3,(3)
16	11.54	rs529866	Jostins et al	IBD	SOCS1,LITAF,RMI2,(10)
16	23.86	rs7404095	Jostins et al	IBD	PRKCB,(5)
16	28.595	rs26528	Jostins et al	IBD	RABEP2,IL27,EIF3C,SULT1A1,SULT1A2,NUPR1,(9)
16	30.47	rs11150589	Jostins et al	UC	ITGAL,(20)
16	50.66	rs2066847	Jostins et al	CD	NOD2,ADCY7,(5)
16	68.58	rs1728785	Jostins et al	UC	ZFP90,(6)
16	86	rs10521318	Jostins et al	IBD	IRF8,(4)
17	25.84	rs2945412	Jostins et al	CD	LGALS9,NOS2,(3)
17	32.59	rs3091316	Jostins et al	IBD	CCL13,CCL2,CCL11,(4)
17	37.91	rs12946510	Jostins et al	IBD	IKZF3,ZPBP2,GSDMB,ORMDL3,GSDMA,(12)
17	40.53	rs12942547	Jostins et al	IBD	STAT3,STAT5B,STAT5A,(13)
17	54.88	rs3853824	Liu et al	CD	-
17	57.96	rs1292053	Jostins et al	IBD	TUBD1,RPS6KB1,(9)
17	70.64	rs7210086	Jostins et al	UC	(3)
17	76.74	rs17736589	Liu et al	UC	-
18	12.8	rs1893217	Jostins et al	IBD	(6)
18	46.39	rs7240004	Jostins et al	IBD	SMAD7,(2)
18	56.88	rs9319943	Liu et al	CD	-
18	67.53	rs727088	Jostins et al	IBD	CD226,(2)
18	77.22	rs7236492	Liu et al	CD	NFATC1, TST
19	1.12	rs2024092	Jostins et al	CD	GPX4,HMHA1,(20)
19	10.49	rs11879191	Jostins et al	IBD	TYK2,PPAN-P2RY11,ICAM1,(25)
19	33.73	rs17694108	Jostins et al	IBD	CEBPG,(8)
19	46.85	rs4802307	Jostins et al	CD	(9)
19	47.12	rs1126510	Jostins et al	UC	CALM3,(14)
19	49.2	rs516246	Jostins et al	CD	DBP,SPHK2,IZUMO1,FUT2,(22)

Chr	Position (Mb)	SNP	Source(s)	Type	Candidate Gene(s) ^a
19	55.38	rs11672983	Jostins et al	IBD	NLRP7,NLRP2,KIR2DL1,LILRB4,(15)
20	30.75	rs6142618	Jostins et al	IBD	HCK,(10)
20	31.37	rs4911259	Jostins et al	IBD	DNMT3B,(8)
20	33.8	rs6088765	Jostins et al	UC	PROCR,UQCC,CEP250,(8)
20	43.06	rs6017342	Jostins et al	UC	ADA,HNF4A,(9)
20	44.74	rs1569723	Jostins et al	IBD	CD40,MMP9,PLTP,(11)
20	48.95	rs913678	Jostins et al	IBD	CEBPB,(5)
20	57.82	rs259964	Jostins et al	IBD	ZNF831,CTSZ,(5)
20	62.34	rs6062504	Jostins et al	IBD	TNFRSF6B,LIME1,SLC2A4RG,ZGPAT,(23)
21	16.81	rs2823286	Jostins et al	IBD	0
21	34.77	rs2284553	Jostins et al	CD	IFNGR2,IFNAR1,IFNAR2,IL10RB,GART,TMEM50B,(6)
21	40.46	rs2836878	Jostins et al	IBD	(3)
21	45.62	rs7282490	Jostins et al	IBD	ICOSLG,(9)
22	21.92	rs2266959	Jostins et al	IBD	MAPK1,YDJC,UBE2L3,RIMBP3,CCDC116,(8)
22	30.425	rs2412970	Jostins et al	IBD	LIF,OSM,MTMR3,(8)
22	39.69	rs2413583	Jostins et al	IBD	ATF4,TAB1,APOBEC3G,(16)
22	41.87	rs727563	Liu et al	CD	TEF, NHP2L1, PMM1, L3MBTL2, CHADL

Abbildung 3: Durch GWAS identifizierte Morbus Crohn-, Colitis ulcerosa- und CED-assozierte Genloci, Abbildung aus McGovern et al. 2015 (McGovern 2015). Zahlen in Klammer stehen für die Anzahl zusätzlicher Gene im jeweiligen Locus.

Im folgenden Abschnitt soll eine Übersicht zu den an der Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligten Genen gegeben werden. Das CED-Suszeptibilitätsgen *ATG16L1*, das in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, wird in Abschnitt 1.3 vorgestellt.

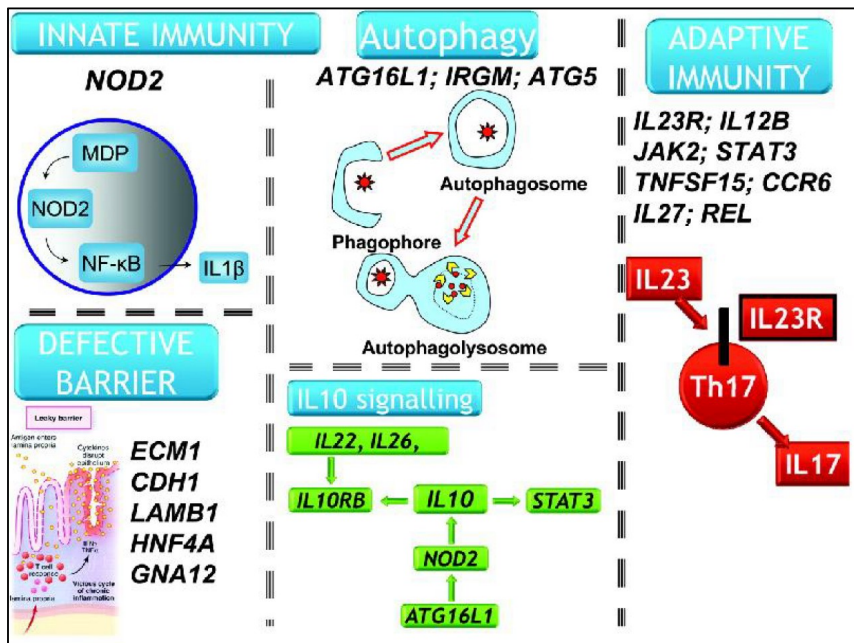


Abbildung 4: Die unterschiedlichen Signalwege der Suszeptibilitätsgene für CED, Abbildung aus Lees et al. (Lees 2011). Weitere Erläuterung siehe Text. *Innate Immunity* = angeborene Immunabwehr, *Autophagy* = Autophagie, *Adaptive Immunity* = adaptive Immunabwehr, *IL10 signalling* = IL10-Signalwege, *Defective Barrier* = gestörte Schleimhautbarriere.

1.2.4.1 *NOD2*

Das *NOD2*- (nucleotide-binding oligomerization domain 2, früher *CARD15*, caspase recruitment domain-containing protein 15) Gen ist das bisher wohl am besten erforschte Prädispositionsgen für den Morbus Crohn. Es wurde 2001 erstmals beschrieben und liegt auf Chromosom 16q12 im IBD1-Locus (Hampe 2001, Hugot 2001, Ogura 2001b). Seine Expression erfolgt in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und in Epithelzellen des Intestinaltraktes einschließlich der Paneth-Zellen (Berrebi 2003, Girardin 2003, Gutierrez 2002, Hisamatsu 2003, Inohara 2001, Inohara 2003, Ogura 2001a, Ogura 2003, Rosenstiel 2003). Das resultierende Protein besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Muramyl-dipeptid (MDP), einem Bestandteil der Zellwand sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien, und ist dadurch an der bakteriellen Abwehr beteiligt. MDP ist die kleinste bioaktive Einheit von Peptidoglykan, des Hauptbestandteils der bakteriellen Zellwand. Bei Veränderungen im *NOD2*-Gen kann die intrazelluläre Erkennung von MDP, also von bakteriellen Fragmenten, und damit die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B) (Girardin 2003, Inohara 2003) und der Generierung von bakteriziden ROS (Reactive Oxygen Species) (Lipinski 2009) beeinträchtigt sein. Die exakten Zusammenhänge zwischen *NOD2*-Varianten und der NF- κ B-Signaltransduktion sind allerdings bisher nicht vollständig geklärt. Es wird sowohl resultierender Funktionsverlust als auch erhöhte Aktivität in der Literatur beschrieben (Newman 2005). In Untersuchungen bei Europäern sind bisher 30 Mutationen im *NOD2*-Gen beschrieben worden, die bei fast 50 % der Crohn-Patienten, jedoch nur bei 20 % der gesunden Kontrollen nachgewiesen wurden (Hugot 2003, Lesage 2002). Über 80 % der beobachteten mutierten Allele machen dabei die Varianten Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC aus. Durch das Vorliegen einer dieser drei Mutationen wird das relative Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken, im Vergleich zur Normalbevölkerung verdreifacht. Sind beide *NOD2*-Allele von dieser Mutation betroffen, scheint das Risiko sogar 30- bis 40-fach erhöht zu sein (Ahmad 2002, Akolkar 2001, Bonen 2003, Cavanaugh 2003, Cuthbert 2002, Hampe 2001, Hugot 2001, Lesage 2002, Newman 2004, Ogura 2001b, Vermeire 2002). Da aber 60-70 % der Morbus Crohn-Patienten keine dieser Mutationen aufweisen, können diese drei Genveränderungen nicht allein für die Assoziation zwischen Erkrankung und dem IBD1-Locus verantwortlich gemacht werden (Abreu 2002, Ahmad 2002, Cuthbert 2002, Hampe 2002, Hugot 2002, Lesage 2002, Vermeire 2002). *NOD2* ist zusätzlich mitverantwortlich für die Initiierung des Autophagieprozesses (siehe Kapitel Autophagie).

1.2.4.2 *SLC22A4* und *SLC22A5* (*OCTN1* und *OCTN2*)

Ein weiteres Suszeptibilitätsgen für Morbus Crohn, das schon vielfach in der Literatur bestätigt worden ist, befindet sich im IBD5-Locus des Chromosom 5q31 und wird vermutlich durch die Varianten *SLC22A4* und *SLC22A5* (solute carrier family 22, member 4 bzw. 5) des *organic cation transporter* (*OCTN1* bzw. 2) repräsentiert. Im IBD5-Locus befindet sich eine Zytokin-Clusterregion, was ihn zu einem interessanten Abschnitt für die Kandidatengenanalyse chronisch entzündlicher Darmerkrankungen macht. Ob Mutationen der beiden Gene *SLC22A4* und *SLC22A5* tatsächlich für die Assoziation von IBD5 mit der Erkrankung verantwortlich sind, ist jedoch Bestandteil wissenschaftlicher Diskussionen (Noble 2005, Peltekova 2004, Török 2005).

1.2.4.3 *IL23R*

Eine weitere Assoziation mit dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen – und zwar mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa – stellten Duerr et al. 2006 mit dem *IL23R*-Gen auf Chromosom 1p31 fest, die inzwischen in verschiedenen Replikationsstudien in unabhängigen Populationen bestätigt wurde (Duerr 2006). IL-23R interagiert mit IL-23, einem Zytokin, das die Aktivität von Abwehrzellen wie Th17-Zellen reguliert und eine wichtige Rolle in der Immunantwort bei der Abwehr von Bakterien und Viren spielt (Naser 2012). Früher hatte sich die CED-Forschung im Bereich der Interleukine allerdings in erster Linie auf IL-12 konzentriert, das aus den beiden Untereinheiten p35 und p40 besteht. Im Tiermodell wurde Antikörpern, die die p40-Untereinheit neutralisieren, eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben (Neurath 1995). Das heteromere IL-23R besteht neben dem biologisch inaktiven p19- ebenfalls aus dem p40-Proteinbaustein. In Studien mit entsprechenden Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung einer chronischen Entzündung IL-23 im Vergleich zu IL-12 eine größere Rolle spielt. Des Weiteren werden durch IL-23 Th17-Zellen aktiviert, die durch die Produktion von IL-17 chronische Entzündungen vermitteln (Cho 2007, Elson 2007, Neurath 2007, Oppmann 2000, Yen 2006). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass IL-23R-produzierenden Th17-Zellen eine Schlüsselrolle im Einfluss auf die CED-Suszeptibilität zukommt (Neurath 2007).

1.2.4.4 *IRGM*

IRGM gehört zur Protein-Familie der Immunity-related Guanosine Triphosphatasen (IRG), die bei der Elimination verschiedener intrazellulärer Pathogene in vielen Säugetierorganismen beteiligt sind (Bekpen 2010 in Kabi 2012). Kürzlich wurde in mehreren Studien für zwei

unmittelbar benachbarte Polymorphismen im *IRGM*-Gen eine Assoziation mit Morbus Crohn gezeigt (Franke 2008, Jostins 2012, Palomino-Morales 2009, Parkes 2007, Roberts 2008). Eine Assoziation mit Colitis ulcerosa ist ebenfalls gezeigt worden (Franke 2008, Palomino-Morales 2009). *IRGM* ist bei der Induktion der Autophagie und der Reifung des Autophagosoms beteiligt sowie mit der Autophagosom-Membran assoziiert (MacMicking 2003, Singh 2006). Eine Reduktion der *IRGM*-Expression führte in Studien zu einem gesteigerten Überleben intrazellulärer Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* oder dem Morbus Crohn-assoziierten *Escherichia coli*-Stamm LF82 (Brest 2011, Lapaquette 2010, McCarroll 2008, Singh 2006). Entsprechend förderte eine moderate Überexprimierung von *IRGM* den bakteriellen Abbau durch Autophagie (Brest 2011). Das deutet darauf hin, dass dem Maß der *IRGM*-Expression entscheidende Bedeutung in der Regulierung der Autophagie zukommt.

1.2.4.5 weitere CED-Suszeptibilitätsgene

In der folgenden Tabelle sind neben den oben bereits vorgestellten Genen weitere wichtige Suszeptibilitätsgene für die Entwicklung von CED zusammenfasst.

Gen oder Locus	Chromosom	Funktion/Gene im betroffenen Abschnitt	Assoziation
<i>NOD2</i>	16q12	Intrazellulärer Sensor für Peptidoglykane	Morbus Crohn (Hugot 2001, Ogura 2001b)
<i>IL23R</i>	1p31	IL-23-Rezeptor	Morbus Crohn Colitis ulcerosa (Duerr 2006)
<i>ATG16L1</i>	2q37	Autophagozytose	Morbus Crohn (Hampe 2007, Rioux 2007)
Intergenic region	5p13	PTGER4	Morbus Crohn (Libioulle 2007)
<i>IBD5</i>	5q31	<i>SLC22A4</i> ; <i>SLC22A5</i> ; <i>IRF1</i>	Morbus Crohn Colitis ulcerosa (Giallourakis 2003, Peltekova 2004, Rioux 2001)
MHC region	6p21	MHC-Komplex, <i>LTA</i> , <i>HLA-DQA2</i> , <i>TNF</i> , <i>LST1</i> , <i>LTB</i> (Franke 2010)	Morbus Crohn Colitis ulcerosa (Stokkers 1999)
<i>PTPN2</i>	18p11	T-Zell-Protein-Thyrosin-Phosphatase	Morbus Crohn (Parkes 2007, Wellcome Trust Case Control 2007)

Gen oder Locus	Chromosom	Funktion/Gene im betroffenen Abschnitt	Assoziation
<i>IL12B</i>	5q33	Interleukin-12/23 p40-Untereinheit	Morbus Crohn (Parkes 2007, Wellcome Trust Case Control 2007)
<i>NKX2-3</i> region	10q24	Immunentwicklung im GI-Trakt	Morbus Crohn (Parkes 2007, Wellcome Trust Case Control 2007)
Intergenic region	10q21	<i>ZNF365</i>	Morbus Crohn (Rioux 2007)
Gene-rich region	3p21	<i>MST1, GPXI, BSN</i> (Franke 2010)	Morbus Crohn Colitis ulcerosa (Franke 2010, Parkes 2007, Wellcome Trust Case Control 2007)
<i>IRGM</i> gene region	5q33	Autophagozytose	Morbus Crohn (Parkes 2007, Wellcome Trust Case Control 2007)
<i>ULK1</i>	12q24.3	Autophagozytose	Morbus Crohn (Gardet 2012, Henckaerts 2011)
<i>DAP</i>	5p15	Autophagozytose	Colitis ulcerosa (Gardet 2012)
<i>ATG2A</i>	6q21	Autophagozytose	Morbus Crohn (Brinar 2012, Gardet 2012)
<i>LRRK2</i>	12q12	Autophagozytose	Morbus Crohn (Barrett 2008, Franke 2010)
<i>TNFSF15</i>	9q32	Immunregulation	Morbus Crohn Colitis ulcerosa (Franke 2010, Naser 2012)
<i>ICOSLG</i>	21q22	T-Zell-Co-Stimulation	Morbus Crohn Colitis ulcerosa (Franke 2010)

Tabelle 5: Zusammenfassung weiterer Suszeptibilitätsgene bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (modifiziert nach Baumgart 2012, Brinar 2012, Cho 2007, Gardet 2012, Henckaerts 2011, Kabi 2012, Tsianos 2012)

1.3 Das Gen *ATG16L1*

1.3.1 Überblick zu *ATG16L1*

Das Autophagy-related-16-like-1-Gen (*ATG16L1*) kodiert für ein Protein im Autophagosom-Stoffwechsel und trägt seinen Namen wegen Homologien mit dem *ATG16*-Protein der Hefe. Es wird ubiquitär exprimiert und befindet sich auf dem Chromosom 2 auf Position q37.1, es beinhaltet 19 Exons und liegt beim Menschen in vier Isoformen vor, die eine N-terminale coiled-coil Domäne und, je nach Isoform verschieden, drei bis sieben C-terminale WD-repeats aufweisen, deren Funktion bisher unbekannt ist (Fujioka 2010, Mizushima 2003, Zheng 2004). Die zentrale *ATG16*-Domäne ist an der Bindung von *ATG5* beteiligt und wird für die Homooligomerisierung benötigt (Fujioka 2010, Mizushima 2003).

ATG16L1 ist in einem großen Proteinkomplex am Autophagie-Prozess und damit am Abbau von Zellorganellen und Makromolekülen, sowie an der Prozessierung von Antigenen wie intrazellulären Bakterien und anderen Stoffwechselwegen zur Initiierung der Immunantwort beteiligt (Hampe 2007, Kuma 2002, Mizushima 2003, Rioux 2007). Auf den Prozess der Autophagie wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

ATG16L1 scheint außerdem bei der Signalregulation für die Exozytose von Granula in Paneth-Zellen der intestinalen Schleimhaut eine Rolle zu spielen (Cadwell 2008).

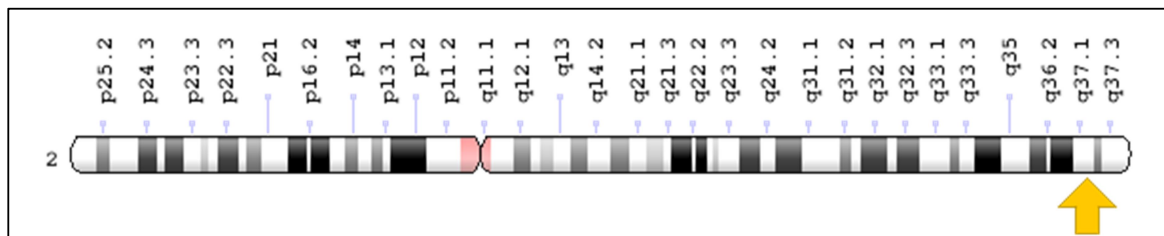


Abbildung 5: Position von *ATG16L1* auf Chromosom 2 (q37.1), Abbildung von Genetics-Home-Reference downloaded 2017

1.3.2 Autophagie

Autophagie ist ein fundamentaler Mechanismus der zellulären Homöostase, in dem Zellen Teile ihres eigenen Zytoplasmas zur Entsorgung oder Wiederverwertung abbauen. Ihr Stellenwert für die aktuelle Forschung ist an der Tatsache abzuschätzen, dass für Entdeckungen der Mechanismen der Autophagozytose der Nobelpreis 2016 für den Bereich Medizin an den Japaner Yoshinori Ohsumi verliehen wurde.

Bei der Autophagie werden Portionen des Zytosols in charakteristische Vesikel mit doppelter Membran eingeschlossen (Autophagosom) und zu Lysosomen transportiert, wo unter Bildung eines Autophagolysosoms der Inhalt abgebaut wird. In ihrer Grundfunktion betrachtet sorgt die Autophagie für den Abbau von Zellorganellen und langlebigen Proteinen zur Wiederverwertung für anabole Prozesse oder auch zur Lebenserhaltung bei Nahrungskarenz. Somit übernimmt sie eine Haushaltsfunktion in der Zelle, indem sie den Proteinumsatz antreibt und defekte oder überzählige Zellorganellen entfernt. Zellalterung beruht nicht zuletzt auf einer Anreicherung von fehlgefalteten und funktionsuntüchtigen Proteinen sowie beschädigten Zellorganellen, was schließlich in Funktionsverlust und Verfall des gesamten Organismus mündet. Entsprechend zeigten Cuervo et al. mit zunehmendem Alter einen Rückgang der Autophagie-Aktivität (Cuervo 2005).

Obwohl Autophagie an sich als ein Mechanismus zum Überleben der Zelle betrachtet werden kann, ist durch ihn ab einem gewissen Grad jedoch auch die Auslösung eines nicht-apoptotischen programmierten Zelltods möglich. Autophagie wird sowohl mit Gesundheitsförderung als auch mit Krankheitszuständen wie z.B. Karzinomen, Neurodegeneration oder Myopathien in Verbindung gebracht (Billmann-Born 2011).

In der Forschung der letzten Jahre wurde mehrfach aufgezeigt, dass Autophagie an einer Reihe von Prozessen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr beteiligt ist, insbesondere die Rolle bei der Bekämpfung intrazellulärer Bakterien im Sinne einer Xenophagie ist Gegenstand der Forschung (Delgado 2009, Münz 2009).

Paneth-Zellen von Mäusen mit fehlender ATG16L1-Funktion scheinen in ihrer sekretorischen Funktion eingeschränkt zu sein. Das Verpacken antimikrobieller Proteine in Granula sowie deren Export ins intestinale Lumen sind fehlerhaft (Cadwell 2008). Der Autophagie-Prozess in Paneth-Zellen scheint zusätzlich eine entscheidende Rolle in der Limitierung der Expression inflammatorischer Zytokine zu spielen (Stappenbeck 2010).

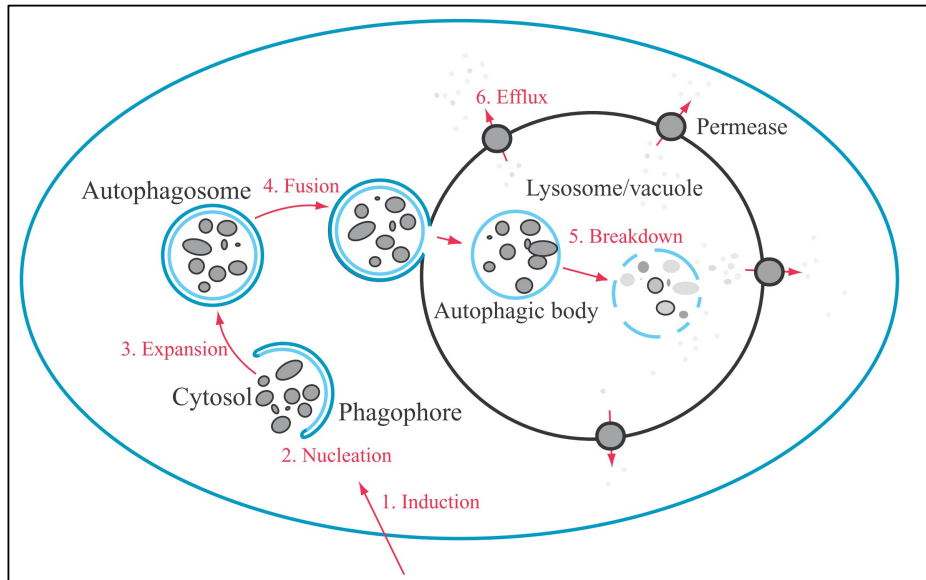


Abbildung 6: Schematisches Modell der Makroautophagie, Abbildung aus Mizushima et al. (Mizushima 2007). Autophagie findet in geringerem Maße zu jeder Zeit statt und kann durch bestimmte Umwelteinflüsse oder intrazelluläre Signale induziert werden (1). Im ersten Schritt des Prozesses erfolgt der Einschluss von Teilen des Zytoplasmas in eine Membranhülle von bisher unbekannter Herkunft, die so genannte Phagophore oder Isolationsmembran (2). Vermutlich durch Verschmelzung mit weiteren Membran-Vesikeln wächst die Phagophore zum Autophagosom mit doppelter Membran (3). Schließlich verschmilzt die äußere Membran des Autophagosoms mit dem Lysosom (4), wodurch das innere Vesikel mit einfacher Lipidschicht freigesetzt wird. Das Autophagosom wird durch lysosomale Hydrolasen abgebaut (5). Die entstehenden Makromoleküle werden über Membran-Permeasen zurück ins Zytosol transportiert (6), wo sie für anabole oder katabole Prozesse erneut zur Verfügung stehen. Die einzelnen Schritte zur Erkennung und Verpackung von Autophagiematerial sowie die Zuordnung zu bestimmten Autophagie-Untergruppen sind bisher nicht beschrieben. Die angegebenen Zahlen entsprechen den jeweiligen Schritten in der Abbildung.

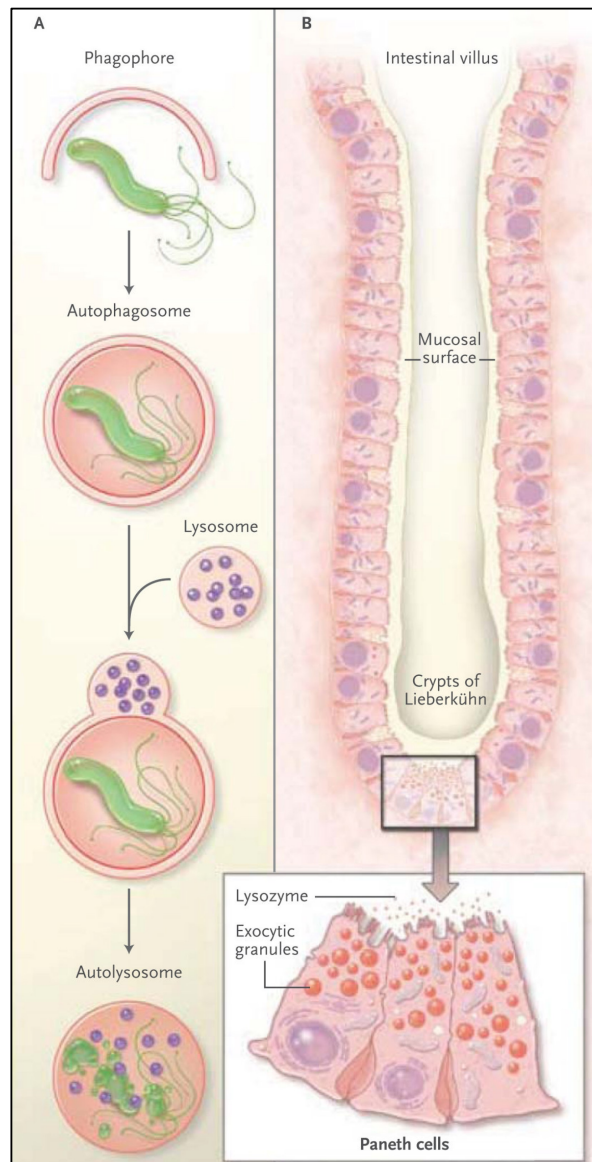


Abbildung 7: Autophagie und das intestinale Epithel, Abbildung aus Klionsky (Klionsky 2009). (A) Makroautophagie kann zytoplasmatische Bestandteile wie Zellorganelle oder, wie hier dargestellt, eingedrungene Mikroben in Doppelmembran-Autophagosomen aufnehmen. Die Fusion mit einem Lysosom erlaubt die Zersetzung des Inhalts und die Eliminierung des Pathogens. (B) Durch die Exozytose von Granula sezernieren Paneth-Zellen in den Lieberkühnschen Krypten antimikrobielle Peptide und Lysozym und regulieren damit den mikrobiellen Status im Darmlumen und schützen vor dem Eindringen pathogener Keime.

ATG16L1-defiziente Mäuse zeigen neben einer Paneth-Zell-Rarifizierung mit abnormer Granulabildung nach Kontakt mit *Salmonella typhimurium* eine erhöhte Rate systemischer Infektionen mit verstärkter intestinaler Entzündungsreaktion (Conway 2013).

Fehlerhafte Vorgänge im Autophagieprozess können eine erhöhte Infektionsanfälligkeit zur Folge haben und Krankheiten auslösen. Genveränderungen können den Autophagieprozess beeinflussen, was zu einer Akkumulation von unbrauchbaren Zellbestandteilen und dem

Persistieren von schädlichen Bakterien führen kann, die sonst zerstört würden. Durch diese Zellkomponenten und Erreger kann eine inadäquate Immunantwort getriggert werden, die zu einer chronischen Entzündung der Darmwand führen kann (Billmann-Born 2011).

1.3.3 Funktion des ATG16L1-Proteins

Mizushima et al. konnten am Mausmodell zeigen, dass ATG16L1 mit ATG5, jedoch nicht mit ATG12 interagiert sowie Homodimere bilden kann (Mizushima 2003). Die WD-repeat-Domäne war für diese Interaktionen nicht notwendig. Im Verbund mit ATG12-ATG5-Dimeren assoziiert ATG16L1 während der Autophagosom-Bildung an die Autophagosom-Membran. Für dieses Targeting an die Membran ist ATG5 essentiell, ATG12 wird nicht benötigt. Ebenso verhindert ein Fehlen von ATG16L1 die Assoziation des ATG12-ATG5-Konjugats an die Isolationsmembran und blockiert damit den gesamten Autophagieprozess (Komatsu 2005, Saitoh 2008). Auch das bereits beschriebene NOD2 ist an der Initiierung des Autophagieprozesses beteiligt. Nach Aktivierung von NOD2 durch MDP interagiert es mit dem ATG16L1-Protein am Ort des Bakterieneintritts in die Zelle, wodurch nach Rekrutierung des ATG16-ATG5-ATG12-Komplexes eine Phagophoren-Bildung ermöglicht wird (Billmann-Born 2011).

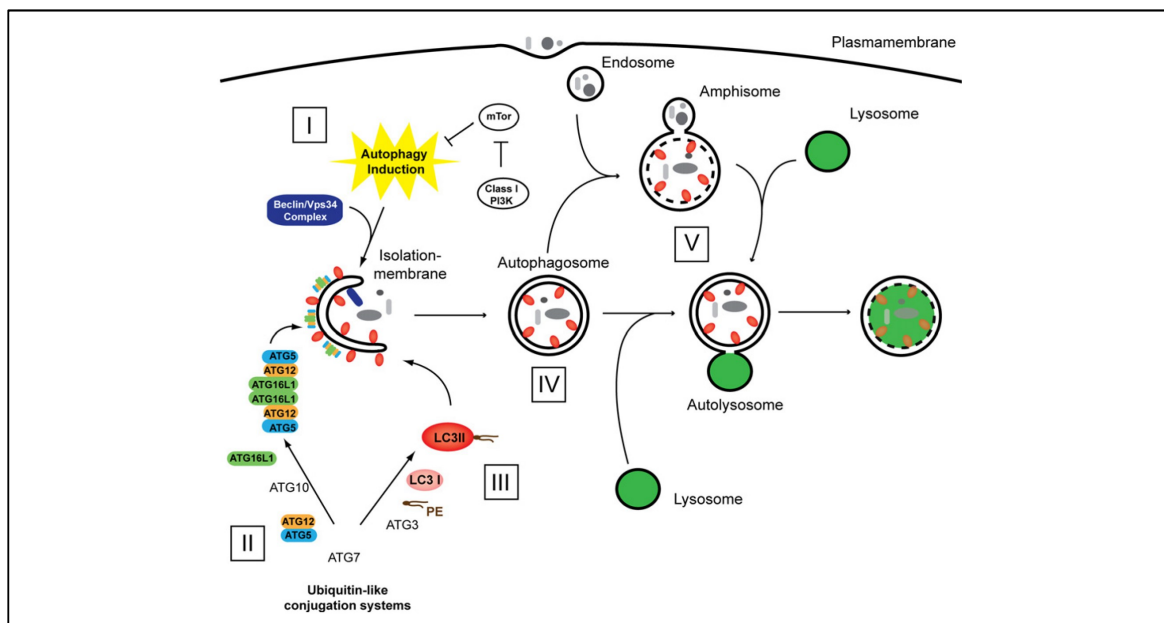


Abbildung 8: Grundlegende Schritte der Autophagosom-Bildung, Abbildung aus Billmann-Born et al. (Billmann-Born 2011). (I) Bildung der Isolationsmembran; (II) Formierung des ATG5-ATG12-ATG16L1-Komplexes, daraufhin Multimerisierung und Assoziation an die Isolationsmembran; (III) Prozessierung von LC3 (ATG8 der Hefe) und Einfügen in die wachsende Phagophorenmembran; die Schritte II und III laufen unter der Kontrolle der Ubiquitin-like conjugation systems ATG10, ATG7 und ATG3 ab; (IV) zufälliger oder selektiver Materialeinschluss in das Autophagosom, teilweise Rückgewinnung von LC3; (V) Fusion von Autophagosom und Lysosom (direkt oder indirekt über die Verschmelzung mit späten Endosomen und Ausbildung von Amphisomen).

1.3.4 Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

ATG16L1 wurde von Hampe 2007 in einer genomweiten Assoziationsstudie an 19.779 nicht-synonymen Single Nucleotid Polymorphismen (im Folgenden SNPs genannt) von 735 Morbus Crohn-Patienten und 368 gesunden Kontrollen als ein weiteres Suszeptibilitätsgen für Morbus Crohn identifiziert (Hampe 2007). Dieses Ergebnis konnte sowohl in Studien in der britischen CED-Population (Prescott 2007) als auch in zwei weiteren genomweiten Studien bestätigt werden. Weiterhin zeigten Hampe et al., dass allein in dem kodierenden SNP rs2241880 (T300A) nahezu das gesamte Erkrankungsrisiko enthalten ist, das vom *ATG16L1*-Locus ausgeht (Hampe 2007). Zudem wiesen sie hinsichtlich des Morbus Crohn-Risikos eine statistisch signifikante Interaktion zwischen rs2241880 und den bereits etablierten *NOD2*-Suszeptibilitätsvarianten nach, die allerdings nicht sehr stark war ($p = 0,039$) (Hampe 2007) und nicht in anderen Studien bestätigt werden konnte (Prescott 2007). Hingegen fanden Hampe et al. keinen Zusammenhang zwischen rs2241880 und Colitis ulcerosa (Hampe 2007), obwohl eine größer angelegte britische Studie eine schwache, jedoch signifikante Assoziation nachgewiesen hat (Prescott 2007). In dieser entsprach der 300A/A-Genotyp einem 1,6-fach erhöhten Risiko für Morbus Crohn mit einem 2,2-fach erhöhten Risiko für eine ileale Erkrankung insgesamt (Prescott 2007). Eine Analyse der Interaktion von *ATG16L1* mit *NOD2* und *IBD5* zeigte, dass alle drei Genloci unabhängig voneinander zum Erkrankungsrisiko beitragen (Prescott 2007). Lagen die Risikoallele aller drei Genloci homozygot vor, war das kombinierte Erkrankungsrisiko für Morbus Crohn 20,4-fach erhöht (Prescott 2007).

In einer japanischen Studie wurde allerdings gezeigt, dass *ATG16L1* und viele andere kürzlich entdeckte Suszeptibilitätsgene für Morbus Crohn auf Chromosom 5p13.1 sowie *IL23R*-Varianten in der japanischen Bevölkerung nicht mit Morbus Crohn assoziiert zu sein scheinen (Yamazaki 2007). Das deutet darauf hin, dass in der Pathogenese von Morbus Crohn bei asiatischen Patienten andere genetische Faktoren eine Rolle spielen, wie auch schon für *NOD2* gezeigt wurde (Croucher 2003, Guo 2004, Inoue 2002).

Zuletzt wurde in holländischen Studien eine Assoziation der *ATG16L1*-T300A-Variante mit dem Auftreten und klinischen Verlauf von Schilddrüsen-Karzinomen gezeigt (Huijbers 2012). Das G-Allel (300A) scheint hierbei einen protektiven Effekt auf das Auftreten der Krankheit und ein besseres Ansprechen der Therapie zur Folge zu haben (Huijbers 2012).

In einer aktuellen Studie wurde eine verstärkte Anfälligkeit für *Helicobacter pylori*-Infektionen bei Patienten mit *ATG16L1*-Variationen gezeigt (Raju 2012).

1.3.5 Der *ATG16L1*-Polymorphismus rs2241880 (T300A)

Die N-terminale Domäne von *ATG16L1* ist in die Komplexierung der essentiellen Autophagie-Proteine *ATG5* und *ATG12* involviert. Die Funktion der acht WD-repeats am C-terminalen Ende ist bisher nicht genau geklärt, sie enthalten den mit Morbus Crohn assoziierten SNP T300A (Billmann-Born 2011).

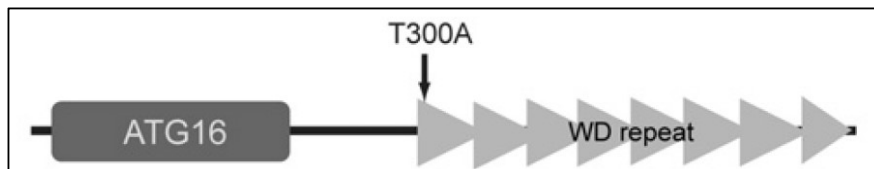


Abbildung 9: Struktur von *ATG16L1* mit T300A-Variante, Abbildung aus Billmann-Born et al. (Billmann-Born 2011)

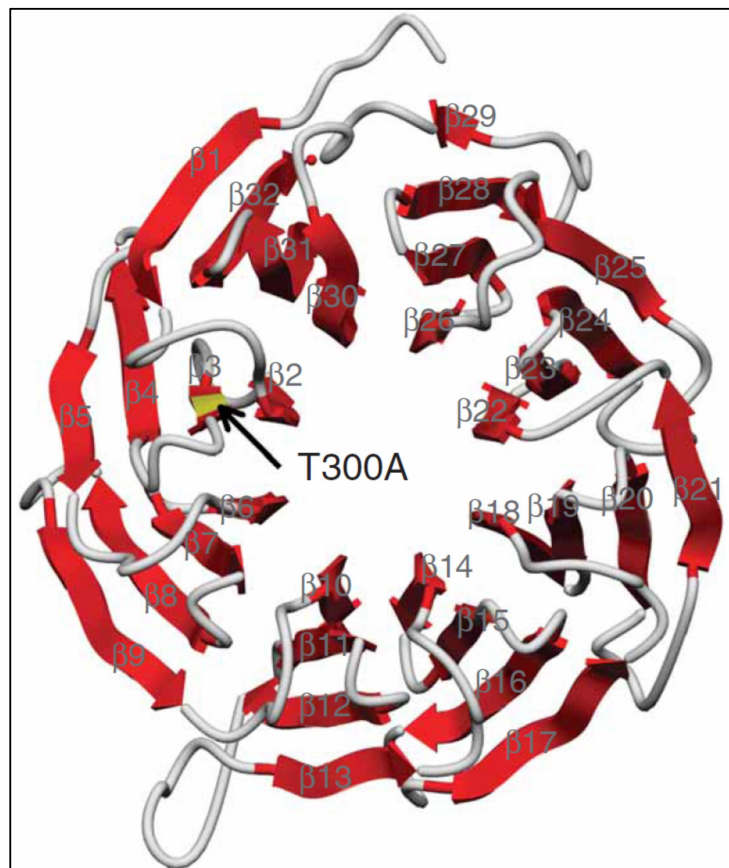


Abbildung 10: Dreidimensionales Strukturmodell der WD-Repeat-Domäne von *ATG16L1*, Abbildung aus Hampe et al. (Hampe 2007). Die Lokalisation der Aminosäurevariante T300A im β_3 -Strang, die rs2241880 ausmacht, ist gelb markiert. Dabei entspricht das Allel A dem 300Thr-Allel, das Allel G dem 300Ala-Allel.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bei Kenntnis der beschriebenen ethnischen Unterschiede hinsichtlich des Einflusses der beteiligten Gene auf die Ausbildung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist eine wiederholte Bestätigung genomweiter Assoziationen in Populationen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund unverzichtbar, wenn man den Einfluss von Suszeptibilitätsgenen auf die Erkrankung nachweisen möchte.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse einer großen Kohorte von deutschen CED-Erkrankten durchgeführt (Morbus Crohn $n = 768$, Colitis ulcerosa $n = 507$, Kontrollen $n = 1,615$). Dabei sollten folgende drei Ziele untersucht werden:

1. Einfluss der untersuchten *ATG16LI*-SNPs auf die Suszeptibilität für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
2. Einfluss der *ATG16LI*-Polymorphismen auf den Phänotyp von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
3. potentielle Interaktionen mit anderen bekannten CED-Suszeptibilitätsgenen

Im Unterschied zu anderen Replikationsstudien wurden neun *ATG16LI*-Varianten untersucht, für die eine Assoziation mit Morbus Crohn auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ sowohl in Allel-basierten als auch in Genotyp-basierten Analysen von Hampe et al. bereits nachgewiesen wurde (Hampe 2007). Eine solche Untersuchung ist deshalb wichtig, weil bei einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe genetische Unterschiede zur CED-Population, die Hampe et al. beschrieben hatten, gefunden wurden (Hampe 2007, Török 2005). So konnte beispielsweise eine Assoziation des *DLG5*-Gens mit Morbus Crohn, die in deren Patienten-Kohorte nachgewiesen wurde (Stoll 2004), in unserer Population und anderen europäischen Kohorten nicht bestätigt werden (Browning 2007, Török 2005), was auf genetische Unterschiede zwischen den CED-Populationen Nord- und Süddeutschlands hinweisen könnte. Zudem zeigte eine weitere Studie geringe, aber dennoch messbare genetische Unterschiede innerhalb der deutschen Bevölkerung entlang eines Nord-Süd-Gradienten (Steffens 2006).

2 Material

2.1 Studienpopulation

Die Studienpopulation (n = 2890) umfasste 1275 Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, wovon 768 Patienten an Morbus Crohn und 507 Patienten an Colitis ulcerosa litten, sowie 1615 gesunde, unverwandte Kontrollen. Für die Kontrollgruppe wurden gesunde Blutspender ausgewählt, die bezüglich Alter und Geschlecht dem Patientenkollektiv entsprachen. Alle Teilnehmer waren kaukasischer Herkunft. Demographische und klinische Daten wie klinisches Bild, Lokalisation der Krankheit, Komplikationen, Bedarf eines operativen Eingriffs oder Immunsuppression wurden ohne Berücksichtigung des Genotyps in einer retrospektiven Analyse der Krankenakten und eines ausführlichen Fragebogens erhoben, der Teil des Anamnesegesprächs bei Aufnahme in die Klinik war. Die demographischen Charakteristika sowohl des CED-Patienten- und Kontrollkollektivs sind in Tabelle 6 dargestellt.

Die Diagnosestellung von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa erfolgte gemäß etablierter klinischer Leitlinien und endoskopischer, radiologischer und histopathologischer Kriterien (Lennard-Jones 1989). Eine Einteilung der Morbus Crohn-Patienten nach Alter bei Diagnosestellung (age, A), Lokalisation (location, L) und klinischem Bild (behavior, B) erfolgte nach der Montreal-Klassifikation (Silverberg 2005). Für die Patienten mit Colitis ulcerosa wurden die betroffenen anatomischen Regionen ebenfalls gemäß der Montreal-Klassifikation unterteilt in ulzeröse Proktitis (E1), linksseitige Colitis ulcerosa (distale Colitis ulcerosa, E2) und ausgedehnte Colitis ulcerosa (Pancolitis, E3). Patienten mit nicht klassifizierbarer Colitis indeterminata wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt und unter Einhaltung der Ethischen Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen gemäß der Deklaration von Helsinki (World Medical Association General 2004) durchgeführt. Alle Teilnehmer der Studie gaben nach einer ausführlichen Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur genetischen Untersuchung ihres Blutes.

	Morbus Crohn (n = 768)	Colitis ulcerosa (n = 507)	Kontrollen (n = 1,615)
Geschlecht			
männlich (%)	48,8 %	47,4 %	62,2 %
weiblich (%)	51,2 %	52,6 %	37,8 %
Alter (Jahre)			
Mittelwert ± SD	39,5 ± 13,0	41,7 ± 14,3	45,8 ± 10,7
Spannweite	10-80	7-85	18-71
Alter bei Diagnosestellung (Jahre)			
Mittelwert ± SD	27,9 ± 11,5	31,8 ± 12,7	
Spannweite	7-71	9-73	

Tabelle 6: Demographische Charakteristika der Studienpopulation

2.2 Material für molekularbiologische Experimente

2.2.1 Materialien für die Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.2.1.1 Primer und Sonden zur Analyse der *ATG16L1*-Polymorphismen

Primer		Sonden	
SNP rs13412102 (= SNP 1)			
rs13412102_F	CAgCTCCTTTTCATTCCCAC	rs13412102_Anc (A)	gACACTTCCTTCAATAAATC TTCATgTCT--FL
rs13412102_A	CTCCCTCTCTCCTTCACC	rs13412102_[T] (A)	LC640- ACCCTgCCCTAg ^A ACgTAC-- PH
SNP rs12471449 (= SNP 2)			
rs12471449_S	gCTgggTTggAATCTgC	rs12471449_Anc (S)	LC610- gCAAgACACCgTTgTCAgTAT TAATTC--PH
rs12471449_R	TAgCACTTATCACCTCTgAT ATCTTAG	rs12471449_[C] (S)	CATAC ^C TATAAAgCACTTAC TgTg--FL

Primer		Sonden	
SNP rs6431660 (= SNP 3)			
rs6431660_S	gTATTTTggTTAATTTTAggT gTAg	rs6431660_Anc (A)	LC670- ggATgAATTTAgACgAAAATg gTgAAAC--PH
rs6431660_A	gCTgCATATTCCAAGCAC	rs6431660_[G] (A)	CAGATAgAAATgTTTT C AgTT TTC--FL
SNP rs1441090 (= SNP 4)			
rs1441090_F	gAgggAAgAAggAACCATAg AT	rs1441090_Anc (S)	ggAggCAGCTCTTgCTCATTA AgCTggT--FL
rs1441090_R	CTTgggCATTCACACAggT	rs1441090_[C] (S)	LC640- gAgACCCCCAA C CCTTCA-- PH
SNP rs2289472 (= SNP 5)			
rs2289472_S	gAATATgTTTCCCACTTAgT TCC	rs2289472_Anc (A)	CCCCTgTTTTCTggCAGTTTg gTACTg--FL
rs2289472_A	ATTgTgAggTTAgTTgTCTAA TgC	rs2289472_[G] (A)	LC610- gTTgggTTTCT C TTggCT--PH
SNP rs2241880=T300A (= SNP 6)			
rs2241880_F	ATTTGTCTTTATGTTATTTT TTAGGAGACG	rs2241880_Anc (A)	GTAGCTGGTACCCTCACTTC TTACCAGA-FL
rs2241880_R	GTAACAAATTTTGTCTCT GAAACTA	rs2241880_[G] (A)	LC610- CCAGGATGAG C ATCCACAT TGT
SNP rs2241879 (= SNP 7)			
rs2241879_F	TTTgCCCCATCCCTCAT	rs2241879_Anc (S)	LC670- gCgTggTAGggTTCggggCT--PH
rs2241879_A	gCCTTgTgTgTCTTCgTAAgT AT	rs2241879_[C] (S)	CCAggCTCTgT C ACCATATCA --FL
SNP rs3792106 (= SNP 8)			
rs3792106_F	gTTCATCTTCAATgTgTCgAg C	rs3792106_Anc (S)	LC640- CAATACAACATACCCTCATT TTCCAACC-PH
rs3792106_R	CTTTTACTAAgCTgAgAgCTg ACTAC	rs3792106_[A] (S)	TggCTTTACA A AAgTCTAAAC C--FL

Primer		Sonden	
SNP rs4663396 (= SNP 9)			
rs4663396_F	AACAgAggAAgTAATgTTAA gATgA	rs4663396_Anc (A)	gAAggCggAggTTgCAGtAgCT g--FL
rs4663396_A	gCAGATCCCTTgAggTCA	rs4663396_[T] (A)	LC670- gATCACACTACT A TACCCCA CAC--PH

Tabelle 7: Verwendete Primer und Sonden bei der RT-PCR, Hersteller TIB MOLBIOL GmbH, Berlin. Die polymorphe Sequenz in der Sensor-Sonde ist rot markiert.

2.2.1.2 Kits

Artikel	Hersteller
Polymerase Mix, Light Cycler [®] 480 Genotyping Master 5x conc.	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler480, Color compensation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Qiagen Blood Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 8: Bei den Untersuchungen verwendete Kits

2.2.2 Materialien für die Agarosegel-Elektrophorese

Material	Hersteller
Agarose-Gel	6,25 g Agarose, Typ I-A
	50 ml TBE Puffer (10x konz.)
	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	20 mM EDTA pH 8
	4 µl Ethidiumbromid
	225 ml destilliertes Wasser
6 × DNA-Auftragspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8
	2 mM EDTA
	20 % Ficoll 400
	0,25 % Orange G
100 bp DNA-Molekulargewichtstandard	Cambrex, Wiesbaden, Deutschland

Material	Hersteller
Laufpuffer (2 Liter)	1800 ml destilliertes Wasser 200 ml TBE Puffer 30 µl Ethidiumbromid
Polaroid Film Typ 667	Apotheke Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München, München Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Polaroid, Concord, USA

Tabelle 9: Materialien für die Agarosegel-Elektrophorese

2.2.3 Materialien für die konventionelle PCR

Substanz	Hersteller
PCR-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTP-Mix	Sigma, Steinheim, Deutschland
HotStar Plus Taq TM DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer (<i>siehe RT-PCR Kap. 2.2.1.1</i>)	TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland
MgCl ₂	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 10: Materialien für die konventionelle PCR

2.3 Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller
Light Cycler [®] 480 Multiwell Plate 384	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler [®] 480 Multiwell Plate 96	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler [®] 480 Sealing Foil	Roche, Mannheim, Deutschland
Versiegelungsfolie Microseal B	Biozym, Wien, Österreich
Handschuhe, Naturkautschuklatex	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Handschuhe Vinyl 2000	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Handschuhe Nitril	Semperit, Wien, Österreich
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt, Deutschland
Pipettenspitzen (12,5µl)	Matrix, Thermo Scientific, NH, USA

Artikel	Hersteller
Reaktionsgefäße 1,6ml, 2,0ml	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Steriles Wasser für Injektionszwecke 50ml	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
LightCycler [®] 480, H ₂ O, PCR grade	Roche, Mannheim, Deutschland

Tabelle 11: Bei den Untersuchungen verwendetes Verbrauchsmaterial

2.4 Geräte

Artikel	Hersteller
Light Cycler [®] 480 Instrument 384 SN 1003	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Light Cycler [®] 480 Block Kit 384	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Pipettierroboter Freedom EVO	Tecan, Männedorf, Schweiz
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop [®] , Wilmington, USA
Allegra [™] 25R Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Microfuge [®] 18 Centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Schüttler Vortex	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sterilbank LaminAir Model 1,8	Holten, Allerød, Dänemark
Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Biohit, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland
8-fach Pipette (12,5 µl)	Matrix, Thermo Scientific, NH, USA
PCR-Gerät DNA Engine DYAD [™]	MJ Research, St. Bruno, Quebec, Kanada
Gel-Elektrophorese-Kammer Sub Cell GT	Biorad, München, Deutschland
Elektrophorese-Gerät Power Pac	Biorad, München, Deutschland
Feinwaage	Adam Equipment Co Ltd, Milton Keynes, UK
Variomag Monotherm Electronicrührer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Videodokumentationssystem Infinity-3000	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
UV-Leuchttisch, WL/LC Infinity	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Eismaschine	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Abzugskammer	Waldner Laboreinrichtungen, Wangen, Deutschland

Artikel	Hersteller
Barnstaed Reinstwassersysteme NANOpure Typ Diamond Life Science	Wilhelm Werner GmbH, Leverkusen, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, Deutschland
Brutschrank 37 °C	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 12: Bei den Untersuchungen verwendete Geräte

2.5 Software

Artikel	Hersteller
Nano Drop, Photometer	Nano Drop, Wilmington, USA
Light Cycler® 480 Basic Software	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler® 480 1,5 version Genotyping Software	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler® 480 Quantification Software	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler® 480 LIMS/Bar-Code Module	Roche, Mannheim, Deutschland
Freedom EVOware, Pipetierroboter	Tecan, Männedorf, Schweiz
PCR-Programm Dyad und Tetrad	Peltier Thermal Cyclers 2003, Biorad, München
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft, Redmond, USA
SPSS 13.0	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
R-2.4.1.	http://cran.r-project.org

Tabelle 13: Bei den Untersuchungen verwendete Software

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA-Isolierung

Von allen Studienteilnehmern wurden Blutproben abgenommen und in der Folge genomische DNA aus den Leukozyten des peripheren Bluts isoliert. Hierzu wurde der „DNA blood mini kit“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet und nach Herstelleranleitung vorgegangen.

Zunächst wurden zur Lyse der korpuskulären Blutbestandteile in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß für Mikrozentrifugen 20 µl QIAGEN-Protease und 200 µl der Patientenprobe pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer AL und kräftiger Durchmischung auf einem Vortexer erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Heizblock bei 56 °C. Um bei gleichzeitiger Isolierung der DNA unterschiedlicher Blutproben eine Kreuzkontamination durch Tröpfchen auf der Deckelinnenseite möglichst zu vermeiden, wurden solche Flüssigkeitsreste durch kurze Zentrifugation des Gefäßes entfernt. Anschließend wurden 200 µl Ethanol zum Ansatz hinzugefügt und vermischt, und das Gefäß erneut kurz abzentrifugiert. Der gesamte Probenansatz wurde nun vorsichtig in eine QIAamp-Chromatographiesäule pipettiert und im Anschluss bei 8000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW1 und nach weiterer einminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm das Aufsetzen der Spinsäule auf ein 2-ml-Auffanggefäß. Zum weiteren Waschen wurde der Ansatz mit 500 µl Waschpuffer AW2 versetzt und bei 14000 rpm weitere drei Minuten zentrifugiert. Die Spinsäule wurde anschließend in ein 1,5-ml-Auffanggefäß gegeben. Nach dem Hinzufügen von 200 µl Elutionspuffer und einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte abschließend eine wiederum einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm. Die gewonnene DNA konnte anschließend direkt für die PCR verwendet, zur mittelfristigen Aufbewahrung bei 4 °C gelagert oder bei -20 °C tiefgefroren werden.

3.1.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen (Spectrophotometer NanoDrop® ND-1000, Nano Drop, Wilmington, USA). Um eine einheitliche DNA-Konzentration zur Genotypisierung zu erreichen, wurde diese mittels Verdünnung TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA) auf eine Endkonzentration von 100 ng/µl eingestellt.

3.1.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (real-time PCR)

Die RT-PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR, ermöglicht allerdings zusätzlich eine relative oder absolute Quantifizierung der PCR-Produkte. Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Segments erfolgt wie bei der klassischen PCR in den drei Schritten Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation. Zur Quantifizierung bedient man sich der Detektion von emittiertem Licht fluoreszierender Farbstoffe, die als sogenannte FRET-Sonden spezifisch an zu detektierende DNA-Abschnitte binden.

Das Prinzip des FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) wurde von T. Förster 1946 entdeckt und beschreibt Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Sonden mit überlappenden Absorptionsspektren.

Allen Fluoreszenzformaten ist gemeinsam, dass die Intensität der Fluoreszenz proportional zur amplifizierten DNA-Menge zunimmt und so eine Quantifizierung ermöglicht. Die Markierung kann mit unspezifischen interkalierenden DNA-Farbstoffen oder mit fluoreszenzmarkierten Sonden (Oligonukleotiden) erfolgen, die spezifisch an die gewünschte DNA-Sequenz binden können.

Erstere, wie das am weitesten verbreitete SYBR[®] Green I, binden unspezifisch an doppelsträngige DNA. Eine Differenzierung der PCR-Produkte ist deshalb nur durch Schmelzkurvenanalyse bei Kenntnis der spezifischen Schmelztemperatur des DNA-Zielfragments möglich.

Hingegen sind sequenzspezifische Fluoreszenzsonden, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, komplementär zur Zielsequenz, so dass die ungewollte Mitdetektion unspezifischer PCR-Produkte oder Artefakte verhindert wird. Für die RT-PCR mit Hybridisierungssonden werden für jeden SNP eine Sensor- und eine Anker-FRET-Sonde benötigt, die in direkter Nachbarschaft voneinander an die DNA binden. Je näher die beiden Sonden an der Zielsequenz zur Bindung kommen, desto stärker ist das FRET-Signal. Dabei gilt ein Abstand von 1-5 Nukleotiden als ideal. Anregung und Detektion finden in einem LightCycler-Gerät statt.

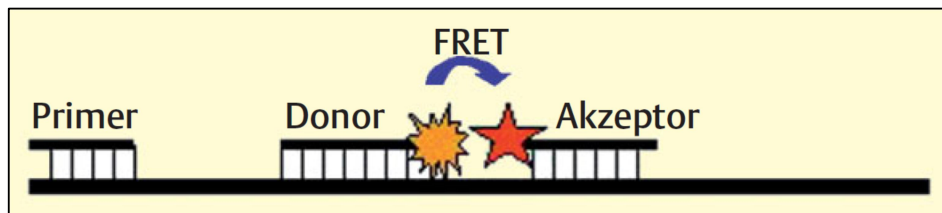


Abbildung 11: Hybridisierungssonde (LightCycler®), Abbildung aus Holzapfel et al. (Holzapfel 2007): Während eines PCR-Zyklus hybridisieren zwei Sonden in geringem Abstand zueinander an die komplementäre DNA und ermöglichen somit einen Fluoreszenzübertrag vom Donor auf den Akzeptor (FRET, siehe auch Abbildung 13) Die Akzeptor-Fluoreszenz steigt proportional mit der Konzentration komplementärer DNA.

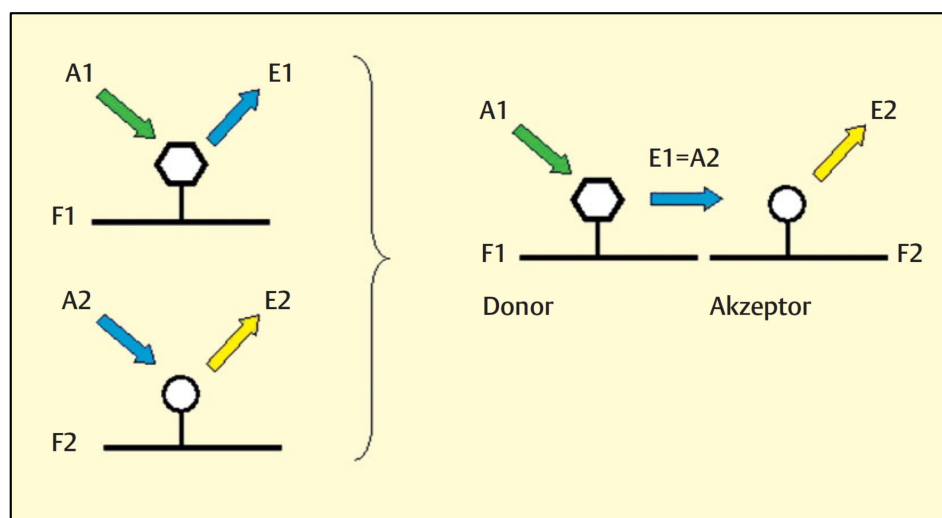


Abbildung 12: Fluoreszenzmessung durch Energietransfer, Abbildung aus Holzapfel et al. (Holzapfel 2007): Ein Fluoreszenzfarbstoff (F1) besitzt eine bestimmte Anregungswellenlänge (A1) und ein bestimmtes Emissionsspektrum (E1). Gleiches gilt für einen zweiten Farbstoff (F2). Die Anregungs- und Emissionsspektren sind für die jeweiligen Fluorochrome charakteristisch. Wenn man Farbstoffe so wählt, dass das Emissionsspektrum des einen dem Anregungsspektrum des anderen entspricht ($E1=A2$) und diese in räumliche Nähe bringt, kann es zu einem Energietransfer kommen.

Das fluoreszierende Donor-Molekül (Fluoreszein) am 3'-Endes der Sensor-Sonde (bzw. der Anker-Sonde wie im Fall von rs13412102, rs1441090, rs2289472 and rs4663396) wird auf seiner spezifischen Fluoreszenz-Wellenlänge (483 nm) angeregt und so Energie auf das Akzeptor-Molekül am 5'-Endes (LightCycler Red 610, 640, 670) der Anker-Sonde (bzw. der Sensor-Sonde im Fall von rs13412102, rs1441090, rs2289472 and rs4663396) übertragen. Das vom Akzeptor-Molekül emittierte spezifische Fluoreszenz-Signal wird dann von der optischen Einheit des LightCycler-480-Gerätes erfasst. Die Sensor-Sonde passt exakt zu einem Allel jedes SNPs, idealerweise ist es das seltener vorkommende. Bindet also das andere Allel an die Sensor-Sonde, entsteht durch das eine nicht passende Basenpaar ein sogenanntes Mismatch, was eine erniedrigte Schmelztemperatur zur Folge hat. (Förster 1948, Holzapfel 2007, Szöllösi 1998)

3.1.4 Genotypisierung der *ATG16L1*-SNPs

Die SNPs des *ATG16L1*-Gens wurden mittels quantitativer PCR und Schmelzkurvenanalyse genotypisiert. Dafür wurden für jeden SNP eine Sensor- und eine Anker-FRET-Sonde (FRET = Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer), je einen Vorwärts- und einen Rückwärts-Primer und ein LightCycler-Instrument benötigt.

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 5 µl und enthielt 25 ng genomische DNA, 1x LightCycler 480 Genotyping MasterMix (Roche Diagnostics), je 2,5 pmol der Primer und 0,75 pmol der jeweiligen FRET-Sonden (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland). Im Falle von rs1441090 wurde die Konzentration des Vorwärts-Primers auf 0,5 pmol, bei rs2241880 die des Rückwärts-Primers auf 1,25 pmol reduziert. Zum Teil wurden zwei SNPs in einer Multiplex-Reaktion gemeinsam analysiert. Es wurden jeweils rs13412102 + rs12471449, rs6431660 + rs2289472, rs2241880 + rs4663396 und rs2241879 + rs3792106 miteinander kombiniert.

Die PCR beinhaltete jeweils einen initialen Schritt zur Denaturierung und im Anschluss 45 Amplifikations-Zyklen. Die Schmelzkurvenanalyse bestand aus einem Denaturierungsschritt, einer schnellen Abkühlung auf 40 °C und wieder einer langsamen Erhöhung der Temperatur auf 80 °C, wobei bei jedem Grad Celsius Temperaturerhöhung die Intensität der Fluoreszenz gemessen wurde. Alle Sequenzen der Primer und FRET-Sonden sind mit der jeweiligen Hybridisierungstemperatur für Genotypisierung und Sequenzanalyse in Tabelle 14 zusammengefasst.

Durch Schmelzkurvenanalyse konnte jeder Probe zu dem jeweils untersuchten SNP ein Genotyp zugeordnet werden. Fehlerhafte oder ausgefallene Proben wurden erneut getestet und nur bei eindeutiger Zuordnungsmöglichkeit in die Statistik aufgenommen.

3.1.4.1 FRET-Sonden und Primer

Als Sensor wird diejenige Sonde bezeichnet, die im Bereich der variablen Sequenz bindet. Er ist 100 % homolog zum Wildtyp-Allel und bindet an den Einzelstrang, der zur instabilsten Fehlpaarung führt. Dabei sollte die Mutationsstelle etwa in der Mitte der Sonde liegen, in jedem Fall aber nicht näher als vier Basen vom Rand. Die Anker-Sonde (Anchor) hybridisiert an den nicht-polymorphen Anteil der Ziel-DNA. Sowohl Donor- als auch Akzeptorsonde können als Sensor fungieren.

Die Schmelztemperatur (T_m) der Sensor-Sonde sollte geringer sein als die der Anker-Sonde, was durch geringere Sequenzlänge und durch geringeren G/C-Gehalt erreicht werden kann.

Weiterhin sollten G/T-Fehlpaarungen vermieden werden, da sie nur zu einer T_m -Reduktion von 2-4 °C führen, und die Sonde besser an den komplementären Strang gelegt werden. Sowohl für Sensor- als auch für Anchor-Sonde gilt, dass die T_m größer sein sollte als die Primer-Annealing-Temperatur, fest bindende Sequenzmotive vermieden werden sollten, da sie den Effekt der Fehlpaarung überdecken könnten, und keine Stem-Loops enthalten sein dürfen.

Die PCR-Primer sollten nicht auf variablen Bereichen liegen, keine zu den Sonden komplementären Sequenzen enthalten und ähnliche T_m -Werte besitzen. (Roche 2007)

Beim Primerdesign sollten folgende Punkte grundsätzlich beachtet werden (Degen 2006):

- Primer sollten eine Länge von etwa 18-30 Basen haben; diese Angabe kann variieren für hitzestabilere Enzyme. Lange Primer sorgen für eine größere Spezifität, zeigen aber eine schlechtere Effektivität in der Anlagerung.
- Sie sollten keine Sekundärstruktur aufweisen
- Das G/C-Verhältnis sollte zwischen 40 und 60 % liegen
- G/C- und A/T-reiche Abschnitte sollten ausgewogen verteilt sein
- Die Primer sollten untereinander nicht an ihrem 3'-Ende sowie nicht mit sich selbst komplementär sein.
- Die Schmelztemperatur sollte eine Anlagerung zwischen 55° und 65°C ermöglichen.

3.1.4.2 Schmelzkurventechnologie

Durch Erhitzen der DNA werden die Doppelstränge zu Einzelsträngen aufgeschmolzen. Dieser Vorgang kann durch fluoreszierende Farbstoffe oder Hybridisierungssonden sichtbar gemacht werden. Eine Schmelzkurve wird durch kontinuierliche Detektion der Fluoreszenz während einer langsamen Temperaturerhöhung erzeugt (z.B. 0,1 °C/Sekunde). Bei Erreichen des spezifischen Schmelzpunktes T_m liegen definitionsgemäß 50 % der DNA als Einzelstränge vor. Zu den Faktoren, die die T_m beeinflussen gehören der GC-Anteil, die Länge des Fragments sowie die Ionenkonzentration (z.B. $MgCl_2$).

Stabilität der Basenpaarungen:

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

Aus dieser Darstellung lässt sich ablesen, dass die Paarung G:C stabiler ist als A:T, die statt drei (G:C) nur zwei Wasserstoff-Brücken aufweist. Die anderen gezeigten Basenpaarungen werden als Fehlpaarung, sog. Mismatch, bezeichnet und sind durchweg hitzelabiler als G:C und A:T.

Liegt also im Bereich des Sensors eine Einzelbasenmutation vor, führt dies zu einem Mismatch und damit zur Destabilisierung des Sonden/Zielsequenz-Komplexes. Daraus folgt ein früheres Abdissoziieren der Sonden, die T_m ist erniedrigt.

Sind in einer DNA-Probe beide Allele vorhanden, liegt also ein heterozygoter Genotyp vor, so sind in der Schmelzkurve zwei Schmelzpunkte nachweisbar (siehe Abbildung 14, Holzapfel 2007, Hummerich 2008).

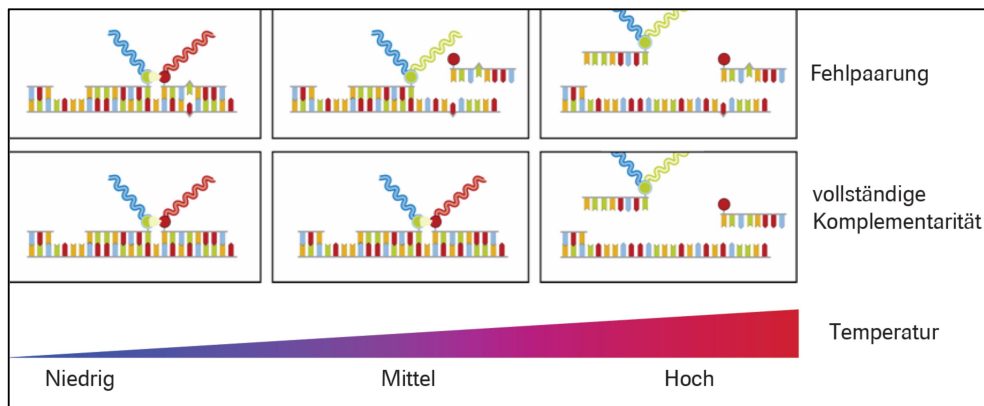


Abbildung 13: Unterschiede in der Zielsequenz führen zu abweichenden T_m -Werten, Abbildung aus Hummerich (Hummerich 2008)

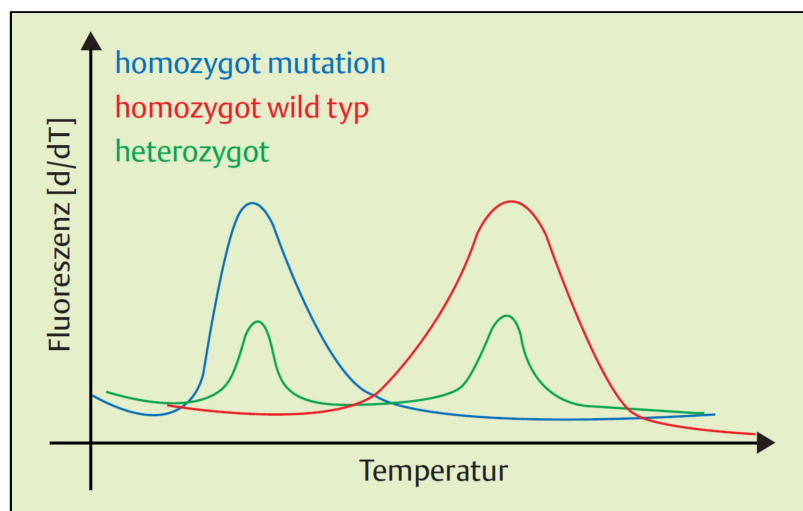


Abbildung 14: Genotypisierung mittels Schmelzpunktanalyse, Abbildung aus Holzapfel et al. (Holzapfel 2007). Nur der heterozygote Genotyp weist Peaks bei beiden Schmelzpunkten auf (grün).

3.1.4.3 RT-PCR-Programm

Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Vorschriften zur Durchführung der Genotypisierung mittels RT-PCR für die verwendeten Primerkombinationen mit Angabe der jeweiligen Hybridisierungstemperatur.

rs13412102	rs12471449	rs6431660	rs2289472	rs1441090	rs2241880=rs300A	rs4663396	rs2241879	rs3792106	
SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 5	SNP 4	SNP 6	SNP 9	SNP 7	SNP 8	
640 nm	610 nm	670 nm	610 nm	640 nm	610 nm	670 nm	670 nm	640 nm	
60 °C	60 °C	57 °C	60 °C	60 °C	60 °C	60 °C	60 °C	60 °C	
Für 2x96 Proben (2 Platten)		Für 2x96 Proben (2 Platten)		Für 2x96 Proben (2 Platten)		Für 2x96 Proben (2 Platten)		Für 2x96 (2 Platten)	
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	
rs13412102_F	rs6431660_S	rs6431660_A	rs1441090_F	rs2241880_F	rs2241879_F	rs2241879_A	rs2241879_A	rs2241879_A	
rs13412102_A	rs6431660_A	rs6431660_G] (A)	rs1441090_R	rs2241880_R	rs2241879_A	rs2241879_A	rs2241879_A	rs2241879_A	
rs13412102_[T] (A)	rs6431660_[G] (A)	rs6431660_Anc (A)	rs1441090_[C] (S)	rs2241880_[G] (A)	rs2241879_[C] (S)	rs2241879_[C] (S)	rs2241879_[C] (S)	rs2241879_[C] (S)	
rs13412102_Anc (A)	rs2289472_S	rs2289472_A	rs1441090_Anc (S)	rs2241880_Anc (A)	rs4663396_F	rs3792106_Anc (S)	rs3792106_Anc (S)	rs3792106_Anc (S)	
rs12471449_S	rs2289472_A	rs2289472_A	rs1441090_Anc (S)	rs4663396_A	rs3792106_F	rs3792106_R	rs3792106_R	rs3792106_R	
rs12471449_R	rs2289472_A	rs2289472_A	rs1441090_Anc (S)	rs4663396_A	rs3792106_R	rs3792106_R	rs3792106_R	rs3792106_R	
rs12471449_[C] (S)	rs2289472_[G] (A)	rs2289472_[G] (A)	rs1441090_Anc (S)	rs4663396_[T] (A)	rs3792106_R	rs3792106_[A] (S)	rs3792106_[A] (S)	rs3792106_[A] (S)	
rs12471449_Anc (S)	rs2289472_Anc (A)	rs2289472_Anc (A)	rs1441090_Anc (S)	rs4663396_Anc (A)	rs3792106_Anc (S)	rs3792106_Anc (S)	rs3792106_Anc (S)	rs3792106_Anc (S)	
MasterMix	MasterMix	MasterMix	MasterMix	MasterMix	MasterMix	MasterMix	MasterMix	MasterMix	
360 µl	360 µl	360 µl	360 µl	648 µl	390 µl	390 µl	360 µl	360 µl	
60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	12 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	
60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	30 µl	60 µl	60 µl	60 µl	
60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	
60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	
60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	
60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	
60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	
240 µl	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl	
1080 µl	1080 µl	1080 µl	1080 µl	1080 µl	1080 µl	1080 µl	1080 µl	1080 µl	
= 4 x	= 4 x	= 4 x	= 4 x	= 4 x	= 4 x	= 4 x	= 4 x	= 4 x	
270 µl	270 µl	270 µl	270 µl	270 µl	270 µl	270 µl	270 µl	270 µl	

Für 4x96 (4 Platten) zwei Mal den Ansatz (in 2 Tubes)

-> 2 x 1080 µl = 8 x 270 µl

Tabelle 14: RT-PCR Protokoll für die Genotypisierung: Einfache Ansätze und Duplex-Ansätze

3.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

In der vorliegenden Studie wurde das Verfahren in der Vorbereitung für die RT-PCR-Läufe zur Auswahl der am spezifischsten funktionierenden Primerkombination und zur Überprüfung der Duplex-Ansetzungen eingesetzt. Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurde die Entscheidung für den asymmetrischen Ansatz der Primer für rs1441090 und rs2241880 getroffen.

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine molekularbiologische Standardmethode, mit der sich Nukleinsäure-Abschnitte (RNA oder DNA) der Größe nach auftrennen lassen. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Fragmente durch eine Gelmatrix aus Agarosepolymeren. Kleine Moleküle bewegen sich schneller durch das Gel, so dass eine Auftrennung nach Stranglänge möglich ist. Durch Vergleich mit DNA-/RNA-Strängen bekannter Länge, sogenannten „DNA ladders“, ist auch eine Größenabschätzung möglich. Durch die Auftrennung der Nukleinsäure-Stränge ist es möglich, diese voneinander isoliert für weitere Untersuchungen zurückzugewinnen, oder auch zu kontrollieren, ob in der zu untersuchenden Probe die erwarteten Banden in der erwarteten Anzahl ohne Verunreinigungen zu erkennen sind.

Dazu wurden 5 µl PCR-Amplifikat mit 3 µl Auftragspuffer vermischt und in einem mit 4 µl Ethidiumbromid angereicherten Agarosegel (2,5%-ig) aufgetragen. Das Gel wurde in einer mit Pufferlösung gefüllten Kammer für 90 Minuten unter eine konstante Spannung von 120V/cm Gellänge gesetzt. Zur Größenermittlung wurden 8 µl eines 100-bp-Markers mit auf das Gel pipettiert. Die Produkte wurden durch das interkalierende fluoreszierende Ethidiumbromid in einem UV-Transluminator sichtbar gemacht und mittels Gammakamera digital fotografiert.

3.1.6 Konventionelle PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse wurden durch Sequenzanalyse von repräsentativen Proben aller vorkommenden Genotypen bestätigt. Zur Vorbereitung der Sequenzierung war eine DNA-Amplifikation mittels konventioneller PCR nötig.

Für die Durchführung der PCR wurde für einen Ansatz mit einem Endvolumen von 100 µl folgendes Protokoll angewendet:

Substanz	Menge
genomische DNA	250 ng
PCR-Puffer	1x
dNTP-Mix	0,5 mM
HotStar Plus Taq™ DNA Polymerase	2,5 Einheiten
Primer	je 10 pmol
MgCl ₂	zu einer Endkonzentration von 2 mM

Tabelle 15: PCR-Protokoll für die DNA-Amplifikation in der Vorbereitung der Sequenzanalyse

Die PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt, 35 Zyklen Amplifikation und einem abschließenden Extensionsschritt:

PCR-Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 sec	35x
Primer-Annealing	55 °C	30 sec	35x
Elongation	72 °C	30 sec	35x
Elongation	72 °C	10 min	1x
Kühlung	8 °C	∞	1x

Tabelle 16: PCR-Programm für die DNA-Amplifikation in der Vorbereitung der Sequenzanalyse

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und konnten so der mit der Sequenzierung beauftragten Firma (Sequiserie, Vaterstetten, Germany) übergeben werden.

3.1.7 Berechnung der Kopplungsungleichgewichte

Zusätzlich wurde die Stärke des Kopplungsungleichgewichts der neun *ATG16LI*-SNPs in der europäischen Bevölkerung analysiert. Hierzu wurde die webbasierte Applikation LDlink verwendet (<http://analysistools.nci.nih.gov/LDlink>)

3.1.8 Statistische Analysen

Die Datenauswertung erfolgte mit SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) und R-2.4.1. (<http://cran.r-project.org>). Alle in der Studie verwendeten genetischen Marker wurden auf

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht in der Kontrollpopulation getestet. Für den Vergleich kategorialer Variablen wurde der exakte Test nach Fisher oder der χ^2 -Test angewendet. Für quantitative Variablen wurde der Student's-t-Test verwendet. Einzelmarker-Allel-Tests wurden mit dem exakten Test nach Fisher durchgeführt. Alle Tests wurden zweiseitig mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gerechnet. Odds-Ratios wurden bei jedem SNP für das Minor-Allel berechnet. Für multiple Vergleiche wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Auf Interaktionen zwischen verschiedenen Polymorphismen wurde mit logistischer Regressionsanalyse getestet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der untersuchten *ATG16L1*-SNPs auf die Krankheits-suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

4.1.1 Signifikante Assoziation der *ATG16L1*-Polymorphismen mit Morbus Crohn

Die Genotypfrequenzen der neun *ATG16L1*-SNPs befanden sich für alle drei Gruppen der Studienpopulation (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Kontrollgruppe) im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, so dass systematische Fehler bei der Zusammenstellung der Studienpopulation sowie bei der Genotypisierung nicht anzunehmen waren.

Alle *ATG16L1*-Genvarianten zeigten signifikante Assoziationen mit Morbus Crohn mit p-Werten von $2,0 \times 10^{-2}$ bis $6,0 \times 10^{-5}$ (siehe Tabelle 17). Der *ATG16L1*-SNP rs2241879 zeigte die stärkste Assoziation mit Morbus Crohn ($p = 6,0 \times 10^{-5}$, OR 0,77, 95 % KI 0,69 - 0,88). Eine starke Assoziation konnte unter anderem auch für SNP rs2241880 (T300A) nachgewiesen werden ($p = 1,5 \times 10^{-4}$, OR 0,79, 95 % KI 0,69 - 0,89).

Für alle neun *ATG16L1*-SNPs war die MAF (Minor-Allel-Frequenz) in der Morbus Crohn-Population niedriger als in der Kontrollgruppe, was einen protektiven Effekt des Minor-Allels gegen Morbus Crohn vermuten lässt.

In der folgenden Tabelle sind die MAF für Morbus Crohn-Patienten und für die Kontrollgruppe aufgelistet.

SNP	Minor Allel	Morbus Crohn n = 768			Kontrollgruppe n = 1615
		MAF	p-Wert	OR (95 % KI)	MAF
rs13412102	T	0,345	$2,5 \times 10^{-4}$	0,79 (0,69-0,90)	0,401
rs12471449	G	0,111	$2,0 \times 10^{-2}$	0,80 (0,66-0,97)	0,135
rs6431660	A	0,417	$7,0 \times 10^{-5}$	0,78 (0,69-0,88)	0,479
rs1441090	T	0,045	$7,6 \times 10^{-3}$	0,68 (0,51-0,91)	0,064
rs2289472	G	0,419	$8,0 \times 10^{-5}$	0,78 (0,69-0,88)	0,479

SNP	Minor Allel	Morbus Crohn n = 768			Kontrollgruppe n = 1615
		MAF	p-Wert	OR (95 % KI)	MAF
rs2241880 (=T300A)	A	0,417	$1,5 \times 10^{-4}$	0,79 (0,69-0,89)	0,476
rs2241879	C	0,418	$6,0 \times 10^{-5}$	0,77 (0,69-0,88)	0,479
rs3792106	A	0,364	$1,9 \times 10^{-4}$	0,79 (0,70-0,90)	0,421
rs4663396	T	0,164	$6,5 \times 10^{-3}$	0,80 (0,68-0,94)	0,196

Tabelle 17: Minor-Allel-Frequenzen (MAF), p-Werte des Allel-Tests und Odds-Ratios (OR, für das Minor-Allel) mit 95 % Konfidenzintervall (KI) für Morbus Crohn-Patienten und für die Kontrollgruppe. Signifikante p-Werte hervorgehoben.

4.1.2 Keine Assoziation der *ATG16L1*-Polymorphismen mit Colitis ulcerosa in acht von neun Fällen

Mit der Ausnahme von rs6431660 gab es im Gegensatz zu Morbus Crohn keine Assoziationen zwischen den *ATG16L1*-SNPs und der Suszeptibilität für Colitis ulcerosa (siehe Tabelle 18). Zudem war die Assoziation zwischen rs6431660 und Colitis ulcerosa zwar signifikant, aber nur sehr schwach ausgeprägt ($p = 4,1 \times 10^{-2}$, OR 0,85, 95 % KI 0,73 – 1,00).

Die MAF für Colitis ulcerosa-Patienten und für die Kontrollgruppe sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

SNP	Minor Allel	Colitis ulcerosa n = 507			Kontrollgruppe n = 1615
		MAF	p-Wert	OR (95 % KI)	MAF
rs13412102	T	0,376	$4,1 \times 10^{-1}$	0,93 (0,80-1,09)	0,401
rs12471449	G	0,121	$3,1 \times 10^{-1}$	0,88 (0,70-1,11)	0,135
rs6431660	A	0,442	$4,1 \times 10^{-2}$	0,85 (0,73-1,00)	0,479
rs1441090	T	0,055	$3,9 \times 10^{-1}$	0,86 (0,61-1,19)	0,064
rs2289472	G	0,450	$1,3 \times 10^{-1}$	0,89 (0,76-1,03)	0,479
rs2241880 (=T300A)	A	0,453	$2,3 \times 10^{-1}$	0,91 (0,78-1,06)	0,476

SNP	Minor Allel	Colitis ulcerosa n = 507			Kontrollgruppe n = 1615
		MAF	p-Wert	OR (95 % KI)	MAF
rs2241879	C	0,452	$1,5 \times 10^{-1}$	0,90 (0,77-1,04)	0,479
rs3792106	A	0,390	$1,1 \times 10^{-1}$	0,88 (0,75-1,03)	0,421
rs4663396	T	0,182	$3,6 \times 10^{-1}$	0,91 (0,75-1,11)	0,196

Tabelle 18: Minor-Allel-Frequenzen (MAF), p-Werte des Allel-Tests und Odds-Ratios (OR, für das Minor-Allel) mit 95 % Konfidenzintervall (KI) für Colitis ulcerosa-Patienten und für die Kontrollgruppe. Signifikante p-Werte hervorgehoben.

4.1.3 Absolute und relative Allelfrequenzen der *ATG16L1*-Polymorphismen

Die folgende Tabelle zeigt die absoluten und relativen Allelfrequenzen für alle drei Kohorten Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten und Kontrollgruppe.

Polymorphismus	Allel	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Kontrollgruppe
rs13412102	C	1087 (0.655)	563 (0.624)	1678 (0.599)
	T	573 (0.345)	339 (0.376)	1082 (0.401)
rs12471449	C	1510 (0.889)	807 (0.879)	2423 (0.865)
	G	188 (0.111)	111 (0.121)	377 (0.135)
rs6431660	G	971 (0.583)	507 (0.558)	1345 (0.519)
	A	695 (0.417)	401 (0.442)	1247 (0.481)
rs1441090	C	1605 (0.955)	873 (0.945)	2636 (0.936)
	T	75 (0.045)	51 (0.055)	180 (0.064)
rs2289472	A	985 (0.581)	504 (0.550)	1463 (0.521)
	G	709 (0.419)	412 (0.450)	1347 (0.479)
rs2241880 (=T300A)	G	959 (0.583)	496 (0.547)	1424 (0.524)
	A	685 (0.417)	410 (0.453)	1294 (0.476)
rs2241879	T	983 (0.582)	501 (0.548)	1517 (0.521)
	C	705 (0.418)	413 (0.452)	1397 (0.479)
rs3792106	G	1069 (0.636)	549 (0.610)	1670 (0.579)
	A	613 (0.364)	351 (0.390)	1212 (0.421)

Polymorphismus	Allel	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Kontrollgruppe
rs4663396	C	1418 (0.836)	746 (0.818)	2341 (0.804)
	T	278 (0.164)	166 (0.182)	571 (0.196)

Tabelle 19: Allelfrequenzen für Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie für die Kontrollgruppe.

4.1.4 Absolute und relative Genotypfrequenzen der *ATG16L1*-Polymorphismen

Die folgende Tabelle zeigt die absoluten und relativen Genotypfrequenzen für alle drei Kohorten Morbus Crohn-Patienten, Colitis ulcerosa-Patienten und Kontrollgruppe.

Polymorphismus	Genotyp	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa		Kontrollgruppe	
rs13412102	CC	345	0,416	183	0,406	481	0,356
	CT	397	0,478	197	0,437	656	0,486
	TT	88	0,106	71	0,157	213	0,158
	n	830	1,000	451	1,000	1350	1,000
rs12471449	CC	671	0,790	350	0,763	1047	0,748
	CG	168	0,198	107	0,233	329	0,235
	GG	10	0,012	2	0,004	24	0,017
	n	849	1,000	459	1,000	1400	1,000
rs6431660	GG	274	0,329	140	0,308	354	0,273
	GA	423	0,508	227	0,500	637	0,492
	AA	136	0,163	87	0,192	305	0,235
	n	833	1,000	454	1,000	1296	1,000
rs1441090	CC	767	0,913	411	0,890	1236	0,878
	CT	71	0,085	51	0,110	164	0,116
	TT	2	0,002	0	0,000	8	0,006
	n	840	1,000	462	1,000	1408	1,000
rs2289472	AA	278	0,328	140	0,306	391	0,278
	AG	429	0,506	224	0,489	681	0,485
	GG	140	0,165	94	0,205	333	0,237
	n	847	1,000	458	1,000	1405	1,000

Polymorphismus	Genotyp	Morbus Crohn		Colitis ulcerosa		Kontrollgruppe	
rs2241880 (=T300A)	GG	271	0,330	134	0,296	391	0,288
	GA	417	0,507	228	0,503	642	0,472
	AA	134	0,163	91	0,201	326	0,240
	n	822	1,000	453	1,000	1359	1,000
rs2241879	TT	279	0,331	138	0,302	408	0,280
	TC	425	0,504	225	0,492	701	0,481
	CC	140	0,166	94	0,206	348	0,239
	n	844	1,000	457	1,000	1457	1,000
rs3792106	GG	339	0,403	159	0,353	500	0,347
	GA	391	0,465	231	0,513	670	0,465
	AA	111	0,132	60	0,133	271	0,188
	n	841	1,000	450	1,000	1441	1,000
rs4663396	CC	592	0,698	301	0,660	938	0,644
	CT	234	0,276	144	0,316	465	0,319
	TT	22	0,026	11	0,024	53	0,036
	n	848	1,000	456	1,000	1456	1,000

Tabelle 20: Genotyp-Frequenzen für Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie für die Kontrollgruppe

4.1.5 Berechnung des Kopplungsungleichgewichts der *ATG16L1*-Polymorphismen

Zusätzlich wurden die sieben Polymorphismen im *ATG16L1*-Gen hinsichtlich des Kopplungsungleichgewichtes untersucht. Ein Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei SNPs besteht, wenn Allelkombinationen dieser zwei Polymorphismen in einem Haplotyp in der untersuchten Population häufiger vorkommen, als man es von einer unabhängiger Kombination der Allele entsprechend ihren Allelhäufigkeiten erwarten würde.

Die Parameter r^2 und D' bilden die Kopplungsungleichgewichte üblicherweise in gleicher Richtung ab. Das heißt, ein hohes D' bedeutet meistens auch ein hohes r^2 , somit besteht ein Kopplungsungleichgewicht. Haben allerdings beide Loci seltene Allele, die nicht gemeinsam auf einem Haplotyp auftreten, oder sehr unterschiedliche Allelfrequenzen, kann es passieren,

dass D' hoch ist, während r^2 niedrig ist. In diesem Fall besteht zwar ein hohes Kopplungsungleichgewicht (hohes D'), jedoch tritt ein selten vorkommendes Allel auf Grund seiner Seltenheit in den meisten Fällen dennoch nicht mit dem anderen Allel auf (r^2 niedrig). Dies ist für einige *ATG16LI*-Allelkombinationen der Fall.

Die Analysen des Kopplungsungleichgewichts sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 dargestellt. Den Tabellen ist zu entnehmen, dass bis auf rs13412102 mit rs12471449 zwischen allen untersuchten SNPs ein Kopplungsungleichgewicht besteht. Zwischen den SNPs rs13412102 und rs4663396 ist es lediglich mäßig ausgeprägt, in den übrigen Fällen besteht ein hohes Kopplungsungleichgewicht. Für das Risikoallel rs2241880 (=T300A) ist D' stets $> 0,9$.

RS_number	rs13412102	rs12471449	rs6431660	rs1441090	rs2289472	rs2241880	rs2241879	rs3792106	rs4663396
rs13412102		0,017	0,958	0,959	0,958	0,958	0,958	0,725	0,283
rs12471449			1,0	0,972	0,981	0,981	0,981	1,0	1,0
rs6431660				1,0	0,996	0,996	0,996	0,995	0,989
rs1441090					1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
rs2289472						1,0	1,0	0,995	0,978
rs2241880							1,0	0,995	0,978
rs2241879								0,995	0,978
rs3792106									0,323
rs4663396									

Tabelle 21: Kopplungsungleichgewichtsanalysen für die *ATG16LI*-SNPs: Werte für D' .

RS_number	rs13412102	rs12471449	rs6431660	rs1441090	rs2289472	rs2241880	rs2241879	rs3792106	rs4663396
rs13412102		0,0	0,699	0,058	0,699	0,699	0,699	0,524	0,025
rs12471449			0,128	0,355	0,123	0,123	0,123	0,169	0,539
rs6431660				0,048	0,992	0,992	0,992	0,751	0,232
rs1441090					0,048	0,048	0,048	0,063	0,202
rs2289472						1,0	1,0	0,751	0,227
rs2241880							1,0	0,751	0,227
rs2241879								0,751	0,227
rs3792106									0,033
rs4663396									

Tabelle 22: Kopplungsungleichgewichtsanalysen für die *ATG16L1*-SNPs: Werte für r^2 .

4.2 Einfluss der *ATG16L1*-Polymorphismen auf den Phänotyp von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

4.2.1 Analyse bezüglich Genotyp-Phänotyp-Korrelation von *ATG16L1* mit Morbus Crohn

Die Untersuchung eines möglichen Einflusses der *ATG16L1*-Varianten auf den Phänotyp zeigte keine signifikante Korrelation zwischen den Genotypen und auftretenden Krankheitscharakteristika.

Patienten mit verschiedenen rs2241880-Genotypen zeigten nach Korrektur für multiple Tests keine Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens folgender Krankheitscharakteristika: Erkrankungsalter, Krankheitsbild (entsprechend der Montreal-Klassifikation nach Silverberg 2005), extraintestinale Manifestationen, andere Komplikationen von Morbus Crohn wie Stenose-, Fistel-, oder Abszessbildung sowie Einsatz von Immunsuppressiva. Tabelle 23 fasst Krankheitscharakteristika von Patienten mit Morbus Crohn in Abhängigkeit von dem Status ihres SNP-rs2241880(=T300A)-Genotyps zusammen. Es traten in der univariaten Auswertung schwache Assoziationen von rs2241880 mit ilealem und ileokolischem Phänotyp auf, die jedoch nach Bonferroni-Korrektur verschwanden. In ähnlicher Weise gab es eine schwache Assoziation von Morbus Crohn-bedingten Operationen mit dem rs2241880-

Genotyp ($p = 0,018$, OR 0,72, 95 % KI 0,54-0,95), die jedoch ebensowenig den Kriterien der Bonferroni-Korrektur standhalten konnte.

rs2241880-(T300A)-Genotyp	AA	AG	GG	P_G	OR _G (95 % CI)
Alter bei Diagnosestellung (Jahre)					
(N = 425)					
Mittelwert ± SD	27,34 ± 11,63	29,24 ± 12,44	25,99 ± 9,88	0,451	1,11
Range	9-71	11-71	7-67		(0,85-1,46)
Alter bei Diagnosestellung					
(N = 425)					
≤16 Jahre (A1)	9 (11,8 %)	22 (10,6 %)	18 (12,8 %)	1,000	0,96 (0,45-2,08)
17-40 Jahre (A2)	57 (75,0 %)	152 (73,1%)	112 (79,4 %)	0,884	1,03 (0,38- 1,84)
>40 Jahre (A3)	10 (13,2 %)	34 (16,3 %)	11 (7,8 %)	1,000	0,98 (0,47-2,04)
Lokalisation					
(N = 454)					
Ileum (L1)	10 (12,7 %)	28 (12,8 %)	12 (7,7 %)	0,034	2,08 (1,08-4,02)
Kolon (L2)	15 (19,0 %)	34 (15,5 %)	26 (16,7 %)	0,751	1,12 (0,60-2,09)
Ileum/Kolon (L3)	40 (50,6 %)	139 (63,5 %)	93 (59,6 %)	0,014	0,54 (0,336-0,87)
Isoliert oberer GI-Trakt (L4)	14 (17,7 %)	18 (8,2 %)	25 (16,0 %)	0,206	1,52 (0,79-2,93)
Klinisches Bild* (behavior)					
(N = 428)					
Keine Strikturen, keine Penetrationen (B1)	21 (28,4 %)	48 (23,3 %)	26 (17,6 %)	0,168	0,67 (0,38-1,17)
Strikturen (B2)	17 (23,0 %)	53 (25,7 %)	40 (27,0 %)	0,661	1,19 (0,66-2,16)
Penetrationen (B3)	36 (48,6 %)	105 (51,0 %)	82 (55,4 %)	0,525	1,18 (0,72-1,95)

rs2241880-(T300A)-Genotyp	AA	AG	GG	P _G	OR _G (95 % CI)
Einsatz von Immunsuppressiva[†] (N = 279)	41 (78,8 %)	102 (81,6 %)	89 (87,2 %)	0,140	0,72 (0,46-1,12)
Morbus Crohn-bedingte Operationen[‡] (N = 420)	32 (43,2 %)	97 (48,3 %)	85 (58,6 %)	0,018	0,72 (0,54-0,94)
Fistelbildung (N = 431)	36 (48,0 %)	105 (50,7 %)	82 (55,0 %)	0,286	0,86 (0,66-1,13)
Stenosebildung (N = 433)	45 (60,0 %)	127 (60,8 %)	100 (67,1 %)	0,636	0,84 (0,64-1,11)

Für jede Variable ist die Anzahl der eingeschlossenen Patienten angegeben. P_G = p-Wert für die Differenzierung zwischen Trägern und Nicht-Trägern des G-Allels; OR_G = entsprechende Odds-Ratios und 95 %-Konfidenzintervall (95 % CI). Für das Alter bei Diagnose sind die p-Werte basierend auf dem Median-Split angegeben.

*Das klinische Bild (behavior) wurde gemäß der Montreal Klassifikation definiert. Als strikturierender Verlauf wurde das Vorliegen einer Stenose ohne Penetration definiert. Die Diagnose einer Stenose wurde chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch (MR-Enteroklysmas) gestellt.

[†]Der Einsatz von Immunsuppressiva steht für den Einsatz von Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat, Infliximab und/oder Adalimumab.

[‡]Nur Operationen auf Grund Morbus Crohn-spezifischer Probleme wurden eingeschlossen (z.B. Fistulektomie, Kolektomie, Ileostoma)

Tabelle 23: Assoziation zwischen rs2241880-Genotypen und Krankheitscharakteristika bei Morbus Crohn in der Subkohorte des Münchner CED-Zentrums (N = 454), für das detaillierte Phänotyp-Daten gemäß der Montreal-Klassifikation verfügbar waren.

4.2.2 Analyse bezüglich Genotyp-Phänotyp-Korrelation von *ATG16L1* mit Colitis ulcerosa

Die untersuchten *ATG16L1*-Polymorphismen zeigten nur in einem Fall eine schwache Assoziation mit Colitis ulcerosa. Eine signifikante Assoziation zwischen *ATG16L1*-Varianten und bestimmten Colitis ulcerosa-Phänotypen konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

4.3 Sequenzierung

In der Sequenzierung traten die untersuchten Polymorphismen in erwarteter Weise auf, wie aus der folgenden Tabelle zu entnehmen ist. Die vollständigen Ergebnisse der Sequenzierung sind im Anhang aufgelistet.

SNP	Probe	polymorphe Position
rs13412102	B1	Pos.75 Y(=C+T)
	B3	Pos.75 T
	B8	Pos.75 C
rs6431660	B2	Pos.158 R(=G+A)
	B3	Pos.158 A
	B8	Pos.158 G
rs1441090	B3	Pos.353 C
	B11	Pos.353 Y(=C+T)
	B299	Pos.353 T
rs2289472	B2	Pos.132 R(=G+A)
	B4	Pos.132 G
	B8	Pos.132 A
rs2241880	B193	Pos.71 R(=G+A)
	B195	Pos.71 G
	B215	Pos.71 A
rs2241879	B2	Pos.211 Y(=C+T)
	B4	Pos.211 C
	B8	Pos.211 T
rs3792106	B2	Pos.214 R(=G+A)
	B4	Pos.214 A
	B8	Pos.214 G
rs4663396	B2	Pos.81 Y(=C+T)
	B4	Pos.81 C
	B6	Pos.81 T
rs12471449	B2	Pos.217 S(=G+C)
	B3	Pos.217 C
	B14	Pos.217 G
	B1	Pos.217 S(=G+C)

Tabelle 24: Polymorphe Positionen der untersuchten SNPs

4.4 Analyse zu Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis) zwischen *ATG16L1* und *IL23R*, *NOD2* sowie *SLC22A4/5* bei Morbus Crohn-Patienten

Epistasis von *ATG16L1*-Varianten mit den vier wichtigen CED-Subzeptibilitätsgenen *NOD2* (Hampe 2001, Hugot 2001, Ogura 2001b), *SLC22A4*, *SLC22A5* (Noble 2005, Peltekova 2004, Török 2005) und *IL23R* (Duerr 2006, Libioulle 2007, Tremelling 2007) wurde analysiert, um mögliche Interaktionen aufzudecken. Berücksichtigt wurden dabei jeweils die Effekte auf den

Phänotyp sowie die Krankheits-Suszeptibilität insgesamt. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren dies die Gen-Loci mit der stärksten Assoziation mit Morbus Crohn.

In allen drei Untergruppen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen) befanden sich die Frequenzen der analysierten zehn *IL23R*-Varianten, der *NOD2*-Varianten (p.Arg702Trp, p.Gly908Arg, p.Leu1007fsX1008) und der SNPs in *SLC22A4* (1672 C → T) und *SLC22A5* (-207 G → C) im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Mit Ausnahme einer schwachen Interaktion zwischen bestimmten *ATG16L1*- und *IL23R*-Varianten bei Morbus Crohn konnten keine Hinweise auf Epistasis zwischen den anderen genannten Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *SLC22A4*, *SLC22A5* und *ATG16L1* gefunden werden. Nach Korrektur für multiple Tests erreichte aber keiner der berechneten p-Werte Signifikanzniveau.

<i>IL23R</i> -Variante	<i>ATG16L1</i> -Variante	p-Wert
rs1004819	rs6431660	0,01
rs1004819	rs3792106	0,02
rs2201841	rs12471449	0,02
rs2201841	rs6431660	0,02
rs2201841	rs2241879	0,02
rs2201841	rs3792106	0,02
rs1343151	rs12471449	0,01
rs10889677	rs12471449	0,03
rs10889677	rs6431660	0,01
rs10889677	rs2241880	0,02
rs10889677	rs2241879	0,01
10889677	rs3792106	0,02
rs10889677	rs4663396	0,02
rs1495965	rs13412102	0,03

Tabelle 25: Einzelne *ATG16L1*-Varianten zeigten eine Epistasis zu bestimmten *IL23R*-Varianten, jedoch erreichte nach Korrektur für multiple Testungen (Bonferroni-Korrektur) keiner der berechneten p-Werte Signifikanzniveau.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von *ATG16L1*-Varianten auf die Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die vorliegende Studie bestätigt *ATG16L1* als Suszeptibilitätsgen von Morbus Crohn für eine große deutsche Patienten-Kohorte. Diese Assoziation lässt sich mutmaßlich in erster Linie auf die Variante rs2241880 (T300A) zurückführen, da sich die übrigen hoch signifikant mit Morbus Crohn assoziierten SNPs wie rs2241879 in einem Kopplungsungleichgewicht mit rs2241880 befanden. Diese Erkenntnis deckt sich mit bereits vorliegenden und später durchgeführten Studien (Büning 2007, Cheng 2010, Hampe 2007). Laut einer neueren Studie von Van Limbergen et al. kann jedoch die T300A-Variante allein die Assoziation von *ATG16L1* mit Morbus Crohn nicht erklären (Van Limbergen 2013).

Im Gegensatz zu Morbus Crohn wurden für Colitis ulcerosa mit Ausnahme von rs6431660 keine signifikanten Assoziationen mit den *ATG16L1*-Varianten gefunden. Die Studienlage hierzu ist uneinheitlich. Büning 2007, Hampe 2007, Rioux 2007 und Cummings 2007 hatten keine Assoziationen von *ATG16L1* mit Colitis ulcerosa gefunden. In zwei Metaanalysen von Palomino-Morales 2009 bzw. Cheng 2010 wurde allerdings auch für rs2241880 (T300A) eine Assoziation mit Colitis ulcerosa gezeigt (pooled OR = 1,08; combined $p = 0,0003$ (Palomino-Morales 2009) bzw. OR = 1,06, 95 % KI: 1,01-1,10, $p = 0,02$ (Cheng 2010)). Fowler et al. beschrieben den Zusammenhang zwischen Colitis ulcerosa und rs2241880 (T300A) sogar als stark, gehen jedoch – im Gegensatz beispielsweise zu Prescott 2007 – von einem Colitis ulcerosa-protectiven Effekt des Morbus Crohn-Risiko-Allels aus (Fowler 2008).

Zusammenfassend kann also für die T300A-Variante von *ATG16L1* von einem Beitrag zum Erkrankungsrisiko sowohl für Morbus Crohn als auch – in wohl schwächerer Form – für Colitis ulcerosa ausgegangen werden. (Büning 2007)

Dies ist die erste vorliegende Studie, die neun *ATG16L1*-SNPs, von denen eine starke Assoziation mit Morbus Crohn vorbeschrieben ist, hinsichtlich der Suszeptibilität für Morbus Crohn und des Phänotyps von Morbus Crohn untersucht hat. Interessanterweise zeigte sich für alle untersuchten *ATG16L1*-SNPs eine Odds-Ratio $< 1,0$ für das Minor-Allel, was für die Träger dieses Allels einen protektiven Effekt gegen Morbus Crohn vermuten lässt, hingegen für die Träger des Major-Allels ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zu bedeuten scheint.

Cheng et al. beschreiben in einer Metaanalyse über 25 Studien für die Variante rs2241880

(T300A) entsprechend das Major-Allel G als Risiko-Allel für Morbus Crohn (Cheng 2010). Eine Ausnahme stellt die Studie von Yamazaki 2007 dar, hier ergibt sich ein protektiver Effekt des G-Allels für Morbus Crohn.

Diese Studie bestätigt die Ergebnisse vorhergehender genomweiter Assoziationsstudien und damit die Eignung dieses wissenschaftlichen Verfahrens, die Genetik multifaktorieller Erkrankungen aufzuklären. Dennoch kann durch den Anteil bestimmter *ATG16L1*-Varianten an der Pathogenese von Morbus Crohn der genetische Hintergrund chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gewiss nur zu einem kleinen Teil aufgeklärt werden. Andere Kandidatengene sind ebenfalls daran beteiligt.

Als spezifisch für Morbus Crohn sind hier in erster Linie *NOD2* und *PTPN22* (Jostins 2012) zu nennen. Insbesondere wurde vielfach die Assoziation der *NOD2*-Varianten p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und p.Leu1007fsX1008 mit Morbus Crohn – jedoch nicht mit Colitis ulcerosa (Hampe 2001, Lesage 2002) – gezeigt (Hugot 2001, Li 2012, Ogura 2001b).

Ein weiteres wiederholt bestätigtes Morbus Crohn-Suszeptibilitätsgen liegt im IBD5-Locus auf Chromosom 5q31. Welche Genvarianten im Einzelnen diese Assoziation bedingen, wird weiterhin diskutiert. Die Ergebnisse einer breit angelegten Studie von Silverberg et al. 2007 widersprachen der Annahme, dass der *SLC22A5*-SNP ursächlich sei für die Assoziation. Außerdem wurden mit *P4HA2* (prolyl 4-hydroxylase) und *IRF1* (interferon regulatory factor 1) weitere Gene gefunden, die die Assoziation der *IBD5*-Region mit Morbus Crohn ausreichend erklären könnten (Silverberg 2007). Dennoch gelten die beiden Loci *SLC22A4* und *SLC22A5* weiterhin als hauptverantwortlich für die Assoziation des IBD5-Locus mit Morbus Crohn (Naser 2012, Wang 2011).

Török et al. beobachteten ein erhöhtes Morbus Crohn-Erkrankungsrisiko für bestimmte *TLR9*-Varianten (Török 2004). In einer groß angelegten gepoolten Studie von De Jager 2007 mit 4805 CED-Patienten wurde jedoch bei der Analyse verschiedener TLR-SNPs gezeigt, dass nur bestimmte *TLR4*-Varianten maßgeblich verantwortlich sind für die Suszeptibilität für Morbus Crohn. Dies wiederum hatten Ergebnisse von Brand 2005 bereits ebenfalls nahegelegt (Brand 2005).

Als Colitis ulcerosa-spezifisch gelten vorrangig Gene, die MHC-assoziiert oder an der epithelialen Barrierebildung beteiligt sind (Parkes 2012a). Zu erwähnen sind *IL23R* (Duerr 2006, Libioulle 2007, Rioux 2007), *STAT3* (Parkes 2012b aus Jostins 2012), *JAK2* (Anderson 2011, Franke 2010, Parkes 2012b aus Jostins 2012), *HNF4A*, *CDHI*, *LAMB1* (Barrett 2009), und *DAP* (Anderson 2011) Allerdings sind einige dieser Gene zusätzlich – wenn auch

schwächer – mit Morbus Crohn assoziiert (Fisher 2008).

Zusammengenommen mit der Assoziation von *NOD2* mit ilealem Morbus Crohn-Befall und dessen fehlender Assoziation mit Colitis ulcerosa legt das die Überlegung nahe, ilealen und colonalen Morbus Crohn-Befall als zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten zu betrachten (Cleynen 2016, Fisher 2008, Parkes 2012b).

IRGM (Jostins 2012, Parkes 2007), *PTGER4* (Libioule 2007), *PTPN2* (Glas 2012) und *IL23R* (Duerr 2006, Libioule 2007, Rioux 2007) sind an der Pathogenese sowohl von Morbus Crohn als auch von Colitis ulcerosa beteiligt, was bei vielen bekannten Unterschieden für die Verwandtschaft der beiden CED-Phänotypen spricht.

Eine aktuelle großangelegte Metaanalyse (Jostins 2012) wies insgesamt 163 CED-Loci nach, von denen 110 sowohl mit Morbus Crohn als auch mit Colitis ulcerosa assoziiert sind. 30 zeigten ausschließlich Effekte auf die Entwicklung von Morbus Crohn, 23 wurden als Colitis ulcerosa-spezifisch klassifiziert. Zwei bekannte Morbus Crohn-Risikoallele in *NOD2* und *PTPN22* zeigten hier einen Colitis ulcerosa-protectiven Effekt (Jostins 2012). 71 der 163 Loci waren vorher nicht als CED-assoziiert beschrieben worden. Dennoch sind dadurch erst 13,6 % (Morbus Crohn) bzw. 7,5 % (Colitis ulcerosa) der Krankheitsvarianz aufgeklärt (Jostins 2012), was den weiterhin bestehenden Forschungsbedarf in diesem Gebiet aufzeigt.

Um mögliche Interaktionen von *ATG16L1*-Varianten mit anderen CED-Suszeptibilitätsgenen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie Epistasis von *ATG16L1* mit anderen wichtigen Morbus Crohn-Suszeptibilitätsgenen (*IL23R*, *NOD2* und *SLC22A4/5*) getestet. Eine Epistasis konnte für die genannten Gene mit den analysierten *ATG16L1*-Varianten nicht gezeigt werden, eine schwache Interaktion zwischen *ATG16L1*- und *IL23R*-Varianten erfüllte nach Korrektur für multiple Tests die Signifikanzkriterien nicht mehr.

Eine funktionelle Interaktion zwischen *ATG16L1* und *NOD2* ist bekannt (Cooney 2010, Travassos 2010), dennoch beruht die Erhöhung des Morbus Crohn-Erkrankungsrisikos, das von Varianten der beiden Loci ausgeht, nicht auf Synergieeffekten, sondern ist als additiver Effekt zu bewerten (Cho 2011).

Epistase zwischen *ATG16L1* und *PTGER4* wurde von Seiderer für die Morbus Crohn-Suszeptibilität gezeigt (Seiderer 2008a).

5.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation von *ATG16L1* mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Eine eingehende Genotyp-Phänotyp-Analyse in dieser Arbeit zeigte keine signifikanten Assoziationen von *ATG16L1*-Varianten mit bestimmten Phänotypen von Morbus Crohn. Eine Assoziation von rs2241880 mit Morbus Crohn-bedingten Operationen, wie sie für bestimmte *IRGM*-Varianten gezeigt wurde (Sehgal 2012), konnte in der univariaten Auswertung ($p = 0,018$, OR 0,72, 95 % KI 0,54–0,95) gezeigt werden, erfüllte nach Bonferroni-Korrektur jedoch nicht mehr die Signifikanzkriterien.

Insgesamt stellt sich der Zusammenhang von *ATG16L1*-Varianten mit einem speziellen klinischen Bild uneinheitlich dar. Cleynen 2012 konnten in einer europäischen Metaanalyse einen Zusammenhang zwischen Fistelbildung (B3) und einer weiteren *ATG16L1*-Variante zeigen. Bei Zusammentreffen von drei Risikoallelen in *NOD2*, *JAK2* und *ATG16L1* konnte ein erhöhtes Risiko für stenosierendes Befallsmuster (B2) beobachtet werden (Cleynen 2012). Der vorbeschriebene Zusammenhang zwischen rs2241880 und einem ilealen Krankheitsmuster (Prescott 2007, Waterman 2011) konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Zwar zeigte sich auch hier in der univariaten Auswertung eine Assoziation, nach Korrektur für multiple Tests ging diese jedoch ebenfalls verloren. Die britische Studie von Prescott 2007 basierte auf einer weit größeren Kohorte, die Patienten einer anderen Studie mit detaillierten Informationen zum Phänotyp mit einschloss (Hampe 2007). Die vorliegende Genotyp-Phänotyp-Analyse schloss lediglich Patienten eines einzelnen CED-Zentrums (LMU München, Großhadern) ein, von denen Informationen zum Morbus Crohn-Phänotyp gemäß der Montreal-Klassifikation verfügbar waren. Eine weitere großangelegte britische Studie wiederum konnte der Variante rs2241880 ebenfalls keinen spezifischen Morbus Crohn-Subtyp zuordnen (Cummings 2007). Auch Büning et al. beschreiben zwar das G-Allel der *ATG16L1*-Variante rs2241880 als klar assoziiert mit Morbus Crohn, jedoch nicht mit einem bestimmten Morbus Crohn-Phänotyp (Büning 2007).

Die in der Literatur beschriebene Assoziation von *ATG16L1* mit ilealem Befallsmuster würde sich mit dem Phänotyp genetischer Varianten anderer im weiteren Sinne in die bakterielle Phagozytose involvierter Proteine decken wie CRP (Thalmaier 2006), IL-10 (Amre 2009), ZNF365 (Amre 2010, Latiano 2011), STAT3 (Amre 2010), CX3CR1 (Brand 2006, Niess 2005) und CXCL16 (Seiderer 2008b), ICOSLG (Waterman 2011) und vor allem *NOD2* (Brand 2012, Economou 2004, Li 2012, Mardini 2005, Seiderer 2006a, Seiderer 2006b, Török 2009, Waterman 2011). Insbesondere für die *NOD2*-Variante p.Leu1007fsX1008 wurde

mehrfach eine Assoziation mit der Ausbildung ilealer Stenosen (Brand 2012, Seiderer 2006a, Seiderer 2006b) bzw. ilealem Befall festgestellt (Economou 2004, Lesage 2002, Li 2012, Mardini 2005, Waterman 2011). Bei einem Vergleich der Genotypen für *ATG16L1* (T300A) von Patienten mit Morbus Crohn-Kolitis, ilealem Morbus Crohn-Befall und gesunden Kontrollen waren aus der Gruppe mit ilealem Befall nur 4 % homozygot für das Nicht-Risiko-Allel. Das lässt einen protektiven Effekt des (minor) A-Allels für ilealen Morbus Crohn vermuten (Li 2012). Analog hierzu schrieben Cleynen et al. dem (major) G-Allel ein verstärktes Risiko für ilealen Morbus Crohn sowie einen protektiven Effekt für den Befall des Kolon zu (Cleynen 2012).

Zusammenfassend legt das den Schluss nahe, dass der mögliche Effekt von rs2241880 auf die Ausprägung eines ilealen Morbus Crohn-Subtyps deutlich schwächer einzuschätzen ist als derjenige bestimmter *NOD2*-Varianten wie p.Leu1007fsX1008 (Brand 2012, Economou 2004, Lesage 2002, Li 2012, Mardini 2005, Seiderer 2006a, Seiderer 2006b, Waterman 2011).

Für Colitis ulcerosa konnten keine signifikanten Assoziationen zu bestimmten Phänotypen gefunden werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen weiterer bisheriger Studien (Büning 2007).

Interessanterweise zeigte sich in einer australischen Studie für das als GG homozygot vorliegende Morbus Crohn-Risiko-Allel *ATG16L1* (T300A) eine negative Korrelation mit dem Colitis ulcerosa-Schweregrad: Patienten mit schweren Krankheitsverläufen trugen vergleichsweise selten den GG-Genotypen (Fowler 2008).

Für andere Colitis ulcerosa-Suszeptibilitätsgene wurden bereits Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp gefunden: So korrelieren z.B. *PTPN2*-Varianten mit dem Auftreten von Strikturen (Glas 2012). Latiano et al. zeigten eine Korrelation zwischen *NKX2-3* und Colitis ulcerosa-assoziierten Operationen sowie zwischen *HLA* und dem Ansprechen auf Steroidtherapie (Latiano 2011). Pierik et al. beschreiben eine Assoziation zwischen *TNFR1A36G* und Pancolitis (Pierik 2004).

Für *NOD2* sind bisher keine Zusammenhänge zwischen Genotypen und bestimmten Krankheitsausprägungen der Colitis ulcerosa gezeigt worden (Glas 2010, Lesage 2002).

Eine große Genotyp-Assoziationsstudie untersuchte zuletzt anhand von genetischen Risikoscores die genetischen Zusammenhänge zwischen den einzelnen CED-Subtypen. Die Ergebnisse sprechen für ein Kontinuum von Störungen innerhalb der CED, das durch eine Einteilung in drei Gruppen (Morbus Crohn mit ilealem Befall, Morbus Crohn mit Colon-

Befall und Colitis ulcerosa) besser repräsentiert wäre als durch die bisherige Zweiteilung in Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Cleynen 2016).

5.3 Expressionsanalysen

Die Expression von *ATG16L1* in intestinalen Epithelzellen (IEC) (Hampe 2007, Rioux 2007) und seine Rolle bei der Prozessierung intrazellulärer Bakterien (Rioux 2007) war bereits Gegenstand der Forschung. Glas et al. untersuchten, ob proinflammatorische Zytokine oder bakterielle Zellkomponenten, die als Liganden an TLRs fungieren, Einfluss auf die Regulation der Genexpression von *ATG16L1* haben (Glas 2008). Es konnte eine starke Aktivierung der Transkription für das proinflammatorische Zytokin IL-8 nach Stimulation mit den TLR4-Liganden TNF- α und LPS gezeigt werden. Allerdings war der Einfluss solcher Stimulatoren und anderer TLR-Liganden oder Zytokine auf die Regelung der Transkription von *ATG16L1* lediglich schwach ausgeprägt. Nur CpG-Motive als Liganden für TLR-9 sowie IL-1 β konnten die mRNA-Expression von *ATG16L1* über das Zweifache steigern.

Umgekehrt scheint *ATG16L1* die Immunantwort durch Suppression des proinflammatorischen IL-1 β zu drosseln, bzw. fehlende oder fehlerhafte *ATG16L1*-Aktivität und damit Autophagie zu einer erhöhten IL-1 β -Produktion zu führen (Lee 2012, Saitoh 2008). Die Vermutung liegt nahe, dass bei Trägern des Morbus Crohn-Risiko-Allels T300A die Schwelle, ab der IL-1 β eine Entzündungsreaktion hervorruft, im Vergleich zu Nicht-T300A-Trägern schneller erreicht ist (Lee 2012). Plantinga et al. zeigten eine Assoziation dieser *ATG16L1*-Varianten mit NOD2-induzierter IL1 β -abhängiger Hyperinflammation (Plantinga 2011b).

T300A-positive Morbus Crohn-Patienten könnten demnach von einer Therapie profitieren, die den IL-1 β -Signalweg blockiert (Lee 2012, Plantinga 2011b, Yano 2009).

Allerdings sind praktisch alle im Darm vorhandenen Bakterien in der Lage, durch NOD2-Erkennung von Bestandteilen ihrer Zellmembran eine verstärkte IL-1 β -Immunantwort bei Trägern des *ATG16L1*-T300A-Polymorphismus auszulösen. Angesichts der beträchtlichen Anzahl homozygoter Träger dieses Polymorphismus (etwa 29 % in der vorliegenden Kontrollgruppe, siehe Ergebnisse) ist es jedoch bemerkenswert, dass diese Konstellation nur in wenigen Fällen tatsächlich zu einer schweren Darmentzündung führt (Plantinga 2011a). Es ist davon auszugehen, dass eine Fehlregulation weiterer Signalkaskaden nötig ist, um das Vollbild eines Morbus Crohn auszulösen. Eine mögliche Kompensation durch den von *ATG16L1*-Varianten nicht beeinträchtigten TLR-abhängigen Signalweg wird diskutiert

(Kleinnijenhuis 2011).

Eine Steigerung der angeborenen Immunantwort durch NOD2-Stimulation in Anwesenheit von CpG-DNA wurde von van Heel 2005a gezeigt, dieser synergistische Effekt geht allerdings verloren bei Morbus Crohn-Patienten, die homozygot für bestimmte *NOD2*-Mutationen sind.

In einer aktuellen Studie konnte nach NOD2-Stimulation mit MDP eine gesteigerte IL-1 β -Produktion sowie Rekrutierung der Autophagie-Proteine ATG16L1 und IRGM gezeigt werden (Juarez 2012).

Um zu klären, ob diese Beobachtungen zu *NOD2* und die Expressionsanalysen zu *ATG16L1* im Zusammenhang stehen, bedarf es weiterer Forschung, zumal – entgegen den initial beschriebenen Interaktionen zwischen ATG16L1 und NOD2 (Hampe 2007) – in der vorliegenden Studie keine Epistasie zwischen beiden Genen gezeigt werden konnte. Funktionelle Interaktion zwischen den beiden Genen im Autophagieprozess ist mehrfach gezeigt worden (Cooney 2010, Travassos 2010).

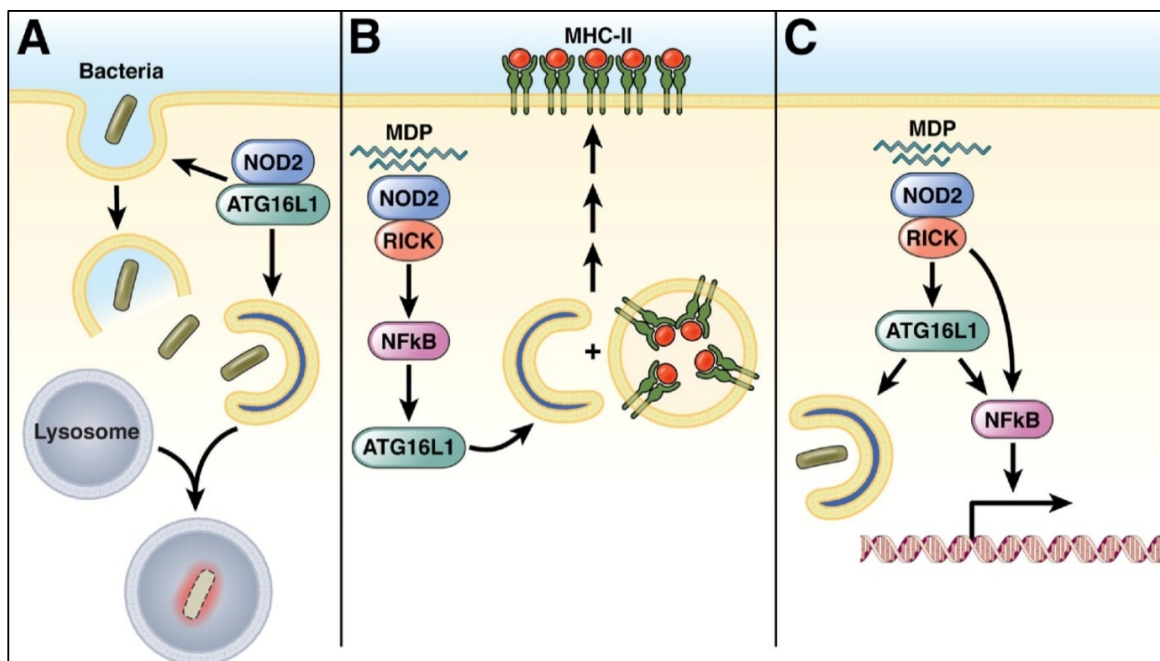


Abbildung 15: Mechanismen zur Kontrolle von Bakterien mit Interaktion von ATG16L1 und NOD2, Abbildung aus Cadwell (Cadwell 2010a). Alle drei Szenarien sind bei den Suszeptibilitäts-Allelen von *NOD2* und *ATG16L1* gestört. (A) NOD2 rekrutiert ATG16L1 an der Plasmamembran beim Eindringen von Bakterien in die Zelle. Durch ATG16L1 werden die Bakterien sowohl im Zytosol als auch in den Phagosomen zum Ziel für die Autophagie und schließlich zur Zerstörung in die Lysosomen transportiert. (B) NOD2 hilft bei der Erkennung von MDP und führt über RICK, NF- κ B und ATG16L1 zu einer Steigerung der Autophagie. Diese führt zu einem vermehrten Transport von MHC-II-Partikeln zur Zelloberfläche und erlaubt damit eine verstärkte T-Zell-Antwort. (C) Nach Kontakt mit MDP verstärken NOD2 und RICK zwei ATG16L1-abhängige Stoffwechselwege: bakterielle Autophagie (wie in A) und NF- κ B-vermittelte Transkription. In der Zeichnung symbolisieren die noch nicht geschlossenen Vesikel sich bildende Autophagosomen und/oder assoziierte Autophagie-Proteine.

Der NOD2-abhängige Signalweg zur Bakterienabwehr war in Paneth-Zellen und Monozyten mit *ATG16L1*-T300A-Genotyp nicht beeinträchtigt, in Kolon-Epithelzellen ging die NOD2-spezifische bakterielle Abwehrfunktion verloren (Homer 2010). Eine weitere Untersuchung konnte in der Interaktion zwischen T300A-positivem bzw. T300A-negativem Allel mit NOD2 keine Unterschiede feststellen (Travassos 2010). Die Effekte der Morbus Crohn-assoziierten *ATG16L1*- und *NOD2*-Varianten werden als additiv und voneinander unabhängig beschrieben (Billmann-Born 2011, Cho 2011, Glubb 2011). Die aktuellen Forschungsergebnisse legen nahe, dass der CED-Suszeptibilität weniger die Fehlfunktion eines bestimmten Gens als die gestörte Regulation eines zentralen Stoffwechselwegs zu Grunde liegt (Kabi 2012).

Prescott et al. schrieben dem *ATG16L1*-(T300A)-Genotyp GG ein 2,2-fach erhöhtes Risiko zu, Morbus Crohn mit einem ilealen Befallsmuster zu entwickeln (Prescott 2007). In der Folge wurde durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe die Regulation der Genexpression von *ATG16L1* bei Ileitis in einem Mausmodell untersucht (Glas 2008). Im Vergleich zwischen heterozygoten an Ileitis erkrankten TNF Δ ARE-Mäusen mit gesunden Wild-Typen zeigten sich in der Expression ilealer *ATG16L1*-mRNA jedoch keine signifikanten Unterschiede. Für Epithelzellen des Kolon zeigte sich bei Wild-Typ-Mäusen eine 2,6-fach höhere *ATG16L1*-Expression als bei TNF Δ ARE-Mäusen, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0,112$).

Die Ergebnisse der *In-vitro*-Experimente und des Mausmodells decken sich mit weiteren Untersuchungen durch Glas 2008: Im Vergleich der Biopsien von entzündetem und nicht-entzündetem Gewebe aus dem Kolonepithel Morbus Crohn-erkrankter Patienten wurden keine Unterschiede in der *ATG16L1*-Expression gefunden. Hingegen konnte hier eine deutlich gesteigerte Expression von *IL8*-mRNA in entzündetem Gewebe gezeigt werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Hampe et al.: Sie konnten im Vergleich von fünf Morbus Crohn-Patienten mit fünf Gesunden keinen Unterschied in der Expression von *ATG16L1* feststellen. In der gleichen Studie wurde ebenfalls keine Assoziation zwischen dem Genotyp rs2241880 und *ATG16L1*-Expression gefunden (Hampe 2007).

5.4 Weitere Untersuchungen zum Risikoallel *ATG16L1*-T300A in der Literatur zur Interaktion mit dem intestinalen Mikrobiom und zum Autophagieprozess

Welche genauen funktionellen Folgen rs2241880-Varianten verursachen, ist bisher weiterhin unklar. Immerhin deuten die gezeigte Assoziation von rs2241880 mit einer ilealen Ausprägung von Morbus Crohn (Prescott 2007) und die Involvierung von *ATG16L1* in den Autophagie-Prozess, der an der Prozessierung von intrazellulären Bakterien beteiligt ist (Rioux 2007), darauf hin, dass in der Pathogenese von Morbus Crohn das intestinale Mikrobiom eine wichtige Rolle spielt.

Insgesamt scheint die Protein-Expression von *ATG16L1* nach mikrobieller Triggerung bei Trägern des T300A-Allels verringert zu sein (Plantinga 2011b). Bei *ATG16L1*-T300A-positiven Morbus Crohn-Patienten sind die Granula der Paneth-Zellen rarifiziert, dysmorph und funktionell beeinträchtigt (Cadwell 2008). Ähnliche Veränderungen der Paneth-Zellen zeigten sich in einer Studie mit Mäusen, deren *ATG16L1*-Expression auf 30 % des Normalwerts reduziert waren (Kabi 2012). Zusätzlich wurde bei den Mäusen eine verstärkte Produktion von immunregulatorischen Adipo-Zytokinen, Leptin und Adiponektin beobachtet, die als typische mit Morbus Crohn verknüpfte pathologische Zeichen beschrieben wurden (Kabi 2012, Schaffler 2005). Cadwell et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass Träger des *ATG16L1*-Risiko-Allels nach einer murinen Noro-Virus-Infektion abnormales Granula-Packing und in der Folge deutliche intestinale Pathologien entwickeln. Zudem zeigten sie eine fundamental beeinträchtigte Immunantwort auf das intestinale Toxin Dextran-Natrium-Sulfat (Cadwell 2010b). Murine Träger des T300A-Polymorphismus scheinen zwar keine spontanen Entzündungsreaktionen zu entwickeln, zeigten aber bereits genannte morphologische Defekte in Paneth- und auch Goblet-Zellen mit reduzierter bakterieller Autophagie und vermehrter IL-1 β -Produktion (Lassen 2014b). Die Zahl der abnormen Paneth-Zellen ist assoziiert mit der Anzahl sowohl der *ATG16L1*- als auch der *NOD2*-Risiko-Allele. (VanDussen 2014) Zudem besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Anteil abnormer Paneth-Zellen und dem Auftreten von Granulomen. Ein hoher Anteil von abnormen Paneth-Zellen korreliert mit einem schnellen Wiederauftreten der Krankheit nach OP, so dass nach VanDussen et al. eine histologische Analyse des Paneth-Zell-Phänotyps genutzt werden könnte, um Morbus Crohn-Patienten in Subgruppen mit unterschiedlichen pathognomonischen und klinischen Eigenschaften einzuteilen (VanDussen 2014).

In Anwesenheit des *ATG16L1*-Risiko-Allels kommt es durch erhöhte Caspase-3- und -7-Aktivität vermehrt zur Spaltung von ATG16L1 und konsekutiv zu erniedrigten Proteinspiegeln (Lassen 2014b, Murthy 2014). Kleinnijenhuis et al. zeigten einen Trend zu einer verringerten Produktion von IFN- γ bei homozygoten Trägern des *ATG16L1*-T300A-Allels auf und wiesen auf eine mögliche Beeinträchtigung der mykobakteriellen Abwehr hin (Kleinnijenhuis 2011).

Grundfunktionen der Autophagie scheinen durch die T300A-Variante nicht beeinträchtigt zu sein, die komplexere antibakterielle Autophagie (Xenophagie) allerdings schon (Billmann-Born 2011, Lassen 2014b). Im Xenophagie-Prozess zeigt sich auch die gemeinsame Verflechtung von ATG16L1 und NOD2 (Billmann-Born 2011). Glubb et al. konnten eine Assoziation des T300A-Polymorphismus mit Veränderungen der Zytokinproduktion von IL-6 und IL-10 zeigen (Glubb 2011).

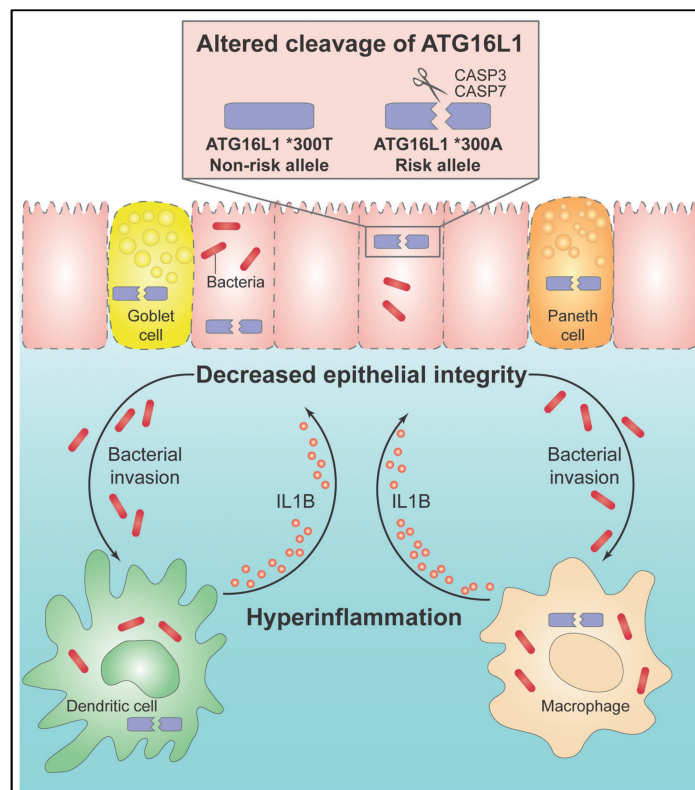


Abbildung 16: Der *ATG16L1*-T300A-Polymorphismus beeinflusst zahlreiche Stoffwechselwege in verschiedenen Zelltypen, Abbildung aus Lassen et al. (Lassen 2014a). Verminderte Sekretion der Paneth- und Goblet-Zellen des intestinalen Epithels könnte die Anfälligkeit für Infektionen beeinträchtigen. Durch bakterielle Infektionen oder andere Formen zellulären Stresses, die die epitheliale Integrität herab- und Caspase-Aktivität heraufsetzen, kann ein Rückkopplungskreislauf entstehen, der die intestinale Homöostase stört. Da *ATG16L1*-T300A im Vergleich zum Wildtyp-*ATG16L1* bevorzugt von Spaltung durch Caspase 3 und Caspase 7 betroffen ist, verursacht eine erhöhte Caspase-Aktivität ein verringertes Level von voll funktionsfähigem ATG16L1. Das wiederum führt zu einer Zunahme der bakteriellen Infektion mit intrazellulärer Replikation und verstärkter Produktion proinflammatorischer Zytokine. *ATG16L1*-T300A-positive dendritische Zellen und Makrophagen produzieren in der Folge vermehrt IL-1B als Antwort auf bakterielle Liganden oder Infektion. Dieser Kreislauf unterhält ein hyperinflammatorisches Milieu im Intestinaltrakt.

Die Variante rs2241880 führt zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin in der evolutionär konservierten Position 300 am N-Terminus der WD-repeat-Domäne von ATG16L1, dessen Funktion bisher weiterhin unbekannt ist (Billmann-Born 2011, Mizushima 2003). Dem ATG16-Protein der Hefe, das dem ATG16L1 der Säugetiere weitgehend homolog ist und das ebenfalls zur Autophagie befähigt, fehlt die WD-repeat-Domäne (Mizushima 2003). Demnach scheint sie für die klassische Autophagie verzichtbar zu sein. Diese ist durch die T300A-Variante nicht beeinträchtigt. Möglicherweise birgt sie die Fähigkeit zu einer spezialisierten Form der Autophagie, wie beispielsweise die antibakterielle Autophagie (Kuballa 2008). In einer weiteren Studie wird vermutet, dass die T300A-Variante keinen signifikanten Effekt auf die Rolle der WD-repeat-Domäne haben oder der ATG16L1-Komplex in einen völlig anderen Stoffwechselweg involviert sein könnte (Fujita 2009). Ziel aktueller Forschung ist es, den bisher unbekanntem Bindungspartner dieser Domäne zu finden.

In einer groß angelegten Metaanalyse wurde die Anzahl der in die Pathogenese von CED involvierten Genloci auf 163 erhöht (Jostins 2012), wodurch jedoch weiterhin weniger als die Hälfte der Varianz für das Erkrankungsrisiko aufgeklärt ist. Es ist also von einer großen Zahl weiterer Faktoren auszugehen, die einen wesentlichen Beitrag zur Pathogenese leisten, wie beispielsweise seltene bisher nicht erfasste genetische Variationen. Insgesamt scheint der genetische Hintergrund der Krankheitsentwicklung bei Morbus Crohn stärker ausgeprägt zu sein als bei Colitis ulcerosa (Naser 2012). Weiterhin weitgehend ungeklärt ist, welche Triggerfaktoren dafür verantwortlich sind, dass Komponenten kommensaler Bakterien vom Immunsystem nicht mehr als symbiotische Partner, sondern als Pathogene erkannt werden (Jostins 2012).

6 Zusammenfassung

Klinischer Hintergrund der vorliegenden Arbeit waren chronisch entzündliche Darmerkrankungen, zu denen insbesondere Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zählen, deren Pathogenese bisher nicht vollständig geklärt ist. Bekannte Einflussgrößen bei der CED-Pathogenese sind Umweltfaktoren, genetische Disposition und eine Dysregulation des intestinalen Immunsystems, mit dem die intestinalen Mikrobiota funktionell eng verknüpft sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetischen Hintergründe von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu analysieren. Dazu wurde insbesondere der Einfluss von neun Polymorphismen im *ATG16L1*-Gen auf die Suszeptibilität des Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa sowie den Phänotyp dieser Erkrankungen einschließlich potentieller Interaktionen mit anderen bekannten CED-Suszeptibilitätsgenen untersucht. Hierzu wurde in über 26.000 PCR-Untersuchungen die DNA von 2890 Patienten und gesunden Kontrollen einer deutschen Population analysiert.

Alle neun analysierten *ATG16L1*-Genvarianten zeigten hochsignifikante Assoziationen mit Morbus Crohn und damit einen protektiven Effekt des Minor-Allels. Eine in einer nordamerikanischen Kohorte vorbeschriebene Assoziation des *ATG16L1*-T300A-Polymorphismus (rs2241880) mit Morbus Crohn konnte für eine große Patientenkohorte aus dem süddeutschen Raum erstmals bestätigt werden ($p = 1,5 \times 10^{-4}$). Die stärkste Assoziation mit Morbus Crohn zeigte der *ATG16L1*-SNP rs2241879 ($p = 6,0 \times 10^{-5}$).

In der Genotyp-Phänotyp-Korrelation von *ATG16L1* mit Morbus Crohn traten schwache Assoziationen des *ATG16L1*-T300A-Polymorphismus mit ilealem und ileokolischem Phänotyp sowie mit Morbus Crohn-bedingten Operationen auf, die jedoch den Kriterien der Bonferroni-Korrektur nicht standhalten konnten.

Für Colitis ulcerosa konnte nur eine sehr schwache Assoziation mit dem *ATG16L1*-Polymorphismus rs6431660 gefunden werden. Die übrigen acht *ATG16L1*-Polymorphismen zeigten keine Assoziationen mit der Colitis ulcerosa-Suszeptibilität. Dies stimmt mit anderen Studien überein, die ebenfalls keinen Einfluss von *ATG16L1*-Varianten auf Colitis ulcerosa finden konnten.

In einer kombinierten Analyse von vier weiteren Suszeptibilitätsgenen (*NOD2*, *IL23R*, *SLC22A4* und *SLC22A5*) wurden keine Hinweise auf Gen-Gen-Interaktionen (Epistaxis) mit *ATG16L1* gefunden.

Auch unter Berücksichtigung umfangreicher neuerer Arbeiten mit über 75.000 analysierten Fällen und Kontrollen sowie insgesamt 163 CED-assoziierten Genloci (Jostins 2012) stellt *ATG16L1* einen der stärksten bislang bekannten genetischen Risikomarker für den Morbus Crohn dar, was die Ergebnisse dieser Arbeit eindrucksvoll bestätigt.

7 Literaturverzeichnis

1. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. Sep 2002;123(3):679-688.
2. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Jun 2001;15(6):731-748.
3. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. Apr 2002;122(4):854-866.
4. Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Lin XY, et al. The IBD1 locus for susceptibility to Crohn's disease has a greater impact in Ashkenazi Jews with early onset disease. *Am J Gastroenterol*. Apr 2001;96(4):1127-1132.
5. Amre DK, Mack DR, Morgan K, et al. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. May 1 2009;29(9):1025-1031.
6. Amre DK, Mack DR, Morgan K, et al. Susceptibility loci reported in genome-wide association studies are associated with Crohn's disease in Canadian children. *Aliment Pharmacol Ther*. Jun 2010;31(11):1186-1191.
7. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. Mar 2011;43(3):246-252.
8. Barreau F, Madre C, Meinzer U, et al. Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut*. Feb 2010;59(2):207-217.
9. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. Aug 2008;40(8):955-962.
10. Barrett JC, Consortium UIG, Lee JC, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*. Dec 2009;41(12):1330-1334.
11. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet*. Nov 3 2012;380(9853):1590-1605.
12. Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, et al. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut*. Feb 2005;54(2):228-236.
13. Baumgart DC, Metzke D, Guckelberger O, et al. Aberrant plasmacytoid dendritic cell distribution and function in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. Oct 2011;166(1):46-54.
14. Baumgart DC, Thomas S, Przesdzing I, et al. Exaggerated inflammatory response of primary human myeloid dendritic cells to lipopolysaccharide in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. Sep 2009;157(3):423-436.
15. Bekpen C, Xavier RJ, Eichler EE. Human IRGM gene "to be or not to be". *Semin Immunopathol*. Dec 2010;32(4):437-444.
16. Bengtson MB, Solberg C, Aamodt G, et al. Familial aggregation in Crohn's disease and ulcerative colitis in a Norwegian population-based cohort followed for ten years. *J Crohns Colitis*. Jun 2009;3(2):92-99.
17. Bernstein CN, Rawsthorne P, Blanchard JF. Population-based case-control study of measles, mumps, and rubella and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. Jun 2007;13(6):759-762.
18. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, et al. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut*. Jun 2003;52(6):840-846.
19. Billmann-Born S, Lipinski S, Bock J, Till A, Rosenstiel P, Schreiber S. The complex interplay of NOD-like receptors and the autophagy machinery in the pathophysiology of Crohn disease. *Eur J Cell Biol*. Jun-Jul 2011;90(6-7):593-602.
20. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis*. Nov 2004;10(6):848-859.

21. Biswas A, Liu YJ, Hao L, et al. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 17 2010;107(33):14739-14744.
22. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. Feb 2003;124(2):521-536.
23. Brand S. Homozygosity for the NOD2 p.Leu1007fsX1008 variant is the main genetic predictor for fibrostenotic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. Feb 2012;18(2):393-394.
24. Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, et al. 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*. Jan 2006;101(1):99-106.
25. Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, et al. 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*. Jul 2005;11(7):645-652.
26. Brandes JW, Lorenz-Meyer H. [Epidemiologic aspects of Crohn regional enterocolitis and ulcerative colitis in Marburg/Lahn (West Germany) between 1962 and 1975]. *Z Gastroenterol*. Feb 1983;21(2):69-78.
27. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*. Mar 2011;43(3):242-245.
28. Brinar M, Vermeire S, Cleynen I, et al. Genetic variants in autophagy-related genes and granuloma formation in a cohort of surgically treated Crohn's disease patients. *J Crohns Colitis*. Feb 2012;6(1):43-50.
29. Browning BL, Huebner C, Petermann I, et al. Association of DLG5 variants with inflammatory bowel disease in the New Zealand Caucasian population and meta-analysis of the DLG5 R30Q variant. *Inflamm Bowel Dis*. Sep 2007;13(9):1069-1076.
30. Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, et al. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. Feb 1999;5(1):24-32.
31. Büning C, Durmus T, Molnar T, et al. A study in three European IBD cohorts confirms that the ATG16L1 c.898A>G (p.Thr300Ala) variant is a susceptibility factor for Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. Dec 2007;1(2):70-76.
32. Cadwell K. Crohn's disease susceptibility gene interactions, a NOD to the newcomer ATG16L1. *Gastroenterology*. Nov 2010a;139(5):1448-1450.
33. Cadwell K, Patel KK, Komatsu M, Virgin HW, Stappenbeck TS. A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy*. Feb 2009;5(2):250-252.
34. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell*. Jun 25 2010b;141(7):1135-1145.
35. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. Nov 13 2008;456(7219):259-263.
36. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. Dec 1989;34(12):1841-1854.
37. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. Apr 15 2006;23(8):1097-1104.
38. Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, et al. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet*. Jan 2003;67(Pt 1):35-41.
39. Cheng JF, Ning YJ, Zhang W, Lu ZH, Lin L. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*. Mar 14 2010;16(10):1258-1266.
40. Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. Oct 2007;133(4):1327-1339.
41. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. May 2011;140(6):1704-1712.
42. Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut*. Jul 1994;35(7):950-954.

43. Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y, et al. Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest.* Oct 2005;115(10):2702-2715.
44. Cleynen I, Gonzalez JR, Figueroa C, et al. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut.* Dec 21 2012.
45. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet.* Jan 9 2016;387(10014):156-167.
46. Conway KL, Kuballa P, Song JH, et al. Atg16l1 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from Salmonella infection. *Gastroenterology.* Dec 2013;145(6):1347-1357.
47. Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med.* Jan 2010;16(1):90-97.
48. Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet.* Jan 2003;11(1):6-16.
49. Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, Ffrench M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy.* Oct-Dec 2005;1(3):131-140.
50. Cummings JR, Cooney R, Pathan S, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis.* Aug 2007;13(8):941-946.
51. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* Apr 2002;122(4):867-874.
52. Daiss W, Scheurlen M, Malchow H. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the county of Tubingen (West Germany). *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989;170:39-43; discussion 50-35.
53. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* Jul 2004;3(5):394-400.
54. Danese S, Semeraro S, Papa A, et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* Dec 14 2005;11(46):7227-7236.
55. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, et al. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun.* Jul 2007;8(5):387-397.
56. de Vlam K, Mielants H, Cuvelier C, De Keyser F, Veys EM, De Vos M. Spondyloarthropathy is underestimated in inflammatory bowel disease: prevalence and HLA association. *J Rheumatol.* Dec 2000;27(12):2860-2865.
57. Degen H, Deufel A, Eisel D, Grünewald-Janho S, Keesey J. Roche - PCR Applications Manual: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; 2006.
58. Delgado M, Singh S, De Haro S, et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev.* Jan 2009;227(1):189-202.
59. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science.* Dec 1 2006;314(5804):1461-1463.
60. Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther.* Feb 2000;14(2):145-153.
61. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol.* Dec 2004;99(12):2393-2404.
62. Ekbom A. The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? *Inflamm Bowel Dis.* Feb 2004;10 Suppl 1:S32-34.
63. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med.* Nov 1 1990;323(18):1228-1233.
64. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology.* Feb 1991;100(2):350-358.
65. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, et al. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology.* Jun 2007;132(7):2359-2370.

66. Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet*. Jan 26 2002;359(9303):331-340.
67. Felleman K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jun 2003;15(6):627-634.
68. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. Jul 1998;115(1):182-205.
69. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet*. Jun 2008;40(6):710-712.
70. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*. 1948;2(6):55-75.
71. Fowler EV, Doecke J, Simms LA, et al. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *Am J Gastroenterol*. Oct 2008;103(10):2519-2526.
72. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, et al. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet*. Jun 2008;40(6):713-715.
73. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. Dec 2010;42(12):1118-1125.
74. Fujioka Y, Noda NN, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F. Dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and its functional significance in autophagy. *J Biol Chem*. Jan 8 2010;285(2):1508-1515.
75. Fujita N, Saitoh T, Kageyama S, Akira S, Noda T, Yoshimori T. Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts. *J Biol Chem*. Nov 20 2009;284(47):32602-32609.
76. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. May 2004;113(10):1490-1497.
77. Gardet A, Xavier RJ. Common alleles that influence autophagy and the risk for inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol*. Oct 2012;24(5):522-529.
78. Genetics-Home-Reference, <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATG16L1>. ATG16L1 chromosome downloaded 2017.
79. Giallourakis C, Stoll M, Miller K, et al. IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet*. Jul 2003;73(1):205-211.
80. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. Mar 14 2003;278(11):8869-8872.
81. Glas J, Seiderer J, Tillack C, et al. The NOD2 single nucleotide polymorphisms rs2066843 and rs2076756 are novel and common Crohn's disease susceptibility gene variants. *PLoS One*. 2010;5(12):e14466.
82. Glas J, Wagner J, Seiderer J, et al. PTPN2 gene variants are associated with susceptibility to both Crohn's disease and ulcerative colitis supporting a common genetic disease background. *PLoS One*. 2012;7(3):e33682.
83. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, et al. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One*. 2007;2(9):e819.
84. Glas J, Konrad A, Schmechel S, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol*. Mar 2008;103(3):682-691.
85. Glocker EO, Frede N, Perro M, et al. Infant colitis--it's in the genes. *Lancet*. Oct 9 2010;376(9748):1272.
86. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. Nov 19 2009;361(21):2033-2045.
87. Glubb DM, Geary RB, Barclay ML, et al. NOD2 and ATG16L1 polymorphisms affect monocyte responses in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. Jun 21 2011;17(23):2829-2837.

88. Goebell H, Dirks E, Förster S, Strey B, Quebe-Fehling E. [A Prospective analysis of the incidence and prevalence of Crohn's disease in an urban population in Germany]. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1994;6(10):1039-1045.
89. Göke B, Beglinger C. *Gastroenterologie systematisch.* 2 ed. Bremen, Germany 2007.
90. Guo QS, Xia B, Jiang Y, Qu Y, Li J. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol.* Apr 1 2004;10(7):1069-1071.
91. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem.* Nov 1 2002;277(44):41701-41705.
92. Hampe J, Frenzel H, Mirza MM, et al. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 8 2002;99(1):321-326.
93. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet.* Jun 16 2001;357(9272):1925-1928.
94. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* Feb 2007;39(2):207-211.
95. Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD. Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol.* Nov 2008;1 Suppl 1:S58-61.
96. Henckaerts L, Cleynen I, Brinar M, et al. Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* Jun 2011;17(6):1392-1397.
97. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* Apr 2003;124(4):993-1000.
98. Holtmann M, Mudter J, Galle PR, Neurath MF. [The mucosal immune system. How clear is the pathophysiology?]. *Internist (Berl).* Nov 2002;43(11):1343-1344, 1347-1353.
99. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) *Biol. Unserer Zeit.* 2007;2/2007 (37):120-126.
100. Homer CR, Richmond AL, Rebert NA, Achkar JP, McDonald C. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology.* Nov 2010;139(5):1630-1641, 1641 e1631-1632.
101. Hou JK, El-Serag H, Thirumurthi S. Distribution and manifestations of inflammatory bowel disease in Asians, Hispanics, and African Americans: a systematic review. *Am J Gastroenterol.* Aug 2009;104(8):2100-2109.
102. Hugot JP. [Role of NOD2 gene in Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol.* Jan 2002;26(1):13-15.
103. Hugot JP, Zouali H, Lesage S. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Jun 2003;15(6):593-597.
104. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* May 31 2001;411(6837):599-603.
105. Huijbers A, Plantinga TS, Joosten LA, et al. The effect of the ATG16L1 Thr300Ala polymorphism on susceptibility and outcome of patients with epithelial cell-derived thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* Jun 2012;19(3):L15-18.
106. Hummerich L. Genotypisierung und Gene Scanning mit dem LightCycler® PCR Analysesystem. Freiburg, Germany: Roche Diagnostics GmbH; 2008.
107. Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut.* Nov 2009;58(11):1481-1489.
108. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem.* Jan 26 2001;276(4):2551-2554.
109. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* Feb 21 2003;278(8):5509-5512.

110. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. Jul 2002;123(1):86-91.
111. Joossens M, Simoens M, Vermeire S, Bossuyt X, Geboes K, Rutgeerts P. Contribution of genetic and environmental factors in the pathogenesis of Crohn's disease in a large family with multiple cases. *Inflamm Bowel Dis*. May 2007;13(5):580-584.
112. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. Nov 1 2012;491(7422):119-124.
113. Juarez E, Carranza C, Hernandez-Sanchez F, et al. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to Mycobacterium tuberculosis in humans. *Eur J Immunol*. Apr 2012;42(4):880-889.
114. Kabi A, Nickerson KP, Homer CR, McDonald C. Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: insights from studies of autophagy risk genes. *Inflamm Bowel Dis*. Apr 2012;18(4):782-792.
115. Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. Sep 5 2008;134(5):743-756.
116. Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, et al. Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice—a pathway associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. Dec 2011;141(6):2119-2129 e2118.
117. Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, Takahashi S, Shimosegawa T. Genotype and phenotype relation in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. Mar 2005;40 Suppl 16:21-24.
118. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol*. Apr 2001;7(2):175-184.
119. Kirsner JB, Spencer JA. Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis. *Ann Intern Med*. Aug 1963;59:133-144.
120. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Plantinga TS, et al. Autophagy modulates the Mycobacterium tuberculosis-induced cytokine response. *Immunology*. Nov 2011;134(3):341-348.
121. Klionsky DJ. Crohn's disease, autophagy, and the Paneth cell. *N Engl J Med*. Apr 23 2009;360(17):1785-1786.
122. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*. May 9 2005;169(3):425-434.
123. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One*. 2008;3(10):e3391.
124. Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem*. May 24 2002;277(21):18619-18625.
125. Kyle J, Stark G. Fall in the incidence of Crohn's disease. *Gut*. Apr 1980;21(4):340-343.
126. Lapaquette P, Glasser AL, Huett A, Xavier RJ, Darfeuille-Michaud A. Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cell Microbiol*. Jan 2010;12(1):99-113.
127. Lapidus A. The changing epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg*. Apr-Jun 2001;64(2):155-159.
128. Lapidus A, Bernell O, Hellers G, Persson PG, Lofberg R. Incidence of Crohn's disease in Stockholm County 1955-1989. *Gut*. Oct 1997;41(4):480-486.
129. Lassen KG, Xavier RJ. An alteration in ATG16L1 stability in Crohn disease. *Autophagy*. Oct 1 2014a;10(10):1858-1860.
130. Lassen KG, Kuballa P, Conway KL, et al. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 27 2014b;111(21):7741-7746.
131. Latiano A, Palmieri O, Latiano T, et al. Investigation of multiple susceptibility loci for inflammatory bowel disease in an Italian cohort of patients. *PLoS One*. 2011;6(7):e22688.
132. Lee FI, Costello FT. Crohn's disease in Blackpool—incidence and prevalence 1968-80. *Gut*. Mar 1985;26(3):274-278.

133. Lee J, Kim HR, Quinley C, et al. Autophagy suppresses interleukin-1beta (IL-1beta) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. *J Biol Chem*. Feb 3 2012;287(6):4033-4040.
134. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*. Dec 2011;60(12):1739-1753.
135. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2-6; discussion 16-19.
136. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. Apr 2002;70(4):845-857.
137. Li E, Hamm CM, Gulati AS, et al. Inflammatory bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition. *PLoS One*. 2012;7(6):e26284.
138. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet*. Apr 20 2007;3(4):e58.
139. Lindberg E, Jornerot G. The incidence of Crohn's disease is not decreasing in Sweden. *Scand J Gastroenterol*. May 1991;26(5):495-500.
140. Lipinski S, Till A, Sina C, et al. DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *J Cell Sci*. Oct 1 2009;122(Pt 19):3522-3530.
141. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*. Sep 2015;47(9):979-986.
142. Löffler A, Glados M. [Data on the epidemiology of Crohn disease in the city of Cologne]. *Med Klin (Munich)*. Sep 15 1993;88(9):516-519.
143. Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. May 2004;126(6):1504-1517.
144. Logan RF. Inflammatory bowel disease incidence: up, down or unchanged? *Gut*. Mar 1998;42(3):309-311.
145. Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut*. Sep 2008;57(9):1246-1251.
146. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science*. Oct 24 2003;302(5645):654-659.
147. Madsen KL. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. *Clin Invest Med*. Oct 2001;24(5):250-257.
148. Mannon PJ, Hornung RL, Yang Z, et al. Suppression of inflammation in ulcerative colitis by interferon-beta-1a is accompanied by inhibition of IL-13 production. *Gut*. Apr 2011;60(4):449-455.
149. Marchiando AM, Shen L, Graham WV, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol*. Apr 5 2010;189(1):111-126.
150. Mardini HE, Gregory KJ, Nasser M, et al. Gastrointestinal Crohn's disease is associated with NOD2/CARD15 gene polymorphisms, particularly L1007P homozygosity. *Dig Dis Sci*. Dec 2005;50(12):2316-2322.
151. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*. Oct 11 1996;274(5285):262-265.
152. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*. Sep 2008;40(9):1107-1112.
153. McGovern DP, Kugathasan S, Cho JH. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. Oct 2015;149(5):1163-1176 e1162.
154. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, Rankin GB, Brooks RK. Clinical features and natural history of Crohn's disease. *Gastroenterology*. Oct 1979;77(4 Pt 2):898-906.

155. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:19-40.
156. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* May 1 2003;116(Pt 9):1679-1688.
157. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* Jan 2012;142(1):46-54 e42; quiz e30.
158. Monsén U, Bernell O, Johansson C, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* Mar 1991;26(3):302-306.
159. Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut.* Jan 2011;60(1):26-33.
160. Münz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:423-449.
161. Murthy A, Li Y, Peng I, et al. A Crohn's disease variant in Atg16L1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature.* Feb 27 2014;506(7489):456-462.
162. Naser SA, Arce M, Khaja A, et al. Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J Gastroenterol.* Feb 7 2012;18(5):412-424.
163. Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med.* Jan 2007;13(1):26-28.
164. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med.* Nov 1 1995;182(5):1281-1290.
165. Newman B, Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* Jul 2005;21(4):401-407.
166. Newman B, Silverberg MS, Gu X, et al. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* Feb 2004;99(2):306-315.
167. Niess JH, Klaus J, Stephani J, et al. NOD2 polymorphism predicts response to treatment in Crohn's disease--first steps to a personalized therapy. *Dig Dis Sci.* Apr 2012;57(4):879-886.
168. Niess JH, Brand S, Gu X, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* Jan 14 2005;307(5707):254-258.
169. Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, et al. The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology.* Dec 2005;129(6):1854-1864.
170. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* Feb 16 2001a;276(7):4812-4818.
171. Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut.* Nov 2003;52(11):1591-1597.
172. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* May 31 2001b;411(6837):603-606.
173. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* Nov 2000;13(5):715-725.
174. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* Jan 10 1991;324(2):84-88.
175. Ott C, Obermeier F, Thieler S, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Sep 2008;20(9):917-923.
176. Palomino-Morales RJ, Oliver J, Gomez-Garcia M, et al. Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: a meta-analysis approach. *Genes Immun.* Jun 2009;10(4):356-364.
177. Parkes M. Evidence from genetics for a role of autophagy and innate immunity in IBD pathogenesis. *Dig Dis.* 2012a;30(4):330-333.

178. Parkes M. The genetics universe of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis.* 2012b;30 Suppl 1:78-81.
179. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.* Jul 2007;39(7):830-832.
180. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet.* May 2004;36(5):471-475.
181. Pierik M, Vermeire S, Steen KV, et al. Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Aliment Pharmacol Ther.* Aug 1 2004;20(3):303-310.
182. Plantinga TS, Joosten LA, Netea MG. ATG16L1 polymorphisms are associated with NOD2-induced hyperinflammation. *Autophagy.* Sep 2011a;7(9):1074-1075.
183. Plantinga TS, Crisan TO, Oosting M, et al. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut.* Sep 2011b;60(9):1229-1235.
184. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* Aug 8 2002;347(6):417-429.
185. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology.* May 2007;132(5):1665-1671.
186. Raju D, Hussey S, Jones NL. Crohn disease ATG16L1 polymorphism increases susceptibility to infection with *Helicobacter pylori* in humans. *Autophagy.* Sep 2012;8(9):1387-1388.
187. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet.* May 2007;39(5):596-604.
188. Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet.* Oct 2001;29(2):223-228.
189. Roberts RL, Hollis-Moffatt JE, Gearry RB, Kennedy MA, Barclay ML, Merriman TR. Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun.* Sep 2008;9(6):561-565.
190. Roche, Roche Diagnostics GmbH M. Genotyping und Genescanning2007.
191. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* Apr 2003;124(4):1001-1009.
192. Rousseau MC, Parent ME, St-Pierre Y. Potential health effects from non-specific stimulation of the immune function in early age: the example of BCG vaccination. *Pediatr Allergy Immunol.* Aug 2008;19(5):438-448.
193. Russel MG. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med.* Aug 2000;11(4):191-196.
194. Russel MG, Pastoor CJ, Janssen KM, et al. 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.* 1997;223:88-91.
195. Rutgeerts PJ. An historical overview of the treatment of Crohn's disease: why do we need biological therapies? *Rev Gastroenterol Disord.* 2004;4 Suppl 3:S3-9.
196. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature.* Nov 13 2008;456(7219):264-268.
197. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol.* Jan 2010;11(1):76-83.
198. Schaffler A, Herfarth H. Creeping fat in Crohn's disease: travelling in a creeper lane of research? *Gut.* Jun 2005;54(6):742-744.
199. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* Feb 1999;116(2):301-309.

200. Sehgal R, Berg A, Polinski JI, et al. Mutations in IRGM are associated with more frequent need for surgery in patients with ileocolonic Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. Feb 2012;55(2):115-121.
201. Seiderer J, Glas J, Diegelmann J, et al. M2041 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. *Gastroenterology*. 2008a;134(4):A-456.
202. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, et al. 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*. Dec 2006a;12(12):1114-1121.
203. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, et al. 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*. Dec 2006b;41(12):1421-1432.
204. Seiderer J, Dambacher J, Leistner D, et al. Genotype-phenotype analysis of the CXCL16 p.Ala181Val polymorphism in inflammatory bowel disease. *Clin Immunol*. Apr 2008b;127(1):49-55.
205. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet*. Jan 5 2002;359(9300):62-69.
206. Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev*. Apr 19 2004;56(6):809-818.
207. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. 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*. Nov 1996;39(5):690-697.
208. Silverberg MS, Duerr RH, Brant SR, et al. Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease. *Eur J Hum Genet*. Mar 2007;15(3):328-335.
209. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. 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*. Sep 2005;19 Suppl A:5A-36A.
210. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. Sep 8 2006;313(5792):1438-1441.
211. Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. Mar 2002;50(3):307-313.
212. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology*. Jan 1991;100(1):143-149.
213. Stappenbeck TS. The role of autophagy in Paneth cell differentiation and secretion. *Mucosal Immunol*. Jan 2010;3(1):8-10.
214. Staudinger T. Der Einfluß der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile auf die Pathogenese und den Phänotyp des Morbus Crohn. *Dissertation*. 2008:97.
215. Steffens M, Lamina C, Illig T, et al. SNP-based analysis of genetic substructure in the German population. *Hum Hered*. 2006;62(1):20-29.
216. Stockbrügger RW, Russel MG, van Blankenstein M, Shivananda S. EC-IBD: a European effort in inflammatory bowel disease. *Eur J Intern Med*. Aug 2000;11(4):187-190.
217. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*. Sep 1999;45(3):395-401.
218. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. May 2004;36(5):476-480.
219. Sumpter R, Jr., Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Semin Cell Dev Biol*. Sep 2010;21(7):699-711.
220. Szöllösi J, Damjanovich S, Matyus L. Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research. *Cytometry*. Aug 15 1998;34(4):159-179.
221. Tamboli CP, Cortot A, Colombel JF. What are the major arguments in favour of the genetic susceptibility for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jun 2003;15(6):587-592.

222. Thalmaier D, Dambacher J, Seiderer J, et al. The +1059G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and decreased serum CRP levels in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* Oct 1 2006;24(7):1105-1115.
223. Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking--a review. *Am J Gastroenterol.* Feb 1998;93(2):144-149.
224. Timmer A. Environmental influences on inflammatory bowel disease manifestations. Lessons from epidemiology. *Dig Dis.* 2003;21(2):91-104.
225. Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H. Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm Bowel Dis.* May 1999;5(2):79-84.
226. Török HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology.* Jul 2004;127(1):365-366.
227. Török HP, Glas J, Endres I, et al. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* Jul 2009;104(7):1723-1733.
228. Török HP, Glas J, Tonenchi L, et al. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut.* Oct 2005;54(10):1421-1427.
229. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol.* Jan 2010;11(1):55-62.
230. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, et al. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* May 2007;132(5):1657-1664.
231. Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* Jan 14 2012;18(2):105-118.
232. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. 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.* Jul 1988;29(7):990-996.
233. van Heel DA, Ghosh S, Hunt KA, et al. Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut.* Nov 2005a;54(11):1553-1557.
234. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, et al. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet.* May 21-27 2005b;365(9473):1794-1796.
235. Van Limbergen J, Kabakchiev B, Stempak JM, et al. Hypothesis-free analysis of ATG16L1 demonstrates gene-wide extent of association with Crohn's disease susceptibility. *Gut.* Feb 2013;62(2):331-333.
236. VanDussen KL, Liu TC, Li D, et al. Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology.* Jan 2014;146(1):200-209.
237. Vermeire S, Rutgeerts P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes Immun.* Dec 2005;6(8):637-645.
238. Vermeire S, Wild G, Kocher K, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet.* Jul 2002;71(1):74-83.
239. Wang J, Wang X, Yang H, Wu D, Wang L, Qian J. Contribution of the IBD5 locus to inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Hum Genet.* Jun 2011;129(6):597-609.
240. Waterman M, Xu W, Stempak JM, et al. Distinct and overlapping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: correlations with pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* Sep 2011;17(9):1936-1942.
241. Weber CR, Raleigh DR, Su L, et al. Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem.* Apr 16 2010;285(16):12037-12046.
242. Wellcome Trust Case Control C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* Jun 7 2007;447(7145):661-678.
243. World Medical Association General A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Int Bioethique.* Mar 2004;15(1):124-129.

-
244. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet.* 2007;52(7):575-583.
 245. Yano T, Kurata S. An unexpected twist for autophagy in Crohn's disease. *Nat Immunol.* Feb 2009;10(2):134-136.
 246. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* May 2006;116(5):1310-1316.
 247. Zheng H, Ji C, Li J, et al. Cloning and analysis of human Apg16L. *DNA Seq.* Aug 2004;15(4):303-305.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionelles Schema zum gesunden intestinalen Immunsystem.....	12
Abbildung 2: Das intestinale Immunsystem bei Morbus Crohn.....	13
Abbildung 3: Durch GWAS identifizierte Morbus Crohn-, Colitis ulcerosa- und CED-assozierte Genloci	19
Abbildung 4: Die unterschiedlichen Signalwege der Suszeptibilitätsgene für CED.....	19
Abbildung 5: Position von <i>ATG16L1</i> auf Chromosom 2 (q37.1).....	24
Abbildung 6: Schematisches Modell der Makroautophagie	26
Abbildung 7: Autophagie und das intestinale Epithel	27
Abbildung 8: Grundlegende Schritte der Autophagosom-Bildung	28
Abbildung 9: Struktur von ATG16L1 mit T300A-Variante.....	30
Abbildung 10: Dreidimensionales Strukturmodell der WD-Repeat-Domain von ATG16L1	30
Abbildung 11: Hybridisierungssonde (LightCycler®)	41
Abbildung 12: Fluoreszenzmessung durch Energietransfer	41
Abbildung 13: Unterschiede in der Zielsequenz führen zu abweichenden T_m -Werten	44
Abbildung 14: Genotypisierung mittels Schmelzpunktanalyse.....	44
Abbildung 15: Mechanismen zur Kontrolle von Bakterien mit Interaktion von ATG16L1 und NOD2	66
Abbildung 16: Der <i>ATG16L1</i> -T300A-Polymorphismus beeinflusst zahlreiche Stoffwechselwege in verschiedenen Zelltypen	69

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Montreal-Klassifikation zur klinischen Einteilung des Morbus Crohn.....	2
Tabelle 2: Therapie des Morbus Crohn.....	4
Tabelle 3: Montreal-Klassifikation zur klinischen Einteilung der Colitis ulcerosa	5
Tabelle 4: Untersuchte exogene Risikofaktoren	9
Tabelle 5: Zusammenfassung weiterer Suszeptibilitätsgene bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.....	23
Tabelle 6: Demographische Charakteristika der Studienpopulation	33
Tabelle 7: Verwendete Primer und Sonden bei der RT-PCR.....	35
Tabelle 8: Bei den Untersuchungen verwendete Kits	35
Tabelle 9: Materialien für die Agarosegel-Elektrophorese	36
Tabelle 10: Materialien für die konventionelle PCR.....	36
Tabelle 11: Bei den Untersuchungen verwendetes Verbrauchsmaterial.....	37
Tabelle 12: Bei den Untersuchungen verwendete Geräte	38
Tabelle 13: Bei den Untersuchungen verwendete Software.....	38
Tabelle 14: RT-PCR Protokoll für die Genotypisierung.....	45
Tabelle 15: PCR-Protokoll für die DNA-Amplifikation in der Vorbereitung der Sequenzanalyse	47
Tabelle 16: PCR-Programm für die DNA-Amplifikation in der Vorbereitung der Sequenzanalyse	47
Tabelle 17: Minor-Allel-Frequenzen (MAF), p-Werte des Allel-Tests und Odds-Ratios (OR, für das Minor-Allel) mit 95 % Konfidenzintervall (KI) für Morbus Crohn-Patienten und für die Kontrollgruppe	50
Tabelle 18: Minor-Allel-Frequenzen (MAF), p-Werte des Allel-Tests und Odds-Ratios (OR, für das Minor-Allel) mit 95 % Konfidenzintervall (KI) für Colitis ulcerosa-Patienten und für die Kontrollgruppe	51
Tabelle 19: Allelfrequenzen für Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie für die Kontrollgruppe	52

Tabelle 20: Genotyp-Frequenzen für Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie für die Kontrollgruppe	53
Tabelle 21: Kopplungsungleichgewichtsanalysen für die <i>ATG16LI</i> -SNPs: Werte für D'	54
Tabelle 22: Kopplungsungleichgewichtsanalysen für die <i>ATG16LI</i> -SNPs: Werte für r^2	55
Tabelle 23: Assoziation zwischen rs2241880-Genotypen und Krankheitscharakteristika bei Morbus Crohn in der Subkohorte des Münchner CED-Zentrums (N = 454), für das detaillierte Phänotyp-Daten gemäß der Montreal-Klassifikation verfügbar waren.	57
Tabelle 24: Polymorphe Positionen der untersuchten SNPs	58
Tabelle 25: Einzelne <i>ATG16LI</i> -Varianten zeigten eine Epistasie zu bestimmten <i>IL23R</i> -Varianten, jedoch erreichte nach Korrektur für multiple Testungen (Bonferroni-Korrektur) keiner der berechneten p-Werte Signifikanzniveau.	59

10 Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
A	Adenin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
<i>ATG16L1</i>	Autophagy related 16-like 1 (<i>Gen</i>)
ATG16L1	Autophagy related 16-like 1 (Protein)
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bp	base pair = Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BSN	Bassoon protein
C	Cytosin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CD	Cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CpG	CpG-Dinukleotid (Cytosin-Phosphat-Guanin), methylierte DNA
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4-Antigen	Anti-cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4
CX3CR1	chemokine receptor 1
CXCL16	CXC-Motiv-Chemokin 16
DAP	Death-associated protein
DC	Dendritic cell
DLG5	Drosophila discs large homologue 5
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
EBl ₃	Epstein-Barr virus induced 3
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
FAM92B	Family with sequence similarity 92, member B

FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
G	Guanin (-nucleotide)
GI	Gastrointestinaltrakt
GPX1	Glutathione peroxidase 1
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
HLA	humanes Leukozytenantigen
HNF4A	Hepatocyte nuclear factor 4
IBD	Inflammatory bowel disease
ICOSLG	Inducible T-cell co-Stimulator Ligand
IEC	Intestinal epithelial cell
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL23R	Interleukin-23-Rezeptor
IRGM	Immunity-related GTPase family M
JAK	Janus-Kinase
Kb	Kilobase
KI	Konfidenzintervall
LAMB1	Laminin Beta 1
LC3	= MAP1LC3A = Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha
LC480	Light Cycler [®] 480 (Roche Diagnostics)
LPS	Lipopolysaccharide
LRRK2	Leucine-rich repeat kinase 2
M	Molar
MAF	minor allele frequency = Minor-Allel-Frequenz
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-dipeptid
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid

MST1	Macrophage stimulating 1
MUC	Mucin
NCF4	Neutrophil cytosolic factor 4
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NKX	NK homeobox protein
NLR	Nucleotide binding Domain (NOD) like Receptors
NOD2	Nucleotide oligomerization domain
NSAR	Nicht-Steroidale Antirheumatika
OCTN1	organic cation transporter (siehe SLC22A4/A5)
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PHOX2B	Paired-like homeobox 2b
PRR	Pattern-Recognition Receptor
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
PTGER4	Prostaglandin E Receptor 4
PTPN2/22	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 2/22
RICK	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2 = RIPK2
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real-Time Polymerase chain reaction
SD	Standard deviation = Standardabweichung
SLC22A4/A5	Solute Carrier Family 22 (organic cation/ ergothioneine transporter), Member 4/5
SNP	Single Nukleotid Polymorphism
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TGF	Transforming growth factor
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen

TLR	Toll-like-Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFSF15	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 15
Treg-Zell	regulatorische T-Zelle
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1
XBP1	X-box binding proteine 1
ZNF365	zinc finger protein 365

11 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dipl. Biol. Jürgen Glas, der mich während der experimentellen Phase der Arbeit jederzeit gut betreute.

Für die ausführliche und lehrreiche Einführung in die Laborarbeit danke ich besonders Dr. Martin Wetzke. Im Labor waren mir Laurian Tonenchi und Bouchra Salil eine große Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Folwaczny für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in dem Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der LMU München, wo ein Großteil der Arbeit durchgeführt wurde.

Für die Unterstützung und Durchführung der Sequenzierung bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Herbert Germaier.

Weiterhin gilt insbesondere mein Dank Frau Dr. Julia Diegelmann, die freundlicherweise die Doktorarbeit Korrektur las und mir in der letzten Phase der Arbeit jederzeit für Rückfragen zur Verfügung stand.

Außerdem danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Stephan Brand, der mich auch nach dieser langen Zeit weiter unterstützte und sich für den Abschluss der Promotion einsetzte.

Ohne private Unterstützung wäre die Vollendung dieser Arbeit letztlich nicht möglich gewesen. Hier ist an erster Stelle meine Freundin Johanna Bauer zu nennen, die mir in dieser Zeit die wertvollste Unterstützung war. Schließlich danke ich meinen Eltern und meiner Familie, auf die ich mich immer verlassen kann.

12 Anhang

Sequenzierung

>B1-rs13412102(rs13412102-F)

TTTCTTCTATTACTTGGGTTTCATCCAAMCCTCTCTGGTTCTCAGAGAAGTACGTYCTAGGGCAGGG
TTAGACATGAGAGATTTATTGAAGGAAGTGTCTGTGCAGGAAGATGGGGAGATTACAGGAGGAGK
CTGGGAGAGCTGTCAGGCCATGATGCAGGTCTGACCCTGGTGAAGGAGAGAGGGAAGGAAGGTGA
GGTAGGAAGACTCTCAGCCT

>B1-rs13412102(rs13412102-R)

TCACCTTCCTTCCCTCTCTCCTTCACCAGGGTCAGACCTGCATCATGGCCTGACAGCTCTCCCAGMC
TCCTCCTGTAATCTCCCCATCTTCCTGCACAGACACTTCCTTCAATAAATCTCTCATGTCTAACCTG
CCCTAGRACGTA TCTCTGAGAACCAGAGAGGKTTGGATGAAACCCAAGTAATAGAAGAAAGTG
GGAATGAAAGGAGCTG

>B3-rs13412102(rs13412102-F)

TTTCTTCTATTACTTGGGTTTCATCCAAACCTCTCTGGTTCTCAGAGAAGTACGTTCTAGGGCAGGG
TTAGACATGAGAGATTTATTGAAGGAAGTGTCTGTGCAGGAAGATGGGGAGATTACAGGAGGAGG
CTGGGAGAGCTGTCAGGCCATGATGCAGGTCTGACCCTGGTGAAGGAGAGAGGGAAGGAAGGTGA
GGTAGGAAGACTCTCAGCCT

>B3-rs13412102(rs13412102-R)

TCACCTTCCTTCCCTCTCTCCTTCACCAGGGTCAGACCTGCATCATGGCCTGACAGCTCTCCCAGCC
TCCTCCTGTAATCTCCCCATCTTCCTGCACAGACACTTCCTTCAATAAATCTCTCATGTCTAACCTG
CCCTAGAACGTA TCTCTGAGAACCAGAGAGGTTTGGATGAAACCCAAGTAATAGAAGAAAGTG
GGAATGAAAGGAGCTG

>B8-rs13412102(rs13412102-F)

TTTCTTCTATTACTTGGGTTTCATCCAACCCTCTCTGGTTCTCAGAGAAGTACGTCCTAGGGCAGGG
TTAGACATGAGAGATTTATTGAAGGAAGTGTCTGTGCAGGAAGATGGGGAGATTACAGGAGGAGT
CTGGGAGAGCTGTCAGGCCATGATGCAGGTCTGACCCTGGTGAAGGAGAGAGGGAAGGAAGGTGA
GGTAGGAAGACTCTCAGCCT

>B8-rs13412102(rs13412102-R)

TCACCTTCCTTCCCTCTCTCCTTCACCAGGGTCAGACCTGCATCATGGCCTGACAGCTCTCCCAGAC
TCCTCCTGTAATCTCCCCATCTTCCTGCACAGACACTTCCTTCAATAAATCTCTCATGTCTAACCTG
CCCTAGGACGTA TCTCTGAGAACCAGAGAGGGTTGGATGAAACCCAAGTAATAGAAGAAAGTG
GGAATGAAAGGAGCTG

>B2-rs6431660(rs6431660-F)

TCAGGAGATCCTGCCTGGCTGTGGCCCTGGGAGGCCTTCTGTAGTACTTAAGATATTAGTTTTAGTA
TTTTGGTTAATTTTAGGTGTAGATAATGCTGTTTCACCATTTTCGTCTAAATTCATCCAATTGAAAAC
TRAAAACATTTCTATCTGATTA AACCCCTGATGACTATATTCTTGTATTCTTTATCTGTTAGCCAAAC
TCATGTGCTTGGAATATGCAGCCGTTCT

>B2-rs6431660(rs6431660-R)

AAGCACATGAGTTTGGCTAACAGATAAAGAATACAAGAATATAGTCATCAAGGGTTTAATCAGAT
AGAAATGTTTTYAGTTTTCAATTGGATGAATTTAGACGAAAATGGTGAAACAGCATTATCTACACC
TAAAATTAACCAAATACTAAAATAATATCTTAAGTACTACAGAAGGCCTCCCAGGGCCACAGCC
AGGCAGGATCTCCTGAACTGTTACAAAGCAAGGATGG

>B3-rs6431660(rs6431660-F)

TCAGGAGATCCTGCCTGGCTGTGGCCCTGGGAGGCCTTCTGTAGTACTTAAGATATTAGTTTTAGTA
TTTTGGTTAATTTTAGGTGTAGATAATGCTGTTTCACCATTTTCGTCTAAATTCATCCAATTGAAAAC
TAAAACATTTCTATCTGATTA AACCCCTGATGACTATATTCTTGTATTCTTTATCTGTTAGCCAAAC
TCATGTGCTTGGAATATGCAGCCGTTCT

>B3-rs6431660(rs6431660-R)

AAGCACATGAGTTTGGCTAACAGATAAAGAATACAAGAATATAGTCATCAAGGGTTTAATCAGAT
AGAAATGTTTTAGTTTTCAATTGGATGAATTTAGACGAAAATGGTGAAACAGCATTATCTACACC
TAAAATTAACCAAATACTAAAATAATATCTTAAGTACTACAGAAGGCCTCCCAGGGCCACAGCC
AGGCAGGATCTCCTGAACTGTTACAAAGCAAGGATGG

>B8-rs6431660(rs6431660-F)

TCAGGAGATCCTGCCTGGCTGTGGCCCTGGGAGGCCTTCTGTAGTACTTAAGATATTAGTTTTAGTA
TTTTGGTTAATTTTAGGTGTAGATAATGCTGTTTCACCATTTTCGTCTAAATTCATCCAATTGAAAAC
TGAAAACATTTCTATCTGATTA AACCCCTGATGACTATATTCTTGTATTCTTTATCTGTTAGCCAAAC
TCATGTGCTTGGAATATGCAGCCGTTCT

>B8-rs6431660(rs6431660-R)

AAGCACATGAGTTTGGCTAACAGATAAAGAATACAAGAATATAGTCATCAAGGGTTTAATCAGAT
AGAAATGTTTTCAGTTTTCAATTGGATGAATTTAGACGAAAATGGTGAAACAGCATTATCTACACC
TAAAATTAACCAAATACTAAAATAATATCTTAAGTACTACAGAAGGCCTCCCAGGGCCACAGCC
AGGCAGGATCTCCTGAACTGTTACAAAGCAAGGATGG

>B3-rs1441090(rs1441090-F)

GACTAGTGGAAAACAACGATACTGTGAATGGAAACAAAGAAGTCAGGAGGGCAGGCTTATTATGG
ATAATGTTTGTGGAATGGAAAGACTGAACAAGGGGTAACCTGATGAAGCCACCGTTCAACCTG

CCTTGCCTGCTTTTCATCACTTTTTTCTAGTTCCAAACTCCCCTAGCAAGTCGAGTTGCCAAACAA
CACATAACTAAACTCCCAATAGCTTCCTTATAAATAATAACTGACTGTGGCTCACTACAATAACTG
GTGCTTAAAGTTTTTCTCCAGGAACTAGGAGGCAGCTCTTGCTCATTAAAGCTGGTTGAGACCCCC
AACCTTCAACTGGACCTGTGTGAATGCCCAAG

>B3-rs1441090(rs1441090-R)

CCAGTTGAAGGGTTGGGGTCTCAACCAGCTTTAATGAGCAAGAGCTGCCTCCTAGTTCCTGGAGA
AAAACCTTAAGCACCAGTTATTGTAGTGAGCCACAGTCAGTTATTATTTATAAGGAAGCTATTGGG
AGTTTAGTTATGTGTTGTTTGGCAACTCGACTTGCTAGTGGGAGTTTGGAACTAGAAAAAAGTGAT
GAAAAGCAGGCAAGGCAGGTTGAACGGTGGGCTTCATCAGGTTACCCCTTGTTCACTCTTCCATT
TCCACAAACATTATCCATAATAAGCCTGCCCTCCTGACTTCTTTGTTTCCATTACAGTATCGTTGTT
TTCCACTAGTCATCTATGGTTCCTTCTTCCCTC

>B11-rs1441090(rs1441090-F)

GACTAGTGAAAACAACGATACTGTGAATGGAAACAAAGAAGTCAGGAGGGCAGGCTTATTATGG
ATAATGTTTGTGAAAATGGAAAGACTGAACAAGGGTAACTGATGAAGCCCACCGTTCAACCTG
CCTTGCCTGCTTTTCATCACTTTTTTCTAGTTCCAAACTCCCCTAGCAAGTCGAGTTGCCAAACAA
CACATAACTAAACTCCCAATAGCTTCCTTATAAATAATAACTGACTGTGGCTCACTACAATAACTG
GTGCTTAAAGTTTTTCTCCAGGAACTAGGAGGCAGCTCTTGCTCATTAAAGCTGGTTGAGACCCCC
AAYCCTTCAACTGGACCTGTGTGAATGCCCAAG

>B11-rs1441090(rs1441090-R)

CCAGTTGAAGGRTTGGGGTCTCAACCAGCTTTAATGAGCAAGAGCTGCCTCCTAGTTCCTGGAGA
AAAACCTTAAGCACCAGTTATTGTAGTGAGCCACAGTCAGTTATTATTTATAAGGAAGCTATTGGG
AGTTTAGTTATGTGTTGTTTGGCAACTCGACTTGCTAGTGGGAGTTTGGAACTAGAAAAAAGTGAT
GAAAAGCAGGCAAGGCAGGTTGAACGGTGGGCTTCATCAGGTTACCCCTTGTTCACTCTTCCATT
TCCACAAACATTATCCATAATAAGCCTGCCCTCCTGACTTCTTTGTTTCCATTACAGTATCGTTGTT
TTCCACTAGTCATCTATGGTTCCTTCTTCCCTC

>B299-rs1441090(rs1441090-F)

GACTAGTGAAAACAACGATACTGTGAATGGAAACAAAGAAGTCAGGAGGGCAGGCTTATTATGG
ATAATGTTTGTGAAAATGGAAAGACTGAACAAGGGTAACTGATGAAGCCCACCGTTCAACCTG
CCTTGCCTGCTTTTCATCACTTTTTTCTAGTTCCAAACTCCCCTAGCAAGTCGAGTTGCCAAACAA
CACATAACTAAACTCCCAATAGCTTCCTTATAAATAATAACTGACTGTGGCTCACTACAATAACTG
GTGCTTAAAGTTTTTCTCCAGGAACTAGGAGGCAGCTCTTGCTCATTAAAGCTGGTTGAGACCCCC
AATCCTTCAACTGGACCTGTGTGAATGCCCAAG

>B299-rs1441090(rs1441090-R)

CCAGTTGAAGGATTGGGGTCTCAACCAGCTTTAATGAGCAAGAGCTGCCTCCTAGTTCCTGGAGA
AAAACCTTAAGCACCAGTTATTGTAGTGAGCCACAGTCAGTTATTATTTATAAGGAAGCTATTGGG
AGTTTAGTTATGTGTTGTTTGGCAACTCGACTTGCTAGTGGGAGTTTGGAACTAGAAAAAAGTGAT

GAAAAGCAGGCAAGGCAGGTTGAACGGTGGGCTTCATCAGGTTACCCCTTGTTTCAGTCTTTCCATT
TCCACAAACATTATCCATAATAAGCCTGCCCTCCTGACTTCTTTGTTTCCATTACAGTATCGTTGTT
TTCCACTAGTCATCTATGGTTCCTTCTTCCCTC

>B2-rs2289472(rs2289472-F)

GATAGGTTTAAACCTTAGAAACATTTTGCCCAAATAATCAATCAATAAACAGCCCACAAAAACAGG
TAACTGGGAATATGTTTCCCACTTAGTTCCAAACCCCAGCCAARAGAAACCCAACACAGTACCAA
ACTGCCAGAAAACAGTGGGAAGGGAAAGGGAAAACCCAGCCTAGAAGTTTCAAAGAAACAAGG
TTCCCTAGTATTAATAATTTCCCTGGAAATAAAGCATTAGACAACCTCACAAATTCCTGGCT
AACTAACTTCACAATTTCTGAC

>B2-rs2289472(rs2289472-R)

CAGGAATTGTGAGGTTAGTTGTCTAATGCTTTATTTCCAGGGAAATTAATTTAATACTAGGGAACCT
TGTTTCTTTTGAACCTTCTAGGCTGGGTTTTCCCTTCCCTTCCCACTGTTTTCTGGCAGTTTGGTACT
GTGTTGGGTTTCTYTTGGCTGGGGTTTGGGAACTAAGTGGGAAACATATTCAGTTACCTGTTTTT
GTGGGCTGTTTATTGATTGATTATTTGGGCAAATGTTTCTAAGGTTTAAACCTATCCTCCCCTCCTC
TTTAGTAAGC

>B4-rs2289472(rs2289472-F)

GATAGGTTTAAACCTTAGAAACATTTTGCCCAAATAATCAATCAATAAACAGCCCACAAAAACAGG
TAACTGGGAATATGTTTCCCACTTAGTTCCAAACCCCAGCCAAGAGAAACCCAACACAGTACCAA
ACTGCCAGAAAACAGTGGGAAGGGAAAGGGAAAACCCAGCCTAGAAGTTTCAAAGAAACAAGG
TTCCCTAGTATTAATAATTTCCCTGGAAATAAAGCATTAGACAACCTCACAAATTCCTGGCT
AACTAACTTCACAATTTCTGAC

>B4-rs2289472(rs2289472-R)

CAGGAATTGTGAGGTTAGTTGTCTAATGCTTTATTTCCAGGGAAATTAATTTAATACTAGGGAACCT
TGTTTCTTTTGAACCTTCTAGGCTGGGTTTTCCCTTCCCTTCCCACTGTTTTCTGGCAGTTTGGTACT
GTGTTGGGTTTCTCTTGGCTGGGGTTTGGGAACTAAGTGGGAAACATATTCAGTTACCTGTTTTT
GTGGGCTGTTTATTGATTGATTATTTGGGCAAATGTTTCTAAGGTTTAAACCTATCCTCCCCTCCTC
TTTAGTAAGC

>B8-rs2289472(rs2289472-F)

GATAGGTTTAAACCTTAGAAACATTTTGCCCAAATAATCAATCAATAAACAGCCCACAAAAACAGG
TAACTGGGAATATGTTTCCCACTTAGTTCCAAACCCCAGCCAAGAAACCCAACACAGTACCAA
ACTGCCAGAAAACAGTGGGAAGGGAAAGGGAAAACCCAGCCTAGAAGTTTCAAAGAAACAAGG
TTCCCTAGTATTAATAATTTCCCTGGAAATAAAGCATTAGACAACCTCACAAATTCCTGGCT
AACTAACTTCACAATTTCTGAC

>B8-rs2289472(rs2289472-R)

CAGGAATTGTGAGGTTAGTTGTCTAATGCTTTATTTCCAGGGAAATTAATTTAATACTAGGGAACT
TGTTTCTTTTAAAATTCTAGGCTGGGTTTTCCCTTCCCTTCCCACTGTTTTCTGGCAGTTTGGTACT
GTGTTGGGTTTTTTTTGGCTGGGGTTTTGGGAACTAAGTGGGAAACATATTTCCAGTTACCTGTTTTT
GTGGGCTGTTTATTGATTGATTATTTGGGCAAATGTTTCTAAGGTTTAAACCTATCCTCCCCTCCTC
TTTAGTAAGC

>B193-rs2241880(rs2241880-F)

CTCTGTCTCTTCCCTTCCCAGTCCCCCAGGACAATGTGGATRCTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGTG
AGGGTACCAGCTACTGCCTTGTGTGTCTTCGTAAGTATGCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGA
TATGGTRACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTCTTTCTAGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTA
CTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTGTCAGCTGTGAGAAATTGATATATTTTGCTTAGTTTC
AGAGGACAAAATTTGTTAC

>B193-rs2241880(rs2241880-R)

AGCAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTGGAAAGGCTTGATATAAGTAAA
ACAATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTGCCAGGCTCTGTYACCATATCA
AGCGTGGTAGGGTTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACAAGGCAGTAGCTGGTACCCTC
ACTTCTTTACCAGAACCAGGATGAGYATCCACATTGTCCTGGGGGACTGGGAAGGAAGAGACAGA
GCGTCTCCTAAGAAATAACATAAAGACAAAT

>B195-rs2241880(rs2241880-F)

CTCTGTCTCTTCCCTTCCCAGTCCCCCAGGACAATGTGGATGCTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGTG
AGGGTACCAGCTACTGCCTTGTGTGTCTTCGTAAGTATGCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGA
TATGGTAAACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTCTTTCTAGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTA
CTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTGTCAGCTGTGAGAAATTGATATATTTTGCTTAGTTTC
AGAGGACAAAATTTGTTAC

>B195-rs2241880(rs2241880-R)

AGCAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTGGAAAGGCTTGATATAAGTAAA
ACAATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTGCCAGGCTCTGTTACCATATCA
AGCGTGGTAGGGTTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACAAGGCAGTAGCTGGTACCCTC
ACTTCTTTACCAGAACCAGGATGAGCATCCACATTGTCCTGGGGGACTGGGAAGGAAGAGACAGA
GCGTCTCCTAAGAAATAACATAAAGACAAAT

>B215-rs2241880(rs2241880-F)

CTCTGTCTCTTCCCTTCCCAGTCCCCCAGGACAATGTGGATACTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGTG
AGGGTACCAGCTACTGCCTTGTGTGTCTTCGTAAGTATGCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGA
TATGGTGACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTCTTTCTAGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTA
CTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTGTCAGCTGTGAGAAATTGATATATTTTGCTTAGTTTC
AGAGGACAAAATTTGTTAC

>B215-rs2241880(rs2241880-R)

AGCAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTGGAAAGGCTTGATATAAGTAAA
ACAATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTGCCAGGCTCTGTCACCATATCA
AGCGTGGTAGGGTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACAAGGCAGTAGCTGGTACCCTC
ACTTCTTTACCAGAACCAGGATGAGTATCCACATTGTCCTGGGGGACTGGGAAGGAAGAGACAGA
GCGTCTCCTAAGAAATAACATAAAGACAAAT

>B2-rs2241879(rs2241879-F)

ATCCTTTCTCAGTCAGCTCTGCCATTACAGAGGATGGTTGTAACAAATTTTGTCTCTGAAACTAAG
CAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTGGAAAGGCTTGATATAAGTAAAC
AATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTGCCAGGCTCTGTYACCATATCAAG
CGTGGTAGGGTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACAAGGCA

>B2-rs2241879(rs2241879-R)

AAGTATGCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGATATGGTRACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTC
CTTTCTAGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTACTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTG
TCAGCTGTGAGAAATTGATATATTTGCTTAGTTTCAGAGGACAAAATTTGTTACAACCATCCTCTG
TAATGGCAGAGCTGACTGAGAAAGGATTGCTAGCATGAGGGATGGGGCAAA

>B4-rs2241879(rs2241879-F)

ATCCTTTCTCAGTCAGCTCTGCCATTACAGAGGATGGTTGTAACAAATTTTGTCTCTGAAACTAAG
CAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTGGAAAGGCTTGATATAAGTAAAC
AATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTGCCAGGCTCTGTCACCATATCAAG
CGTGGTAGGGTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACAAGGCA

>B4-rs2241879(rs2241879-R)

AAGTATGCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGATATGGTGACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTC
CTTTCTAGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTACTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTG
TCAGCTGTGAGAAATTGATATATTTGCTTAGTTTCAGAGGACAAAATTTGTTACAACCATCCTCTG
TAATGGCAGAGCTGACTGAGAAAGGATTGCTAGCATGAGGGATGGGGCAAA

>B8-rs2241879(rs2241879-F)

GCAATCCTTTCTCAGTCAGCTCTGCCATTACAGAGGATGGTTGTAACAAATTTTGTCTCTGAAACT
AAGCAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTGGAAAGGCTTGATATAAGTAA
ACAATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTGCCAGGCTCTGTTACCATATC
AAGCGTGGTAGGGTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACAAGGCA

>B8-rs2241879(rs2241879-R)

AAGTATGCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGATATGGTAACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTC

CTTTCTAGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTACTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTG
TCAGCTGTGAGAAATTGATATATTTTGCTTAGTTTCAGAGGACAAAATTTGTTACAACCATCCTCTG
TAATGGCAGAGCTGACTGAGAAAGGATTGCTAGCATGAGGGATGGGGCAAA

>B2-rs3792106(rs3792106-F)

CTGGTCCTCTCCTTTCTCCCCTATTTCTCAGCCCCACCTGGGCCTTCTGCATCTCTGCAGAAGCAC
TGAACGCACGGGCCACTGCAGACCTGCTTCCTCCAAGCCAGTCTTCAGCACTGTCACAGTTCCACC
ACAACCTAACACCATAACCCATTTCTAAAAATCTCTCAAGTCTCCACATGGCTTTACARAAGTCTAAA
CCTTTCAATACAACATAACCCTCATTTTCCAACCTTATTTCTTATCATTTCCCAATTAATTAAGGA
GTGGTTATTTAGAACCTAATAGGCACTGTGCCAGGTGCTGGGGGTACAAAGATGATTAACGCCCCAG
ACACTTGTCTCAGGTAGTCAGCTCTCAGCTTAGTAAAAG

>B2-rs3792106(rs3792106-R)

CTGAGGACAAGTGTCTGGGCGTTAATCATCTTTGTACCCCCAGCACCTGGCACAGTGCCTATTAGG
TTCTAAATAACCACTCCTTGAATTTAATTGGGGAAATGATAAGGAAATAAGGTTGGAAAATGAGGGT
ATGTTGTATTGAAAGTTTAGACTTYTGTAAGCCATGTGGAGACTTGAGAGATTTTTAGAAATGG
GTATGGTGTTAAGTTGTGGTGGAAGTGTGACAGTGCTGAAGACTGGCTTGGAGGAAGCAGGTCTGC
AGTGGCCCCGTGCGTTCAGTGCTTCTGCAGAGATGCAGAAGGCCAGGTGGGGGCTGAGGAAATAG
GGGAGAAAGGAGAGGACCAGGCTCGACACATTGAAGATGAAC

>B4-rs3792106(rs3792106-F)

CTGGTCCTCTCCTTTCTCCCCTATTTCTCAGCCCCACCTGGGCCTTCTGCATCTCTGCAGAAGCAC
TGAACGCACGGGCCACTGCAGACCTGCTTCCTCCAAGCCAGTCTTCAGCACTGTCACAGTTCCACC
ACAACCTAACACCATAACCCATTTCTAAAAATCTCTCAAGTCTCCACATGGCTTTACAAAAGTCTAAA
CCTTTCAATACAACATAACCCTCATTTTCCAACCTTATTTCTTATCATTTCCCAATTAATTAAGGA
GTGGTTATTTAGAACCTAATAGGCACTGTGCCAGGTGCTGGGGGTACAAAGATGATTAACGCCCCAG
ACACTTGTCTCAGGTAGTCAGCTCTCAGCTTAGTAAAAG

>B4-rs3792106(rs3792106-R)

CTGAGGACAAGTGTCTGGGCGTTAATCATCTTTGTACCCCCAGCACCTGGCACAGTGCCTATTAGG
TTCTAAATAACCACTCCTTGAATTTAATTGGGGAAATGATAAGGAAATAAGGTTGGAAAATGAGGGT
ATGTTGTATTGAAAGTTTAGACTTTTGTAAGCCATGTGGAGACTTGAGAGATTTTTAGAAATGG
GTATGGTGTTAAGTTGTGGTGGAAGTGTGACAGTGCTGAAGACTGGCTTGGAGGAAGCAGGTCTGC
AGTGGCCCCGTGCGTTCAGTGCTTCTGCAGAGATGCAGAAGGCCAGGTGGGGGCTGAGGAAATAG
GGGAGAAAGGAGAGGACCAGGCTCGACACATTGAAGATGAAC

>B8-rs3792106(rs3792106-F)

CTGGTCCTCTCCTTTCTCCCCTATTTCTCAGCCCCACCTGGGCCTTCTGCATCTCTGCAGAAGCAC
TGAACGCACGGGCCACTGCAGACCTGCTTCCTCCAAGCCAGTCTTCAGCACTGTCACAGTTCCACC
ACAACCTAACACCATAACCCATTTCTAAAAATCTCTCAAGTCTCCACATGGCTTTACAGAAGTCTAAA

CCTTTCAATACAACATACCCTCATTTTCCAACCTTATTTTCTTATCATTCCCAATTAATAATCAAGGA
GTGGTTATTTAGAACCTAATAGGCACTGTGCCAGGTGCTGGGGGTACAAAGATGATTAACGCCAG
ACACTTGTCTCAGGTAGTCAGCTCTCAGCTTAGTAAAAG

>B8-rs3792106(rs3792106-R)

CTGAGGACAAGTGTCTGGGCGTTAATCATCTTTGTACCCCCAGCACCTGGCACAGTGCCTATTAGG
TTCTAAATAACCACTCCTTGAATTTAATTGGGGAATGATAAGGAAATAAGGTTGGAAAATGAGGGT
ATGTTGTATTGAAAGGTTTAGACTTCTGTAAAGCCATGTGGAGACTTGAGAGATTTTTAGAAATGG
GTATGGTGTTAAGTTGTGGTGAACTGTGACAGTGCTGAAGACTGGCTTGAGGAAGCAGGTCTGC
AGTGGCCCCGTGCGTTCAGTGCTTCTGCAGAGATGCAGAAGGCCAGGTGGGGGCTGAGGAAATAG
GGGAGAAAGGAGAGGACCAGGCTCGACACATTGAAGATGAAC

>B2-rs4663396(rs4663396-F)

ATTTTTTTTCTTTTTTTTTTCTTTTGGAGATGGAGTTTTGCTCTTGTGTGGGGTAYAGTAGTGTGATCT
CAGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTAG
GATTACAGGCATGGCTAATTTTTATATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTTACCATGTTGGCCAGGCTGG
TCTTGAACCTTCTGACCTCAAGGGATCTGCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC

>B2-rs4663396(rs4663396-R)

TTTGGGAGGCCAAGGTGGGCAGATCCCTTGAGGTCAGAAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGG
TGAAACCCCATCTCTACTAAAAATATAAAAATTAGCCATGCCTGTAATCCTAGCTACTCAGGAGGC
TGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGAAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACACTACTRT
ACCCACACAAGAGCAAACTCCATCTCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAATTCATCTTAACA
TTACTTCCTCTGTT

>B4-rs4663396(rs4663396-F)

ATTTTTTTTCTTTTTTTTTTCTTTTGGAGATGGAGTTTTGCTCTTGTGTGGGGTACAGTAGTGTGATCT
CAGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTAG
GATTACAGGCATGGCTAATTTTTATATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTTACCATGTTGGCCAGGCTGG
TCTTGAACCTTCTGACCTCAAGGGATCTGCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC

>B4-rs4663396(rs4663396-R)

TTTGGGAGGCCAAGGTGGGCAGATCCCTTGAGGTCAGAAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGG
TGAAACCCCATCTCTACTAAAAATATAAAAATTAGCCATGCCTGTAATCCTAGCTACTCAGGAGGC
TGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGAAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACACTACTGT
ACCCACACAAGAGCAAACTCCATCTCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAATTCATCTTAACA
TTACTTCCTCTGTT

>B6-rs4663396(rs4663396-F)

ATTTTTTTTCTTTTTTTTTTCTTTTGGAGATGGAGTTTTGCTCTTGTGTGGGGTATAGTAGTGTGATCT

CAGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTAG
GATTACAGGCATGGCTAATTTTTATATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGG
TCTTGAACCTTCTGACCTCAAGGGATCTGCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC

>B6-rs4663396(rs4663396-R)

TTTGGGAGGCCAAGGTGGGCAGATCCCTTGAGGTCAGAAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGG
TGAAACCCCATCTCTACTAAAAATATAAAAATTAGCCATGCCTGTAATCCTAGCTACTCAGGAGGC
TGAGGCAGGAGAATTGCTTGAACCCAGAAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACACTACTAT
ACCCACACAAGAGCAAAACTCCATCTCAAAGAAAAAAGAAAAAATTCATCTTAACA
TTACTTCCTCTGTT

>B3-rs12471449(rs12471449-F)

AGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTATGAGGCAGGAGAAGGAAGGCACAGATTGGTAAGC
TTGCAGGCTATGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTACCTCTTACCCATCATGTGCACCTGG
ACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTCCTCTGAAATAATAATAATGGCCATACCTATAA
AGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTCATTTAATCCTGGGGCACAGAGTTTAA
GCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAGTGCTA

>B3-rs12471449(rs12471449-R)

GCAAGTTGCTTAAACTCTGTGCCCCAGGATTAATGAATTAATACTGACAACGGTGTCTTGCACAC
AGTAAGTGCTTTATAGGTATGGCCATTATTATTATTTTCAGAGGAAGAAAGTGAGGCTCAGGGAGAC
AGGTAACCTTGTCCAGGTGCACATGATGGGTAAGAGGTAGGCAGATTCCAACCCAGCCTGTGGACTC
CATAGCCTGCAAGCTTACCAATCTGTGCCTTCCTTCTCCTGCCTCATAAAAAAGAGCCTGTGTGTTG
ACCTTGAACCTTGTATCTCTCAGATCTCCTGCTG

>B1-rs12471449(rs12471449-F)

AGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTATGAGGCAGGAGAAGGAAGGCACAGATTGGTAAGC
TTGCAGGCTATGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTACCTCTTACCCATCATGTGCACCTGG
ACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTCCTCTGAAATAATAATAATGGCCATACSTATAA
AGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTCATTTAATCCTGGGGCACAGAGTTTAA
GCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAGTGCTA

>B1-rs12471449(rs12471449-R)

GCAAGTTGCTTAAACTCTGTGCCCCAGGATTAATGAATTAATACTGACAACGGTGTCTTGCACAC
AGTAAGTGCTTTATASGTATGGCCATTATTATTATTTTCAGAGGAAGAAAGTGAGGCTCAGGGAGAC
AGGTAACCTTGTCCAGGTGCACATGATGGGTAAGAGGTAGGCAGATTCCAACCCAGCCTGTGGACTC
CATAGCCTGCAAGCTTACCAATCTGTGCCTTCCTTCTCCTGCCTCATAAAAAAGAGCCTGTGTGTTG
ACCTTGAACCTTGTATCTCTCAGATCTCCTGCTG

>B2-rs12471449(rs12471449-F)

AGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTATGAGGCAGGAGAAGGAAGGCACAGATTGGTAAGC
TTGCAGGCTRTGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTACCTCTTACCCATCATGTGCACCTGG
ACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTTCTCTGAAATAATAATAATGGCCATACSTATAA
AGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTCATTTAATCCTGGGGCACAGAGTTTAA
GCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAGTGCTA

>B2-rs12471449(rs12471449-R)

GCAAGTTGCTTAAACTCTGTGCCCCAGGATTAATGAATTAATACTGACAACGGTGTCTTGCACAC
AGTAAGTGCTTTATASGTATGGCCATTATTATTATTTTCAGAGGAAGAAAGTGAGGCTCAGGGAGAC
AGGTAACCTGTCCAGGTGCACATGATGGGTAAGAGGTAGGCAGATTCCAACCCAGCCTGTGGACTC
CAYAGCCTGCAAGCTTACCAATCTGTGCCTTCCTTCTCCTGCCTCATAAAAAAGAGCCTGTGTGTTG
ACCTTGAACCTTGTATCTCTCAGATCTCCTGCTG

>B14-rs12471449(rs12471449-F)

AGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTATGAGGCAGGAGAAGGAAGGCACAGATTGGTAAGC
TTGCAGGCTRTGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTACCTCTTACCCATCATGTGCACCTGG
ACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTTCTCTGAAATAATAATAATGGCCATACGTATAA
AGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTCATTTAATCCTGGGGCACAGAGTTTAA
GCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAGTGCTA

>B14-rs12471449(rs12471449-R)

GCAAGTTGCTTAAACTCTGTGCCCCAGGATTAATGAATTAATACTGACAACGGTGTCTTGCACAC
AGTAAGTGCTTTATACGTATGGCCATTATTATTATTTTCAGAGGAAGAAAGTGAGGCTCAGGGAGAC
AGGTAACCTGTCCAGGTGCACATGATGGGTAAGAGGTAGGCAGATTCCAACCCAGCCTGTGGACTC
CAYAGCCTGCAAGCTTACCAATCTGTGCCTTCCTTCTCCTGCCTCATAAAAAAGAGCCTGTGTGTTG
ACCTTGAACCTTGTATCTCTCAGATCTCCTGCTG

Gesamtsequenzen:

>B1-rs13412102(rs13412102-F)>><<rs13412102-R)

CAGCTCCTTTTCATTCCCCTTTCTTCTATTACTTGGGTTTCATCCAAmCCTCTCTGGTTCTCAGAGAA
GTACGTyCTAGGGCAGGGTTAGACATGAGAGATTTATTGAAGGAAGTGTCTGTGCAGGAAGATGGG
GAGATTACAGGAGGAGkCTGGGAGAGCTGTCAGGCCATGATGCAGGTCTGACCCTGGTGAAGGAG
AGAGGGAAGGAAGGTGAGGTAGGAAGACTCTCAGCCT

>B3-rs13412102(rs13412102-F)>><<rs13412102-R)

CAGCTCCTTTTCATTCCCCTTTCTTCTATTACTTGGGTTTCATCCAAACCTCTCTGGTTCTCAGAGAA
GTACGTTCTAGGGCAGGGTTAGACATGAGAGATTTATTGAAGGAAGTGTCTGTGCAGGAAGATGG
GGAGATTACAGGAGGAGGCTGGGAGAGCTGTCAGGCCATGATGCAGGTCTGACCCTGGTGAAGGA

GAGAGGGAAGGAAGGTGAGGTAGGAAGACTCTCAGCCT

>B8-rs13412102(rs13412102-F)>><<rs13412102-R)

CAGCTCCTTTTCATTCCCACTTTCTTCTATTACTTGGGTTTCATCCAA^CCCTCTCTGGTTCTCAGAGAA
GTACGT^CCTAGGGCAGGGTTAGACATGAGAGATTTATTGAAGGAAGTGTCTGTGCAGGAAGATGG
GGAGATTACAGGAGGAG^TCTGGGAGAGCTGTCAGGCCATGATGCAGGTCTGACCCTGGTGAAGGA
GAGAGGGAAGGAAGGTGAGGTAGGAAGACTCTCAGCCT

>B2-rs6431660(rs6431660-F)>><<rs6431660-R)

CCATCCTTGCTTTGTAACAGTTCAGGAGATCCTGCCTGGCTGTGGCCCTGGGAGGCCTTCTGTAGTA
CTTAAGATATTAGTTTTAGTATTTTTGGTTAATTTTAGGTGTAGATAATGCTGTTTCACCATTTTCGTC
TAAATTCATCCAATTGAAAAC^TAAAAACATTTCTATCTGATTAAACCCTTGATGACTATATTCTTGTA
TTCTTTATCTGTTAGCCAAACTCATGTGCTTGAATATGCAGCCGTTCT

>B3-rs6431660(rs6431660-F)>><<rs6431660-R)

CCATCCTTGCTTTGTAACAGTTCAGGAGATCCTGCCTGGCTGTGGCCCTGGGAGGCCTTCTGTAGTA
CTTAAGATATTAGTTTTAGTATTTTTGGTTAATTTTAGGTGTAGATAATGCTGTTTCACCATTTTCGTC
TAAATTCATCCAATTGAAAAC^AAAAAACATTTCTATCTGATTAAACCCTTGATGACTATATTCTTGT
ATTCTTTATCTGTTAGCCAAACTCATGTGCTTGAATATGCAGCCGTTCT

>B8-rs6431660(rs6431660-F)>><<rs6431660-R)

CCATCCTTGCTTTGTAACAGTTCAGGAGATCCTGCCTGGCTGTGGCCCTGGGAGGCCTTCTGTAGTA
CTTAAGATATTAGTTTTAGTATTTTTGGTTAATTTTAGGTGTAGATAATGCTGTTTCACCATTTTCGTC
TAAATTCATCCAATTGAAAAC^GAAAAACATTTCTATCTGATTAAACCCTTGATGACTATATTCTTGT
ATTCTTTATCTGTTAGCCAAACTCATGTGCTTGAATATGCAGCCGTTCT

>B3-rs1441090(rs1441090-F)>><<rs1441090-R)

GAGGGAAGAAGGAACCATAGATGACTAGTGGA^AAAACAACGATACTGTGAATGGAAACAAAGAAG
TCAGGAGGGCAGGCTTATTATGGATAATGTTTGTGGAAATGGAAAGACTGAACAAGGGGTAACCT
GATGAAGCCCACCGTTCAACCTGCCTTGCTTTTCATCACTTTTTTCTAGTTCCAAACTCCCCT
AGCAAGTCGAGTTGCCAAACAACACATAACTAAACTCCCAATAGCTTCCTTATAAATAAATACTGA
CTGTGGCTCACTACAATAACTGGTGCTTAAAGTTTTTCTCCAGGAAGTAGGAGGCAGCTCTTGCTCA
TTAAAGCTGGTTGAGACCCCA^ACCCTTCAACTGG^ACCCTGTGTGAATGCCCAAG

>B11-rs1441090(rs1441090-F)>><<rs1441090-R)

GAGGGAAGAAGGAACCATAGATGACTAGTGGA^AAAACAACGATACTGTGAATGGAAACAAAGAAG
TCAGGAGGGCAGGCTTATTATGGATAATGTTTGTGGAAATGGAAAGACTGAACAAGGGGTAACCT
GATGAAGCCCACCGTTCAACCTGCCTTGCTTTTCATCACTTTTTTCTAGTTCCAAACTCCCCT
AGCAAGTCGAGTTGCCAAACAACACATAACTAAACTCCCAATAGCTTCCTTATAAATAAATACTGA

CTGTGGCTCACTACAATAACTGGTGCTTAAAGTTTTTCTCCAGGAACTAGGAGGCAGCTCTTGCTCA
TTAAAGCTGGTTGAGACCCCCAAyCCTTCAACTGGACCTGTGTGAATGCCCAAG

>B299-rs1441090(rs1441090-F)>><<rs1441090-R)

GAGGGAAGAAGGAACCATAGATGACTAGTGGAAAACAACGATACTGTGAATGGAAACAAAGAAG
TCAGGAGGGCAGGCTTATTATGGATAATGTTTGTGGAAATGGAAAGACTGAACAAGGGGTAACT
GATGAAGCCCACCGTTCAACCTGCCTTGCTGCTTTTCATCACTTTTTTCTAGTTCCAAACTCCCCT
AGCAAGTCGAGTTGCCAAACAACATAACTAACTCCCAATAGCTTCCTTATAAATAATAACTGA
CTGTGGCTCACTACAATAACTGGTGCTTAAAGTTTTTCTCCAGGAACTAGGAGGCAGCTCTTGCTCA
TTAAAGCTGGTTGAGACCCCCAArCCTTCAACTGGACCTGTGTGAATGCCCAAG

A: Sequenzänderung durch den Primer rs1441090_R, in der Originalsequenz liegt ein G vor.

>B2-rs2289472(rs2289472-F)>><<rs2289472-R)

GCTTACTAAAGAGGAGGGGAGGATAGGTTTAAACCTTAGAAACATTTTGCCCAAATAATCAATCAA
TAAACAGCCCACAAAAACAGGTAAGTGGGAATATGTTTCCCACTTAGTTCCCAAACCCCAGCCAAr
AGAAACCCAACACAGTACCAAAGTCCAGAAAACAGTGGGAAGGGAAAGGGAAAACCCAGCCTA
GAAGTTTCAAAAAGAAACAAGGTTCCCTAGTATTAATTAATTTCCCTGGAAATAAAGCATTAGACA
ACTAACCTCACAATTCCTGGCTAACTAACTTCACAATTTCTGAC

>B4-rs2289472(rs2289472-F)>><<rs2289472-R)

GCTTACTAAAGAGGAGGGGAGGATAGGTTTAAACCTTAGAAACATTTTGCCCAAATAATCAATCAA
TAAACAGCCCACAAAAACAGGTAAGTGGGAATATGTTTCCCACTTAGTTCCCAAACCCCAGCCAAg
AGAAACCCAACACAGTACCAAAGTCCAGAAAACAGTGGGAAGGGAAAGGGAAAACCCAGCCTA
GAAGTTTCAAAAAGAAACAAGGTTCCCTAGTATTAATTAATTTCCCTGGAAATAAAGCATTAGACA
ACTAACCTCACAATTCCTGGCTAACTAACTTCACAATTTCTGAC

>B8-rs2289472(rs2289472-F)>><<rs2289472-R)

GCTTACTAAAGAGGAGGGGAGGATAGGTTTAAACCTTAGAAACATTTTGCCCAAATAATCAATCAA
TAAACAGCCCACAAAAACAGGTAAGTGGGAATATGTTTCCCACTTAGTTCCCAAACCCCAGCCAAa
AGAAACCCAACACAGTACCAAAGTCCAGAAAACAGTGGGAAGGGAAAGGGAAAACCCAGCCTA
GAAGTTTCAAAAAGAAACAAGGTTCCCTAGTATTAATTAATTTCCCTGGAAATAAAGCATTAGACA
ACTAACCTCACAATTCCTGGCTAACTAACTTCACAATTTCTGAC

>B193-rs2241880(rs2241880-F)>><<rs2241880-R)

ATTTGTCTTTATGTTATTTCTTAGGAGACGCTGTCTCTTCCCTCCCAGTCCCCAGGACAATGTGG
ATrCTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGTGAGGGTACCAGCTACTGCCTTGTGTGTCTTCGTAAGTAT
GCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGATATGGTACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTCCCTTTCTA
GGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTACTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTGTCAGCTG
TGAGAAATTGATATATTTTGTCTAGTTTCAGAGGACAAAATTTGTTAC

>B195-rs2241880(rs2241880-F)>><<rs2241880-R)

ATTTGCTTTTATGTTATTTCTTAGGAGACGCTCTGTCTCTTCCTTCCCAGTCCCCCAGGACAATGTGG
ATGCTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGTGAGGGTACCAGCTACTGCCTTGTGTGCTTCGTAAGTAT
GCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGATATGGTACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTCCTTTCT
AGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTACTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTGTCAGCT
GTGAGAAATTGATATATTTTGCTTAGTTTCAGAGGACAAAATTTGTTAC

>B215-rs2241880(rs2241880-F)>><<rs2241880-R)

ATTTGCTTTTATGTTATTTCTTAGGAGACGCTCTGTCTCTTCCTTCCCAGTCCCCCAGGACAATGTGG
ATACTCATCCTGGTTCTGGTAAAGAAGTGAGGGTACCAGCTACTGCCTTGTGTGCTTCGTAAGTAT
GCTTCAGCCCCGAACCCTACCACGCTTGATATGGTGACAGAGCCTGGCAATTAAGGGTCCTTTCT
AGGCCTGCAGCTAAGCATTCCATTGTTTTACTTATATCAAGCCTTTCCACCTTTTGGCTCTGTCAGCT
GTGAGAAATTGATATATTTTGCTTAGTTTCAGAGGACAAAATTTGTTAC

>B2-rs2241879(rs2241879-F)>><<rs2241879-R)

TTTGCCCCATCCCTCATGCTAGCAATCCTTTCTCAGTCAGCTCTGCCATTACAGAGGATGGTTGTAA
CAAATTTTGTCTCTGAAACTAAGCAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTG
GAAAGGCTTGATATAAGTAAACAATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTG
CCAGGCTCTGTyACCATATCAAGCGTGGTAGGGTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACA
AGGCA

>B4-rs2241879(rs2241879-F)>><<rs2241879-R)

TTTGCCCCATCCCTCATGCTAGCAATCCTTTCTCAGTCAGCTCTGCCATTACAGAGGATGGTTGTAA
CAAATTTTGTCTCTGAAACTAAGCAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTG
GAAAGGCTTGATATAAGTAAACAATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTG
CCAGGCTCTGTcACCATATCAAGCGTGGTAGGGTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACA
AGGCA

>B8-rs2241879(rs2241879-F)>><<rs2241879-R)

TTTGCCCCATCCCTCATGCTAGCAATCCTTTCTCAGTCAGCTCTGCCATTACAGAGGATGGTTGTAA
CAAATTTTGTCTCTGAAACTAAGCAAAATATATCAATTTCTCACAGCTGACAGAGCCAAAAGGTG
GAAAGGCTTGATATAAGTAAACAATGGAATGCTTAGCTGCAGGCCTAGAAAGGACCCTTTAATTG
CCAGGCTCTGTtACCATATCAAGCGTGGTAGGGTTCGGGGCTGAAGCATACTTACGAAGACACACA
AGGCA

>B2-rs3792106(rs3792106-F)>><<rs3792106-R)

GTTTCATCTTCAATGTGTCGAGCCTGGTCCTCTCCTTTCTCCCCTATTTCTCAGCCCCACCTGGGCC
TTCTGCATCTCTGCAGAAGCACTGAACGCACGGGCCACTGCAGACCTGCTTCCTCCAAGCCAGTCT

TCAGCACTGTCACAGTTCCACCACAACCTTAACACCATACCCATTTCTAAAAATCTCTCAAGTCTCCA
CATGGCTTTACArAAGTCTAAACCTTTCAATACAACATACCCTCATTTTCCAACCTTATTTCTTATC
ATTCCCCAATTAATTCAAGGAGTGGTTATTTAGAACCTAATAGGCACTGTGCCAGGTGCTGGGGG
TACAAAGATGATTAACGCCAGACACTTGTCTCAGGTAGTCAGCTCTCAGCTTAGTAAAAG

>B4-rs3792106(rs3792106-F)>><<rs3792106-R)

GTTTCATCTTCAATGTGTCGAGCCTGGTCCTCTCCTTTCTCCCCTATTTCTCAGCCCCACCTGGGCC
TTCTGCATCTCTGCAGAAGCACTGAACGCACGGGCCACTGCAGACCTGCTTCTCCAAGCCAGTCT
TCAGCACTGTCACAGTTCCACCACAACCTTAACACCATACCCATTTCTAAAAATCTCTCAAGTCTCCA
CATGGCTTTACAAAGTCTAAACCTTTCAATACAACATACCCTCATTTTCCAACCTTATTTCTTATC
ATTCCCCAATTAATTCAAGGAGTGGTTATTTAGAACCTAATAGGCACTGTGCCAGGTGCTGGGGG
TACAAAGATGATTAACGCCAGACACTTGTCTCAGGTAGTCAGCTCTCAGCTTAGTAAAAG

>B8-rs3792106(rs3792106-F)>><<rs3792106-R)

GTTTCATCTTCAATGTGTCGAGCCTGGTCCTCTCCTTTCTCCCCTATTTCTCAGCCCCACCTGGGCC
TTCTGCATCTCTGCAGAAGCACTGAACGCACGGGCCACTGCAGACCTGCTTCTCCAAGCCAGTCT
TCAGCACTGTCACAGTTCCACCACAACCTTAACACCATACCCATTTCTAAAAATCTCTCAAGTCTCCA
CATGGCTTTACAAAGTCTAAACCTTTCAATACAACATACCCTCATTTTCCAACCTTATTTCTTATC
ATTCCCCAATTAATTCAAGGAGTGGTTATTTAGAACCTAATAGGCACTGTGCCAGGTGCTGGGGG
TACAAAGATGATTAACGCCAGACACTTGTCTCAGGTAGTCAGCTCTCAGCTTAGTAAAAG

>B2-rs4663396(rs4663396-F)>><<rs4663396-R)

AACAGAGGAAGTAATGTTAAGATGAATTTTTTTTTCTTTTTTTTTCTTTTGAGATGGAGTTTTGCTC
TTGTGTGGGGTAyAGTAGTGTGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTTCAAGCAATTCT
CCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTAGGATTACAGGCATGGCTAATTTTTATATTTTAGTAGAGATG
GGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAAGGGATCTGCCACCTTGGCCT
CCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC

>B4-rs4663396(rs4663396-F)>><<rs4663396-R)

AACAGAGGAAGTAATGTTAAGATGAATTTTTTTTTCTTTTTTTTTCTTTTGAGATGGAGTTTTGCTC
TTGTGTGGGGTAcAGTAGTGTGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTTCAAGCAATTCT
CCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTAGGATTACAGGCATGGCTAATTTTTATATTTTAGTAGAGATG
GGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAAGGGATCTGCCACCTTGGCCT
CCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC

>B6-rs4663396(rs4663396-F)>><<rs4663396-R)

AACAGAGGAAGTAATGTTAAGATGAATTTTTTTTTCTTTTTTTTTCTTTTGAGATGGAGTTTTGCTC
TTGTGTGGGGTATAGTAGTGTGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTTCAAGCAATTCT
CCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTAGGATTACAGGCATGGCTAATTTTTATATTTTAGTAGAGATG
GGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAAGGGATCTGCCACCTTGGCCT

CCCAAAGTGCTGGGATTACAGGC

>B3-rs12471449(rs12471449-F)>><<rs12471449-R)

CAGCAGGAGATCTGAGAGATAACAAGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTTATGAGGCAGGAG
AAGGAAGGCACAGATTGGTAAGCTTGCAGGCTATGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTA
CCTCTTACCCATCATGTGCACCTGGACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTTCCTCTGAA
ATAATAATAATGGCCATACCTATAAAGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTC
ATTTAATCCTGGGGCACAGAGTTTAAGCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAAGTGCTA

>B1-rs12471449(rs12471449-F)>><<rs12471449-R)

CAGCAGGAGATCTGAGAGATAACAAGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTTATGAGGCAGGAG
AAGGAAGGCACAGATTGGTAAGCTTGCAGGCTATGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTA
CCTCTTACCCATCATGTGCACCTGGACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTTCCTCTGAA
ATAATAATAATGGCCATACsTATAAAGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTC
TTTAATCCTGGGGCACAGAGTTTAAGCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAAGTGCTA

>B2-rs12471449(rs12471449-F)>><<rs12471449-R)

CAGCAGGAGATCTGAGAGATAACAAGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTTATGAGGCAGGAG
AAGGAAGGCACAGATTGGTAAGCTTGCAGGCTrTGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTAC
CTCTTACCCATCATGTGCACCTGGACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTTCCTCTGAAAT
AATAATAATGGCCATACsTATAAAGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTCATT
TAATCCTGGGGCACAGAGTTTAAGCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAAGTGCTA

>B14-rs12471449(rs12471449-F)>><<rs12471449-R)

CAGCAGGAGATCTGAGAGATAACAAGTTCAAGGTCAACACACAGGCTCTTTTTTATGAGGCAGGAG
AAGGAAGGCACAGATTGGTAAGCTTGCAGGCTrTGGAGTCCACAGGCTGGGTTGGAATCTGCCTAC
CTCTTACCCATCATGTGCACCTGGACAAGTTACCTGTCTCCCTGAGCCTCACTTTCTTCCTCTGAAAT
AATAATAATGGCCATACgTATAAAGCACTTACTGTGTGCAAGACACCGTTGTCAGTATTAATTCAT
TTAATCCTGGGGCACAGAGTTTAAGCAACTTGCCTAAGATATCAGAGGTGATAAAGTGCTA

Eidesstattliche Versicherung

Schroff, Frieder

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der Einfluss von ATG16L1-Polymorphismen auf die Suszeptibilität und den Phänotyp von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

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.

München, 22. Mai 2019

Ort, Datum

Frieder Schroff

Unterschrift Doktorandin/Doktorand