

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie,
Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Varianten im DLG5-Gen und deren Einfluss auf Entstehung und
Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen*

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ghyslaine Sastre Ortegon, geb. Pitre
aus Lahr/Schwarzwald

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. C. Büning
2. Apl. Prof. Dr. med. U. Böcker
3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Maaser

Datum der Promotion: 7.9.2012

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 8 |
| 1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankung | 8 |
| 1.1.1. Krankheitsbild | 8 |
| 1.1.2. Pathogenese | 10 |
| 1.1.2.1. Immunologie und Bakterien | 11 |
| 1.1.2.2. Permeabilität | 11 |
| 1.1.2.3. Genetik | 12 |
| 1.2. <i>NOD2</i> | 13 |
| 1.2.1. Charakterisierung und Funktion | 14 |
| 1.2.2. Korrelation zwischen <i>NOD2</i> -Mutationen und Morbus Crohn | 14 |
| 1.3. Die Entdeckung des <i>DLG5</i> -Gen | 16 |
| 1.3.1. Charakterisierung und Funktion | 16 |
| 1.3.2. <i>DLG5</i> -Polymorphismen und deren Assoziation zu CED | 17 |
| 2. Herleitung der Aufgabenstellung | 19 |
| 2.1. Genetische Varianten bei CED und deren Folgen - Hypothesen | 19 |
| 2.2. Arbeitsgliederung | 20 |
| 3. Material und Methoden | 21 |
| 3.1. Studienteilnehmer | 21 |
| 3.2. Ethik-Kommission | 21 |
| 3.3. Phänotypisierung | 21 |
| 3.4. Genotypisierung | 23 |
| 3.4.1. Technisches Material und Chemikalien | 23 |
| 3.4.2. DNA-Isolierung | 24 |
| 3.4.3. Polymerase-Kettenreaktion | 24 |
| 3.4.4. <i>DLG5</i> -Varianten | 25 |
| 3.4.5. Reinigung des PCR-Produktes | 26 |
| 3.4.6. Schmelzkurvenanalyse von <i>DLG5</i> | 26 |
| 3.4.7. <i>NOD2</i> -Varianten | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5. Gastrointestinale Permeabilität | 30 |
| 3.5.1. Testdurchführung | 31 |
| 3.6. Statistische Verfahren | 32 |
| 3.6.1. Chi-Quadrat-Test | 32 |
| 3.6.2. Exakter Test nach Fisher | 32 |
| 4. Ergebnisse | 34 |
| 4.1. Phänotyp der CED-Patienten | 34 |
| 4.1.1. Phänotyp der Morbus Crohn-Patienten | 34 |
| 4.1.2. Phänotyp der Colitis Ulcerosa-Patienten | 36 |
| 4.2. Häufigkeitsverteilung der <i>DLG5</i> -Varianten und deren Assoziation zu CED | 37 |
| 4.3. <i>DLG5</i> -Varianten bei Trägern von <i>NOD2</i> -Mutationen | 40 |
| 4.4. Assoziation des <i>DLG5</i> -Genotyps zum Phänotyp | 42 |
| 4.4.1. Einfluss von <i>DLG5</i> -Varianten auf den Morbus Crohn Verlauf | 42 |
| 4.4.2. Einfluss von <i>DLG5</i> -Varianten auf Colitis Ulcerosa-Verlauf | 45 |
| 4.5. Alter, Geschlecht und Familienanamnese | 47 |
| 4.6. Rauchverhalten | 47 |
| 4.7. Gastrointestinale Permeabilität | 47 |
| 5. Diskussion | 49 |
| 5.1. Assoziation von <i>DLG5</i> -Varianten mit CED – aktuelle Datenlage | 50 |
| 5.1.1. <i>DLG5</i> -Heterogenität in unterschiedlichen Populationen | 54 |
| 5.1.2. <i>DLG5</i> -Mutationen an phänotypische Merkmale gebunden? | 55 |
| 5.1.3. <i>DLG5</i> und <i>NOD2</i> Interaktion | 56 |
| 5.2. Genotyp-Phänotyp-Analyse | 57 |
| 5.2.1. Protektiver Einfluss von <i>DLG5</i> -Varianten auf Morbus Crohn-Verlauf | 57 |
| 5.2.2. R30Q-Variante als Marker für einen schweren Colitis Ulcerosa-Verlauf? | 58 |

| | |
|--|-----------|
| 5.3. Störung der gastrointestinalen Barriere | 60 |
| 5.3.1. Ursache der veränderten Permeabilität | 61 |
| 5.3.1.1. Tight junctions | 61 |
| 5.3.1.2. Apoptose | 62 |
| 5.4. Die Suche nach weiteren Kandidatengen | 62 |
| 5.4.1. Potentielle Permeabilitätsgene | 63 |
| 6. Zusammenfassung und Ausblick | 65 |
| 7. Literaturverzeichnis | 68 |
| 8. Anhang | 74 |
| 8.1. Lebenslauf | 74 |
| 8.2. Selbständigkeitserklärung | 74 |
| 8.3. Danksagung | 74 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Primer der <i>DLG5</i> -Genotypisierung | 26 |
| Tabelle 2: <i>DLG5</i> -Hybridisierungssonden der Schmelzkurvenanalyse | 27 |
| Tabelle 3: Primer der <i>NOD2</i> -Genotypisierung | 29 |
| Tabelle 4: TaqMan-Sonden der <i>NOD2</i> Real-time PCR | 29 |
| Tabelle 5: Testsubstanzen des gastrointestinalen Permeabilitätstests | 30 |
| Tabelle 6: Häufigkeit demographischer und klinischer Merkmale bei 232 Morbus Crohn-Patienten | 35 |
| Tabelle 7: Häufigkeit demographischer und klinischer Merkmale bei 148 Colitis Ulcerosa-Patienten | 36 |
| Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der <i>DLG5</i> -Varianten bei CED | 38 |
| Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung und Mutationsart der <i>DLG5</i> -Varianten bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa | 39 |
| Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der <i>DLG5</i> -Varianten eingeteilt nach <i>NOD2</i> -Status | 41 |
| Tabelle 11: Genotyp-Phänotyp Vergleich der rs2289308-Variante bei Morbus Crohn | 43 |
| Tabelle 12: Genotyp-Phänotyp Vergleich der <i>DLG5</i> _e26-, D1507D-Variante bei Morbus Crohn | 44 |
| Tabelle 13: Genotyp-Phänotyp Vergleich der R30Q-Variante bei Colitis Ulcerosa | 46 |
| Tabelle 14: Gastrointestinale Permeabilität und <i>DLG5</i> -Varianten bei Morbus Crohn-Patienten | 48 |
| Tabelle 15: Häufigkeit der R30Q-Variante in verschiedenen Populationen | 53 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| CARD | engl. caspase activation recruitment domain |
| CDH1 | E-cadherin |
| CED | chronisch entzündliche Darmerkrankung |
| CDAI | engl. crohn's disease activity index |
| CU | Colitis Ulcerosa |
| DLG5 | engl. Drosophila discs large homolog 5 |
| DMBT1 | engl. deleted in malignant brain tumors 1 |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphaten |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| HPLC | engl. high performance liquid chromatography |
| IBD | engl inflammatory bowel disease |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| ITLN1 | Interlectin 1 |
| JAM | engl. junctional adhesion molecule |
| LRR | engl. leucin-rich repeats |
| MAGUK | Membran-assoziierten Guanylatkinase |
| MC | Morbus Crohn |
| NF- κ B | engl nuclear factor κ (kappa) B |
| NOD | engl. nucleotide oligomerisation domain |
| OCTN | engl. organic cation transporter cluster |
| OR | engl. odds ratio |
| PCR | engl. polymerase chain reaction |
| SNP | engl. single nucleotide polymorphism |
| STAT3 | engl. signal transducer and activator of transmission 3 |
| TDT | engl. transmission desequilibrium test |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| TRD | engl. transmission ratio distortion |
| T:U | engl. transmitted:untransmitted |
| XBP1 | engl. X box binding protein 1 |
| ZO | zonula occludens |

1. Einleitung

1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankung

1.1.1. Krankheitsbild

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehören in erster Linie der Morbus Crohn und die Colitis Ulcerosa. Sie weisen hinsichtlich des makroskopischen und histologischen Erscheinungsbildes, des Verteilungsmusters sowie des Auftretens von Komplikationen Unterschiede auf. Trotzdem gibt es große Überschneidungen in Symptomatik, Epidemiologie, Entstehung und Therapiemöglichkeiten. Nicht eindeutig zuordnen lassen sich 10 % der Erkrankungen, diese werden als Colitis indeterminata oder als nicht klassifizierbare Colitis bezeichnet.

Das Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankung ist starken geographischen und ethnischen Schwankungen unterworfen. Während der Morbus Crohn erstmalig zu Beginn des letzten Jahrhunderts durch den polnischen Chirurgen Antoni Leśniowski beschrieben wurde, war die Colitis Ulcerosa bereits seit 1859 als nicht bakterielle Erkrankung des Colons bekannt. Beide Erkrankungsformen wiesen initial eine stetig steigende Inzidenz auf. Aktuell wird in Industrienationen eine Stabilisierung der Inzidenz beobachtet. In Ländern wie den USA, Großbritannien, Norwegen und Schweden findet sich die höchste Rate an CED. In Deutschland wird die Prävalenz für Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa auf 125-200 bzw. 210 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner geschätzt. Die niedrigsten Raten werden in Südamerika, Afrika und Asien verzeichnet. Ethnische Unterschiede spiegeln sich z.B. unter den aschkenasischen Juden wieder, bei denen die Wahrscheinlichkeit an Morbus Crohn zu erkranken um das 5,4-7,7-fache gesteigert ist verglichen mit Nicht-Aschkenasen derselben geographischen Region (Mayberry et al. 1986). Innerhalb der weißen Bevölkerung sind Juden insgesamt häufiger von CED betroffen, schwarzhäutige Menschen im Vergleich zu weißhäutigen seltener (Calkins and Mendeloff 1986).

Beide Erkrankungen treten vorzugsweise im frühen Erwachsenenalter mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr auf. Männer und Frauen sind bei der Colitis Ulcerosa gleich häufig betroffen, während es beim Morbus Crohn, insbesondere beim familiär auftretendem Morbus Crohn, eine leichte Prädominanz für Frauen gibt (Peeters M et al. 2000).

Beide Störungen sind charakterisiert durch einen typisch chronisch rezidivierenden Verlauf einer Entzündung. Das klinische Erscheinungsbild ist geprägt durch abdominelle krampfartige Schmerzen, Diarrhoen, begleitet von Völlegefühl und Meteorismus. Blutauflagerungen und Tenesmen werden vornehmlich bei der Colitis Ulcerosa beobachtet. Weitere Symptome chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind Fieber, Gewichtsverlust, allgemeine Schwäche, Anämie und bei Kindern Wachstumsstörungen. Mit Hilfe sogenannter Aktivitätsindexe, bestehend aus klinischen und laborchemischen Parametern, wird der Krankheitsverlauf beurteilt, beim Morbus Crohn z.B. des CDAI (crohn's disease activity index).

Der Leidensdruck der Patienten wird nicht zuletzt durch die Komplikationen verstärkt. Typische Komplikation des Morbus Crohn sind Fisteln (40%), anorektale Abszesse (25%) und Darmstenosen, die häufig zu einem Subileus/Ileus führen. Durch den vornehmlichen Ileumbefall beim Morbus Crohn treten spezifische Resorptionsstörungen auf: eine megaloblastären Anämie durch Vitamin B12-Mangel oder Cholesterin-Gallensteinen und Oxalat-Nierensteinen durch den Verlust von Gallensäuren. Die Krankheitsdauer und das Ausmaß des Kolonbefalls bei der Colitis Ulcerosa korrelieren mit der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. Vor einigen Jahren konnte belegt werden, dass ebenfalls Morbus Crohn-Patienten mit einem Colonbefall einem erhöhten Risiko an kolorektalem Karzinom zu erkranken, ausgesetzt sind (Jess T et al. 2005). Das sogenannte toxische Megakolons ist eine Komplikation der Colitis Ulcerosa, eine perforationsgefährdete Kolondilatation, die durch eine Darmparalyse verursacht wird und von septischen Temperaturen und einer Peritonitis begleitet wird.

Extraintestinale Manifestationen können im Rahmen beider Erkrankungen entstehen. Bei Patienten mit Morbus Crohn sind sie mit über 50% jedoch weitaus häufiger und korrelieren nur zum Teil mit dem gastrointestinalen Befall. Zu ihnen zählen Erscheinungen an der Haut wie Aphten, das Erythema nodosum oder das Pyoderma gangraenosum. Manifestationen an den Augen kommen in 7% der Fälle vor, z.B. in Form einer Episkleritis oder einer Uveitis. Arthritiden kommen in 25% der Fälle vor, eine HLA-B27 positive ankylosierende Spondylitis seltener. Die primär sklerosierende Cholangitis ist eher typisch für die Colitis Ulcerosa.

Das histologisch-pathologische Bild ist ein wichtiger Anhaltspunkt zur Differenzierung beider Erkrankungen. Der Morbus Crohn ist gekennzeichnet durch segmental auftretende Entzündungsherde, die den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen

können. Schleimhautveränderungen werden auch als Pflastersteinrelief bezeichnet. Ein isolierter Befall des Ileums findet sich in 30% der Fälle, ein isolierter Kolonbefall bei 25% der Fälle. Es überwiegt also ein gleichzeitiger Befall von Kolon und terminalem Ileum (45%). Der proximale GI-Trakt ist seltener befallen. Bei der Colitis Ulcerosa beginnt die Entzündung in der Regel im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal aus, wobei das Kolon meist nicht überschritten wird. Eine Involvierung des Ileums in Form einer sogenannten „Backwashileitis“ ist selten. Die Entzündungsreaktion ist hier auf die oberflächliche Schleimhaut beschränkt. Im frischen Stadium imponieren Kryptenabszesse während im fortgeschrittenen Stadium rezidivierende Ulzerationen zur Schleimhautatrophie führen. Epitheldysplasien sollten frühzeitig erkannt werden.

Eine kausale Therapie, im Sinne einer Heilung der Krankheit, konnte bisher nicht entwickelt werden. Ziel der Behandlung ist eine Linderung der Beschwerden, eine Reduzierung der Komplikationsrate und die Verhinderung eines Rezidivs. Die medikamentöse Therapie stützt sich auf vier Substanzgruppen: Aminosalizylate, Kortikosteroide, Immunsuppressiva und Biologica.

Der Leidensdruck der Patienten ist groß. Ein besseres Verständnis der Ätiologie und der Pathogenese ist unabdingbare Voraussetzung, um den Patienten bessere Behandlungsmöglichkeiten bieten zu können.

1.1.2. Pathogenese

Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankung ist trotz reger Forschung und zunehmender Erkenntnisse zur Pathogenese weiterhin nicht vollständig geklärt. Nach heutigem Erkenntnisstand wird von einer Invasion von Bakterien und anderen mukosalen Antigenen in die Darmmukosa ausgegangen, welche durch eine defekte Barrierefunktion der intestinalen Schleimhaut ermöglicht wird. Das darmassoziierten Immunsystem scheint eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer überschießenden, sich selbst unterhaltenden Entzündungsreaktion, zu spielen.

Die Erkrankung kann als Zusammenspiel einer immunologischen Störung gegenüber der Darmflora und einer veränderten Permeabilität der Darmschleimhaut bei genetischer Prädisposition verstanden werden. Umweltfaktoren fungieren wahrscheinlich als Trigger, die zum Ausbruch der Erkrankung führen. Im Folgenden wird die Bedeutung der einzelnen pathogenetisch relevanten Faktoren hervorgehoben.

1.1.2.1. Immunologie und Bakterien

Der menschliche Darm ist einer Vielzahl verschiedener Bakterien und anderen potentiellen Antigenen ausgesetzt. Im gesunden Darm besteht eine Homöostase, wodurch immunologische Reaktionen kontrolliert werden. Welche Rolle spielt die Standortflora des Darmes im Entzündungsprozess CED? Interessant ist die Feststellung, dass CED-Patienten eine erhöhte Konzentration fäkaler Bakterien im Darm aufweisen (Swidsinski, et al. 2002). Es wurde gezeigt, dass die Konzentration mukosaler Bakterien sowohl in befallenen Darmabschnitten wie auch in nicht befallenen Darmabschnitten mit dem Schweregrad der Erkrankung steigt. Gleichzeitig findet sich eine verminderte Bakterienzahl wie Bifidobakterien, die als protektiv angesehen werden. Eine pathologische Aktivierung des lokalen intestinalen Immunsystems durch bakterielle und andere mukosale Antigene führt zu einer Änderung der Zytokinsekretion intestinaler Makrophagen und der T-Zellen zugunsten proinflammatorischer Zytokine sowie zu einem veränderten Migrationsverhalten dieser Zellen. In der Folge entsteht eine Entzündungsreaktion. Einige CED-Patienten profitieren von dem therapeutischen Einsatz von Antibiotika oder Probiotika, was die Hypothese einer gestörten Interaktion von Darmflora und darmassoziierten Immunsystem unterstützt.

Auch Umweltfaktoren spielen bei der Krankheitsentstehung der CED eine Rolle. Die rasch steigende Inzidenz in entwickelten Ländern, das vermehrte Auftreten von Morbus Crohn bei Familienangehörigen und die nicht vollständige Konkordanzrate eineiiger Zwillinge sind starke Indizien für Umweltfaktoren bei der Entstehung von CED. Rauchen stellt für die Entwicklung des Morbus Crohn nachweislich einen Risikofaktor dar, während es protektiv auf die Entstehung der Colitis Ulcerosa wirkt (Boyko et al. 1987). Die Rolle vieler anderer Umweltfaktoren wie Stress, Infektionen, der soziale Status und Essensgewohnheiten sind noch nicht vollständig geklärt.

1.1.2.2. Permeabilität

Die epitheliale Barriere des GI-Traktes ist nicht nur für die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushalt zuständig, sondern schützt das darunterliegende Interstitium vor einer Aufnahme potentieller Noxen wie z.B. intraluminale Bakterien. Welche immunologische Bedeutsamkeit eine funktionsfähige Epithelschicht für eine kontrollierte Aktivität des darmassoziierte Immunsystems hat, ist noch nicht vollständig geklärt.

Bei Morbus Crohn-Patienten wurden Störungen der gastrointestinalen Barrierefunktion in Sinne einer erhöhten gastrointestinalen Permeabilität festgestellt, auch wenn sich die Patienten in Remission befinden (Wyatt et al. 1993). Diese funktionellen Änderungen sind häufig unabhängig von makroskopisch sichtbaren, strukturellen Veränderungen am Darm. Bereits Anfang der 90er Jahre wurde eine erhöhte intestinale Permeabilität als positiven Vorhersagewert für ein Rezidiv beschrieben (Wyatt et al. 1993). Die erhöhte Permeabilität zeigt eine starke familiäre Häufung- 10 bis 54% der scheinbar gesunden Verwandten ersten Grades von Crohn-Patienten weisen eine erhöhte Permeabilität auf (Hollander.1993; May et al. 1993). Es ist demnach anzunehmen, dass erst die erhöhte Permeabilität die Entstehung einer Entzündungsreaktion begünstigt und nicht umgekehrt die Entzündungsreaktion zu einer veränderten Permeabilität führt.

In einer Studie unserer Klinik wurde die Permeabilität von Patienten mit Morbus Crohn mittels eines in vivo Drei-Zucker-Trinktests gemessen und mit deren Verwandten ersten Grades und deren Nicht-Verwandten Haushaltsbewohner verglichen (Buhner et al. 2006). Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob die veränderte Permeabilität im Hintergrund einer genetischen Störung oder vielmehr als eine Folge von Umwelteinflüssen zu sehen ist. Die erhöhte Permeabilität ließ sich signifikant häufiger bei Crohn-Patienten (44%) und deren Verwandten (26%) nachweisen während nicht-verwandte Haushaltsbewohner nur selten betroffen sind (6%). Zudem war kein Unterschied hinsichtlich der Permeabilität zwischen den im selbigen Haushalt lebenden Verwandten und den im separaten Haushalt lebenden Verwandten nachweisbar. Daraus lässt sich auf einen genetischen Einfluss der veränderten Permeabilität schließen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine genetische Prädisposition mit einer gestörten Barrierefunktion des Darmes korrelieren könnte. Dadurch könnte das darmassoziierte Immunsystem vermehrt intraluminalen Antigenen ausgesetzt sein mit konsekutiver Entzündungsreaktion. Die genauen Ursachen der Barriestörung zu eruieren ist Ziel der Forschung.

1.1.2.3. Genetik

Bereits in den neunziger Jahren konnte anhand epidemiologischer Studien eindeutig der genetische Einfluss auf die Entstehung CED belegt werden.

Eine positive Familienanamnese kann in fünf bis zehn Prozent der Erkrankungsfälle erhoben werden (Russel et al. 1997). In den betroffenen Familien haben 75% denselben

Erkrankungstyp (Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa) und die restlichen 25% weisen beide Subtypen in der Familie auf (Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa) (Binder 1998). Diese Daten bekräftigen die Hypothese, dass neben „gemeinsamen“ Anfälligkeitgenen andere Gene existieren, die spezifisch für Morbus Crohn oder für Colitis Ulcerosa sind. Anhand einer Kohortenstudie schätzten Orholm und Kollegen das Risiko an CED zu erkranken für Angehörige ersten Grades bei Morbus Crohn-Patienten auf das 14-fache erhöht und bei Colitis Ulcerosa-Patienten auf das 10-fache erhöht (Orholm et al. 1991).

Da die familiäre Häufung sowohl genetische wie auch umweltbedingte Risikofaktoren widerspiegeln können, wurden Zwillingsstudien durchgeführt, die den genetischen Einfluss belegen sollten. Die Konkordanzrate für Morbus Crohn beträgt bei monozygoten Zwillingen 20-50%, während die Konkordanzrate bei dizygoten Zwillingen unter 10% liegt (Orholm et al. 2000, Thompson et al. 1996, Tysk et al. 1988). Die unterschiedliche Konkordanzrate unterstreicht, dass sowohl genetische Veränderungen als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Da die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen keine 100% beträgt, muss von zusätzlichen nicht-genetischen Einflüssen ausgegangen werden, die die Auslösung der Erkrankung triggern. Bezüglich Colitis Ulcerosa ist der genetische Einfluss geringer. Die Konkordanzrate beträgt hier 16% unter monozygoten Zwillingen und 4% unter dizygoten Zwillingen.

Eine große Herausforderung für die Forschung ist es, die möglichen CED-Gene zu identifizieren und so den genetischen Hintergrund dieser Erkrankung zu erfassen.

1.2. *NOD2*

Im Jahr 1996 war es Hugot und Kollegen gelungen durch genomweite Kopplungsanalysen einen Chromosomenabschnitt in der perizentromeren Region auf dem Chromosom 16 als krankheitsverursachenden Genlocus (IBD1) zu identifizieren (Hugot et al. 1996). Der Durchbruch gelang im Jahre 2001, als zwei unabhängige Forschungsgruppen das erste Gen identifizierten, dem eine Anfälligkeit für das Entstehen Morbus Crohns zugeschrieben wird: das *NOD2*-Gen (Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001). Heute scheint das *NOD2*-Gen trotz Identifizierung multipler weiterer Risikogene mit der stärksten Risikoerhöhung für die Entwicklung eines Morbus Crohns einherzugehen.

1.2.1. Charakterisierung und Funktion

Das *NOD2*-Gen auf Chromosom 16q12 besteht aus zwei N-terminal gelegenen „caspase activation recruitment domains“ (CARD), einer zentralen Nukleotid-bindenden (NOD) Region und einer C-terminal gelegenen LRR-Region (leucin-rich repeats) (Hugot et al. 2001). Das Transkriptionsprodukt wird vorwiegend in intestinalen Epithelzellen, u.a. in den Panethschen Zellen des Dünndarms, in intestinalen Myofibroblasten, in Endothelzellen und in Monozyten und Granulozyten exprimiert (Lala et al. 2003; Davey et al. 2006). Das *NOD2*-Protein fungiert dabei als intrazellulärer Rezeptor für Muramyldipeptid, das ein Bestandteil der Zellwand sowohl grampositiver wie auch gramnegativer Bakterien ist (Girardin et al. 2003; Inohara et al. 2003). Nach Bindung an diesen Rezeptor werden unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst, u.a. der NF- κ B Signalweg, der für die Transkription proinflammatorischer Zytokine verantwortlich ist. Zu den bisher erforschten von *NOD2* vermittelten Funktionen gehört also die Induktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und die Aktivierung von T-Zellen durch Hoch-Regulierung stimulierender Mediatoren (Todate et al. 2001; Vidal et al. 2001; Fritz et al. 2005). Ferner trägt *NOD2* zur epithelialen Zellabwehr und zur Bildung antibakterieller Substanzen wie Defensine bei (Voss et al. 2006).

Trotz aller Erkenntnisse ist es noch unklar, wie *NOD2* vermittelte Funktionen zu einer optimalen intestinalen Immunhomöostase beitragen und inwiefern Dysregulationen dieser Funktionen den Menschen anfällig für die Entwicklung von Morbus Crohn machen. Allein die Frage ob Mutationen innerhalb des *NOD2*-Gens zu einem Funktionsverlust oder zu einer übersteigerten Funktion des Transkriptionsproduktes führen, bleibt zu beantworten.

1.2.2. Korrelation zwischen *NOD2*-Mutationen und Morbus Crohn

Drei Polymorphismen innerhalb oder in der Nähe der LRR-Region von *NOD2* sind nachweislich unabhängig voneinander mit Morbus Crohn assoziiert. Dazu gehören die zwei Missense-Mutationen Arg702Trp und Gly908Arg sowie eine Cytosinininsertion im Nukleotid 3020, genannt 3020insC oder Leu1007fsinsC. Letztere Mutation führt zu einem vorzeitigen Abbruch der letzten 33 Aminosäuren während der Transkription des kodierenden Proteins.

In einer großen europäischen Metaanalyse betrug das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken für Träger einer Sequenzvariante das 2,39-fache während für Träger von

zwei Sequenzvarianten das Risiko auf das 17,1-fache stieg (Economou et al. 2004). In Populationen europäischer Herkunft konnte gezeigt werden, dass 35-45% der Morbus Crohn-Patienten Träger von mindestens einem der drei Risikoallelen sind, wovon ca. 10% zwei Risikoallele in sich tragen (Vermeire et al. 2005). Hier handelt es sich um Homozygoten oder um kombinierte Heterozygoten, sprich Träger von zwei verschiedenen Sequenzvarianten.

Auffällig ist eine große genetische Heterogenität in den unterschiedlichen Populationen. So waren die Trägerraten der Risikoallele in Europa unter skandinavischen (Heliö et al. 2003), irischen (Baired et al. 2003) und schottischen (Arnott et al. 2004) Morbus Crohn-Patienten am kleinsten. Unter den gesunden Kontrollen beträgt die Trägerhäufigkeit für jede der drei Sequenzvarianten unter 5%, jedoch nur in europäischen Populationen. In asiatischen (Inoue et al. 2002) und afroamerikanischen Populationen (Kugathasan et al. 2005) sind die drei Mutationen sehr viel seltener als in weißen Populationen sowohl unter den Morbus Crohn-Patienten als auch unter den Kontrollen. In diesen Bevölkerungsgruppen konnte bisher keine Assoziation zwischen *NOD2*-Mutationen und Morbus Crohn nachgewiesen werden.

In weiteren Studien ging man der Frage nach, ob die *NOD2*-Polymorphismen in Zusammenhang mit einem bestimmten Phänotyp der Erkrankung stehen. Es wurde erstmals durch Lesage und Kollegen eine signifikante Assoziation zwischen Trägern der *NOD2*-Sequenzvarianten und einem Ileumbefall, einem stenosierenden Krankheitsverlauf und einem 2-3 Jahre früheren Krankheitsausbruch verglichen mit Morbus Crohn-Patienten, die den *NOD2*-Wildtyp tragen, beschrieben (Lesage et al. 2002). In einer Studie unserer Abteilung wurde neben dem frühen Krankheitsausbruch und dem Ileumbefall ein erhöhtes Risiko für ileozökale Resektionen und postoperative Rezidive bzw. Reoperationen bei Vorliegen einer *NOD2*-Mutation festgestellt (Büning et al. 2004).

Ein weiterer interessanter Punkt in Zusammenhang mit *NOD2* ist die Permeabilität. Wie bereits beschrieben ist die familiäre Häufung ein starkes Indiz für eine genetische Ursache der erhöhten Darmpermeabilität, die bei einer Vielzahl von Morbus Crohn-Patienten beobachtet wird. Die Darmpermeabilität bei Morbus Crohn-Patienten, die eine der *NOD2*-Mutation tragen, ist nicht signifikant erhöht verglichen mit Wildtyp-Patienten (Bühner et al. 2006). Nur unter den gesunden Morbus Crohn-Verwandten ersten Grades, die Träger einer 3020insC-Mutation, fiel eine signifikante Permeabilitäerhöhung

verglichen mit den Wildtyp-Verwandten auf (40% vs. 15%, $p=0,027$), so dass durchaus eine *NOD2* mitverursachte, dem Krankheitsausbruch vorausgehende Störung der intestinalen Barrierefunktion möglich erscheint. Die Tatsache, dass unter den Morbus Cohn-Patienten (44%) sowie deren Verwandten ersten Grades (26%) die Permeabilität signifikant erhöht ist verglichen mit Nicht-Verwandten Haushaltsbewohner (6%) zeigt, dass neben *NOD2* andere Gene existieren müssen, die für die Aufrechterhaltung einer intakten Barrierefunktion verantwortlich sind.

Unter dem Gesichtspunkt einer der Krankheit vorausgehenden, genetisch bedingten Permeabilitätsstörung, ist diese durch *NOD2*-Mutationen nicht ausreichend erklärt. Die Erforschung der verantwortlichen Gene stellt eine große Herausforderung dar.

1.3. Die Entdeckung des *DLG5*-Gen

Im Jahre 2004 wies eine Arbeitsgruppe aus Kiel genetische Variationen im *DLG5*-Gen nach, die signifikant mit dem Auftreten CED und Morbus Crohn assoziiert sind (Stoll et al. 2004). Die Entdeckung eines weiteren CED-Gens, das seit der Entdeckung *NOD2* eifrig gesucht wurde, schien ein weiterer Meilenstein in der Entschlüsselung der Pathogenese CED. Diese Assoziation gilt es zu replizieren und so die Fundamente des genetischen Hintergrunds CED zu erhärten.

1.3.1. Charakterisierung und Funktion

DLG5 steht für Drosophila Discs Large Homolog 5. Das *DLG5*-Gen auf Chromosom 10q23 umfasst einen Bereich von 79-kb und enthält 32 Exons. Es wird am meisten in Plazentagewebe, in Herz- und Skelettmuskulatur, in der Leber, im Dünndarm und im Kolon exprimiert (Shah et al. 2002). Das *DLG5*-Transkriptionsprodukt gehört zur Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinase (MAGUK). Es enthält 4 PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne (Src-homology 3), gefolgt von einer Guanylatkinase (GUK)-Domäne. Außerdem liegt N-terminal eine Domäne unbekannter Funktion, DUF622 genannt. MAGUK-Proteine interagieren mit anderen Proteinen und sind so an der Bildung großer Proteinkomplexe beteiligt. Sie sind entscheidend beim Erhalt der Zellform und der Zellpolarität (Humbert et al. 2003). Sie fungieren dabei als Bindungspartner von Vinexin und Beta-Catenin an Zell-Zell-Kontaktstellen (Wakabayashi et al. 2003) und spielen eine wichtige Rolle beim Erhalt der epithelialen Zellintegrität (Nakamura et al. 1998).

Unter diesem Gesichtspunkt kann durchaus angenommen werden, dass das DLG5-Transkriptionsprodukt für die Aufrechterhaltung einer regelrechten intestinalen Barrierefunktion verantwortlich ist. Genveränderungen innerhalb *DLG5* könnten somit zu der noch nicht geklärten Beeinträchtigung der Permeabilität führen, die nach heutigen Erkenntnissen möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer CED spielt.

1.3.2. *DLG5*-Polymorphismen und deren Assoziation zu CED

Durch Positionsklonierung wurden innerhalb des *DLG5*-Gens verschiedene Varianten aufgedeckt, die mit CED assoziiert sind (Stoll et al. 2004). Bereits 1999 wurde in einem genomweiten Scan an 282 betroffenen Familien ein Genlocus in der perizentromeren Region auf Chromosom 10 mit einer erhöhten CED-Anfälligkeit assoziiert (Hampe et al. 1999). Davon ausgehend wurde die Kopplungsregion auf Chromosom 10 mit SNPs in einem mittleren Abstand von 75000 Basenpaaren genotypisiert. Im „Transmission Disequilibrium Test“ zeigte sich eine Assoziation mit dem Auftreten von CED. Nach Feinkartierung konnte schließlich die Krankheitsassoziation auf ein DNA-Segment eingegrenzt werden, welches das *DLG5*-Gen enthält. Die nachfolgende Resequenzierung des Gens bei CED-Patienten zeigte, dass insgesamt 33 Genvarianten in *DLG5* existieren, welche die Grundlage für 4 häufig vorkommende Haplotypen bilden.

Der sogenannte Haplotyp D ist gekennzeichnet durch einen Polymorphismus am Nukleotid 113, so dass auf Position 30 in der DUF622-Domäne die Aminosäure Arginin zu Glutamin umgetauscht wird (R30Q oder 113A). In einer Kopplungsanalyse bestehend aus 457 CED-Trios (erkranktes Kind plus Eltern) aus Deutschland wurde die R30Q-Variante signifikant häufiger übertragen (CED $p=0,004$; Morbus Crohn $p=0,04$). Diese Krankheitsassoziation konnte anschließend in einer Fallkontrollstudie mit 525 CED-Patienten bestätigt werden. 25,1% der CED-Patienten waren Mutationsträger während nur 17,1% der gesunden Kontrollen Träger der R30Q-Variante waren (CED $p=0,002$; Morbus Crohn $p=0,001$).

Ein weiterer, häufiger vorkommender Haplotyp, der als Haplotyp A bezeichnet wird, weist acht verschiedene SNP auf. Der kennzeichnende Polymorphismus ist *DLG5_e26*. Die Familienanalyse zeigte eine negative Assoziation zu CED und Morbus Crohn. Die Trägerhäufigkeit dieser Variante war in der darauffolgenden Fallkontrollstudie sowohl bei CED-Patienten wie auch bei Morbus Crohn-Patienten signifikant geringer als bei

gesunden Kontrollen (52,7% CED vs. 59,3% Kontrollen, $p=0,037$). Daraus schlussfolgerte man eine protektive Wirkung gegenüber der Entwicklung einer CED.

Ein zusätzlicher seltener Haplotyp, die p.P1371Q-Variante (rs2289310), bei dem ein Basenaustausch von Cytosin zu Adenin am Nukleotid 4136 stattfindet, kommt bei 2-3% der Normalbevölkerung vor. In der Fallkontrollstudie war die Genvariante mit Morbus Crohn assoziiert, nicht jedoch mit Colitis Ulcerosa ($p=0,01$).

In derselben Arbeit wurde anhand von Trios (erkranktes Kind und Eltern) festgestellt, dass die Weitergabe der 113A-Variante von Generation zu Generation signifikant häufiger bei Trägern einer *NOD2*-Mutation ist, verglichen mit Trägern des *NOD2*-Wildtyps. Es wird folglich angenommen werden, dass es Interaktionen zwischen den Risikovarianten im *DLG5*-Gen und denen im *NOD2*-Gen gibt.

2. Herleitung der Aufgabenstellung

Die epidemiologischen Daten chronisch entzündlicher Darmerkrankung legen eine starke genetische Beteiligung nahe, wobei das Vererbungsmuster nicht Mendelschen Gesetzen folgt. Vielmehr resultiert diese komplexe Erkrankung aus einer Interaktion multipler Gene und Umweltfaktoren. Im letzten Jahrzehnt wurden beträchtliche Fortschritte gemacht, was die genetische Entschlüsselung der Pathogenese dieser bisher nicht völlig verstandenen Erkrankung anbelangt.

2.1. Genetische Varianten bei CED und deren Folgen - Hypothesen

Mit dieser Arbeit testen wir die Hypothese, dass Varianten im *DLG5*-Gen mit dem Auftreten von CED assoziiert sind. Im Hinblick auf das Transkriptionsprodukt des *DLG5*-Gens, das eine Schlüsselrolle für die Zellintegrität spielt, gehen wir einen Schritt weiter und stellen eine weitere Hypothese auf: *DLG5* spielt eine Schlüsselrolle für die Intaktheit der gastrointestinalen Barrierefunktion und genetische Veränderungen im *DLG5*-Gen führen zu der bei CED-Patienten beschriebenen und noch ungeklärten gastrointestinalen Permeabilitätsstörung. Unsere Annahme ist, dass erst durch diese genetisch verursachte Barriestörung der Weg zu einer chronischen Inflammation gebahnt wird.

Weiterhin stellen wir die Hypothese, dass *DLG5*-Mutationen mit der Ausprägung bestimmter phänotypischer Merkmale assoziiert sind und dadurch den Krankheitsverlauf prägen. Dies wäre ein Erklärungsansatz für das heterogene Krankheitsbild, das CED-Patienten präsentieren.

In über der Hälfte der Morbus Crohn-Fälle konnte keine *NOD2*-Mutationen festgestellt werden. Die beschriebenen Interaktionen zwischen *DLG5*- und *NOD2*-Varianten, die zu einer Potenzierung der CED-Anfälligkeit führen, sollen in dieser Arbeit überprüft werden.

2.2. Arbeitsgliederung

Die Arbeit gliedert sich in 4 Teile:

- 1. Teil: Bestimmung der Häufigkeit von 6 verschiedenen Varianten im *DLG5*-Gen bei 232 Morbus Crohn-Patienten, 148 Colitis Ulcerosa-Patienten im Vergleich zur Häufigkeit bei 218 Kontrollen.
- 2. Teil: Vergleich der Häufigkeit der *DLG5*-Varianten bei Morbus Crohn-Patienten in Abhängigkeit des *NOD2*-Genotyps.
- 3. Teil: Detaillierte Phänotypisierung der Morbus Crohn- und Colitis Ulcerosa-Patienten anhand retrospektiver Datenrecherche. Vergleich der Häufigkeit der *DLG5*-Varianten mit verschiedenen phänotypischen Merkmalen.
- 4. Teil: Vergleich der gastrointestinalen Permeabilität bei Morbus Crohn-Patienten in Abhängigkeit des *DLG5*-Genotyps.

3. Material und Methoden

3.1. Studienteilnehmer

Die in diese Studie eingeschlossen CED-Patienten sind Bestandteil eines Kollektivs, welches ca. seit dem Jahr 1999 in der Medizinischen Klinik m. S. Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie am Campus Mitte der Charité kontinuierlich erweitert wird. Zum Zeitpunkt der DLG5-Genotypisierung bestand diese Kohorte aus 391 Patienten, die zu diesem Zeitpunkt eingeschlossen werden konnten und auf deren bereits isolierte DNA wir zum Zweck der DLG5-Genotypisierung freundlicherweise zurückgreifen konnten. Insgesamt nahmen daher 391 Patienten an der Studie teil, 232 Patienten mit der Diagnose Morbus Crohn, 148 Patienten mit der Diagnose Colitis Ulcerosa sowie 11 Patienten mit einer Colitis indeterminata. Die Eignung der Patienten wurde durch den behandelnden Arzt geprüft: allgemein anerkannte klinische, endoskopische, radiologische und histologische Diagnose-Kriterien mussten vorliegen. Als Kontrolle dienten 218 freiwillige Teilnehmer, die in keinem Verwandtschaftsverhältnis zu den Patienten standen. Jeder Teilnehmer wurde über die Studie informiert und gab eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

3.2. Ethik-Kommission

Die Studie „Genetische Untersuchung bei CED“ wurde am 07.11.2002 von der Ethikkommission der Charité Berlin genehmigt (EK-Vorgangsnummer: 1834/Si.258).

3.3. Phänotypisierung

Die Datenerhebung erfolgte retrospektiv über die Krankenakten der Patienten. Ein detaillierter Fragebogen wurde anhand der Aktenrecherche über jeden Patienten ausgefüllt.

Folgende Parameter wurden erhoben:

- Name, Geburtsdatum, Gewicht, Größe, Geschlecht, Krankheit (Morbus Crohn, C.Ulcerosa, C.indeterminata)
- Datum und Alter der Erstdiagnose, Datum und Alter der Erstsymptomatik, ethnische Zugehörigkeit, Rauchverhalten, jüdische Abstammung, Familienanamnese

- Lokalisation der Entzündung, eingesetzte diagnostische Mittel, Vorhandensein und Lokalisation von Fisteln oder Stenosen, Kolonkarzinom (Diagnosedatum, Lokalisation, Stadium, Therapie)
- Bisherige Anzahl der Schübe, Anzahl der Schübe pro Jahr
- Operationen (Ileozökalresektion, Nachresektion neoterminales Ileum, perityphlitischer Abzeß, Strikturplastik, Teilresektion, Anus praeter, Ileoanaler Pouch)
- Extraintestinale Manifestation (Augen, Gelenke, Haut, Osteoporose, Leber, Autoimmunerkrankung, Allergie, Laktoseintoleranz, Autoantikörper)
- Systemische Steroidtherapie: Ansprechbarkeit auf Steroide (steroidresponse, steroidabhängig*, steroidrefraktär**), Dosisangaben, Gesamtdosis pro Jahr
- Azathioprin-Therapie: Indikation (Steroidabhängigkeit, Steroidrefraktärität, Remissionserhaltung, postoperative Immunsuppression), Anzahl der Schübe vor, während und nach Azathioprin-Einsatz, Einsatzdatum und -dauer, Zeitpunkt der Remission, Nebenwirkungen
- Methotrexat-Therapie: Indikation, Anzahl der Schübe vor, während und nach MTX-Einsatz, Einsatzdatum und -dauer, Wirksamkeit, Zeitpunkt der Remission, Nebenwirkungen
- Infliximab-Therapie: Wirksamkeit, Indikation, Anzahl der Schübe vor Infliximab-Einsatz, Einsatzdatum und -dauer, Zeitpunkt der Remission, Dosisangaben
- Therapie mit oralem oder rektalem Budenosid, Therapie mit oralem oder rektalem 5-ASA, Therapie mit oralem Sulfasalazin mit jeweiliger Dosisangabe
- Antibiotika- und Probiotika-Therapie: Dauer, Dosis, Wirksamkeit

*Steroidabhängigkeit besteht bei einer Erhaltungsdosis von mind. 10 mg/Prednisolonäquivalent täglich und 2 gescheiterte Reduktionsversuche innerhalb von 6 Monaten.

**Steroidrefraktärität besteht bei einem durch hochdosierte Steroidtherapie (mind. 40 mg Prednisolonäquivalent täglich) über einen Zeitraum von mind. 6 Wochen nicht zu beherrschenden Schub.

3.4. Genotypisierung

Alle Studienteilnehmer wurden auf das Vorliegen von sechs Varianten im *DLG5*-Gen hin untersucht.

3.4.1. Technisches Material und Chemikalien

Technisches Material:

Analysenwaage (Sartorius)

Biofuge fresco Heraeus Instruments

Eppendorf Reference Pipetten

Mikrowelle

Power Supply (Biometra)

T3 Thermocycler (Biometra)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Vortex (Roth)

LightCycler (Roche)

Chemikalien:

QIAamp Blood Kit, Cat.Nr. 51104, (Qiagen)

QIAquick PCR Purification Kit, Cat.Nr. 28106 (Qiagen)

Ethanol (96 – 100%)

HPLC-H₂O

Primer

TBE-Puffer

AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems)

HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)

LightCycler Kapillaren (Roche)

3.4.2. DNA-Isolierung

Bei den eingeschlossenen Patienten wurde die DNA-Isolierung routinemäßig im Vorfeld wie folgt vorgenommen. Zur Gewinnung kernhaltiger Leukozyten wurde jedem Studienteilnehmer 25 ml venöses Blut entnommen. Zunächst wurde das Blut 10 Minuten bei 2800 U/Minute zentrifugiert. So entstehen drei getrennte Phasen: eine Plasma-Phase, eine erythrozytenreiche Phase und eine leukozytenreiche Phase, die sogenannte Leukozytenmanschette. Zur Isolierung der DNA wurde QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Es wurden 250 µg/µl kernhaltige Leukozyten aus der Leukozytenmanschette entnommen und mit 25 µl Protease und 250 µl Puffer AL versetzt, gevortext und 10 Minuten lang bei 56° inkubiert. Ziel ist es die Zellmembran und Zellkernmembran zu lysieren. Anschließend wurde nach kurzem Anzentrifugieren zur Fällung der DNA 250 µg/µl Ethanol zugegeben, auf dem Vortex gemischt und nochmals zentrifugiert. Die lysierten Leukozyten wurden auf eine Spinsäule pipettiert und 1 Minute bei 8500 U/Minute zentrifugiert, so dass die DNA an der Filtermatrix adsorbiert wird. Als Nächstes erfolgte die Waschung der DNA. 500 µl des Puffers AW1 wurden auf die Spinsäule gegeben und bei 8000 U/Minute 1 Minute lang zentrifugiert. Zur zweiten Waschung wurde die Spinsäule mit 500 µl des Puffers AW2 versetzt und 3 Minuten bei 13000 U/Minute zentrifugiert. Die letzte Waschung wurde mit 200 µl Elutionspuffer AE 1 Minute bei 8000 U/Minute durchgeführt, wobei die DNA in einem Reaktionsgefäß aufgefangen wurde.

3.4.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen und auf diese Weise nachweisbar zu machen. Die PCR zählt heute zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie. Sie wurde 1984 von Karry Mullis entwickelt, wofür er 1993 mit dem Nobelpreis geehrt wurde. Die PCR wird für eine Vielzahl verschiedener Aufgaben verwendet, neben dem Nachweis genetischer Veränderungen können z.B. Bakterien oder Viren nachgewiesen werden und in der Gerichtsmedizin können sogenannte genetische Fingerabdrücke erstellt und überprüft werden.

Ein PCR-Zyklus kann in 3 Arbeitsschritte unterteilt werden: die Denaturierung, die Hybridisierung (annealing) und die Amplifikation (elongation). In der

Denaturierungsphase wird die DNA auf 95° erhitzt und so in ihre zwei Einzelstränge geteilt. In der Annealingsphase bilden sich bei einer für den Primer optimale Temperatur Wasserstoffbrücken zwischen dem Primer und den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt. Ein Primer ist ein Oligonukleotid, dessen Sequenz komplementär zu dem Anfang (Vorwärtsprimer) oder dem Ende (Rückwärtsprimer) des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts ist und auf diese Weise den Startpunkt bzw. Endpunkt der DNA-Synthese markiert. Bei der Elongationsphase erfolgt von den Primern ausgehend bei 72° unter Zusatz von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) die Neusynthese zweier zu den DNA-Strängen komplementärer Sequenzen. Hierzu wurden früher natürliche DNA-Polymerasen des *Escherichia coli* Bakteriums verwendet, während heutzutage ein hitzestabiles Enzym des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verwendet wird. Dadurch können mehrere PCR-Zyklen hintereinander ohne Unterbrechung erfolgen, da die Taq-Polymerase während der Denaturierung bei 95° nicht beschädigt wird. Nach der Elongationsphase liegt erneut doppelsträngige DNA vor und ein neuer PCR-Zyklus kann beginnen. Dabei vervielfältigt sich die Zahl der DNA-Stränge exponentiell, da jeder neusynthetisierter DNA-Abschnitt im nächsten Zyklus als Matrize dient. Die PCR wird in einem programmierbaren Temperaturwechselgerät (Thermocycler) durchgeführt.

3.4.4. DLG5-Varianten

Zur Amplifikation der DNA-Abschnitte, die die 6 SNPs des *DLG5*-Gens enthalten, wurden folgende Primer verwendet (Tabelle 1).

Ein PCR Reaktionsansatz enthielt 0,75 U AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Braunschweig), 400 µM dNTPs und 0,1 µM von jedem Primer in einem Gesamtvolumen von 25 µL. Die PCR wurde in einem Biometra T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die initiale Denaturierung erfolgte 12 Minuten lang bei 95°C. Die folgenden 40 Zyklen wurden mit einer Denaturierung von jeweils 20 Sekunden bei 95°C, einem Annealing von 40 Sekunden bei 60°C und einer Elongation von 90 Sekunden bei 72°C durchgeführt. Die letzte Elongation erfolgte 2 Minuten bei 72°C.

Tabelle 1: Primer der *DLG5*-Genotypisierung

| Variante | Lokalisation | Vorwärtsprimer | Rückwärtsprimer |
|------------------------------|-----------------|--|--------------------------------------|
| p.R30Q | Exon2 | 5'-GGG CGC CTC GTG AAT GCC AG-3' | 5'-GGG TGA CAG CAC CAG CAT CG-3' |
| rs2289308 und p.G1066G | Intron16/Exon17 | 5'-AGG AGC CAC AGC CAC ATT GTG-3' | 5'-AAG CTT CTC CAC CAA TGA GCC-3' |
| p.P1371Q | Exon 23 | 5'-GCT CAG ATC TAG TTG CCA CAG G-3' | 5'-TGA GGC CAG CTG CCC AGT GC-3' |
| p.D1507D und DLG5_e26 | Exon26/Intron26 | 5'-GCC AGA GCC GCC TGA TCG TG-3' | 5'-CCC ATG GGA CAG CTC CAT GG-3' |

3.4.5. Reinigung des PCR-Produktes

Nach der PCR müssen die neusynthetisierten DNA-Sequenzen vor der weiteren Bearbeitung von allen Störfaktoren z.B. restliche dNTPs und Primern gereinigt werden. Dazu wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Nach Zugabe eines Puffers wurde die DNA an eine Silikonmembran adsorbiert. In weiteren Schritten erfolgte die Zugabe von Puffern und durch anschließendes Zentrifugieren wurden alle unerwünschten Bestandteile herausgewaschen. Schließlich wurde die DNA aus der Silikonmembran durch Zugabe eines Elutionspuffers und kurzer Inkubation gelöst und in ein Auffanggefäß zentrifugiert.

3.4.6. Schmelzkurvenanalyse von *DLG5*

Zur *DLG5*-Mutationsanalyse des PCR-Produkts führten wir eine Schmelzkurvenanalyse mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Sonden durch. Auf diese Weise kann mit hoher Spezifität die gesuchte Variante identifiziert werden und es gelingt die Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Trägern.

Hybridisierungssonden bestehen aus einem Oligonukleotid, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die Donor-Sonde hybridisiert an die Zielsequenz

während die Akzeptor-Sonde in unmittelbarer Nähe hybridisiert. Das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers besteht darin, dass der Donor nach Anregung durch eine Lichtquelle Energie an den benachbarten Akzeptor abgibt, so dass dieser Licht ausstrahlt. Bei einer räumlichen Trennung von Donor und Akzeptor kann dieser Energietransfer nicht mehr stattfinden und der Donor strahlt direkt Licht ab. Die Schmelzkurve beschreibt die Bindung der Donor-Sonde, die bindungsschwächer ist als die der Akzeptor-Sonde. Die hybridisierten Produkte werden langsam unter stetiger Messung der Fluoreszenz erhitzt. An einem für die gesuchte Sequenz spezifischen Schmelzpunkt löst sich der Donor. Der Abstand zum Akzeptor nimmt zu, so dass kein Energietransfer mehr stattfinden kann. Ist der Schmelzpunkt erreicht, so nimmt also das gemessene Fluoreszenzsignal zu. Eine homozygote Probe weist einen Schmelzpunkt auf, während eine heterozygote Probe durch zwei Schmelzpunkte charakterisiert ist. Eine Veränderung der gesuchten Sequenz führt zu einer Schmelzpunkterniedrigung.

Die in unsere Studie verwendeten Hybridisierungssonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL Berlin hergestellt. Folgende Sonden wurden verwendet.

Tabelle 2: DLG5-Hybridisierungssonden der Schmelzkurvenanalyse

| Variante | Donor-Sonde | Akzeptor-Sonde |
|-----------|--|---|
| p.R30Q | 5'-GCG CCG TCC CCA CCA CCC CTC C-FL | 5'-LC Red640-CAC TGA CCA GCA AGT GAA TGA G-ph |
| rs2289308 | 5'-TGG TGA GAA AAG ACA CCC CAA-FL | 5'-LC Red705-GAC CCA GCC AGC CCA GGA CTT AC-ph |
| p.G1066G | 5'-CAT TTC TAG GCA CTG TTC CCC G-FL | 5'-LC Red640-AGT TTG ACC CCC AGC ACC ACT GTG-ph |
| p.P1371Q | 5'-CCT AGC ACC CCC CAA GCC AA- FL | 5'-LC Red705-CAG AGC AGC TCC AGG TCA GCA GAC G-ph |
| p.D1507D | 5'-CCA CGT AGA GGA TGT CAT CCT TVT-FL | 5'-LC Red705-AGC TCA ACT CTT GCT CCA CAT CTG CC-ph |
| DLG5_e26 | 5'-TCG GCG ACC CCGCC CC-FL | 5'-LC Red640-CCC CAC CCC AGG CCC GGA GAA C-ph |

Es wurde 4µl PCR-Produkt und 2 µl Sondenmix (Donor- und Akzeptor-Sonde) in LightCycler-Kapillaren gegeben und 20 Sekunden bei 2000 U/Minute zentrifugiert. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte im LightCycler (Roche Diagnostics, Deutschland).

3.4.7. *NOD2*-Varianten

Wie unter 3.1. (Studienteilnehmer) erwähnt, handelt es sich bei den hier eingeschlossenen Patienten um ein bereits bestehendes Kollektiv. Bei diesen Patienten wurde zum Zwecke anderer Forschungsarbeiten routinemäßig eine *NOD2*-Genotypisierung durchgeführt, auf deren Ergebnisse wir im Rahmen dieser Dissertation zur Korrelation mit den Daten der *DLG5*-Genotypisierung ebenfalls freundlicherweise zurückgreifen konnten. Der Vollständigkeit halber ist an dieser Stelle noch einmal die verwendete Methodik erwähnt.

Die Analyse auf das Vorliegen der drei SNP im *NOD2*-Gen wurde anhand Real-time quantitative PCR und TaqMan-Sonden durchgeführt. Bei der Real-time quantitativen PCR wird die herkömmliche PCR mit der gleichzeitigen Quantifizierung der gewonnenen DNA mittels Fluoreszenzmessung kombiniert. Auch hier macht man sich das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zunutze. Bei TaqMan-Sonden sind allerdings beide Fluorochrome, der sogenannte Reporter und der Quencher, auf einem Oligonukleotid verankert. TaqMan-Sonden lagern sich während der Hybridisierungsphase der PCR an die komplementären DNA-Einzelstränge. Solange Reporter und Quencher auf dem intakten Oligonukleotid hybridisiert sind, wird die Lichtemission des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Erst in der Elongationsphase, wenn die Taq-Polymerase aufgrund ihrer Nukleaseaktivität das 5'-Ende der Sonde hydrolisiert und somit den Reporter abbaut, strahlt dieser Licht ab. Die Fluoreszenz des Reporters wird nun nicht mehr durch den Quencher gelöscht und wird am Ende der Elongation nach jedem Zyklus gemessen. Die Stärke des Lichtsignals wird photometrisch gemessen – sie ist proportional zur Menge abgebauter TaqMan-Sonden und damit auch zur Zahl der synthetisierten DNA-Abschnitte. In den nachfolgenden Tabellen sind die verwendeten Primer und die verwendeten TaqMan-Sonden aufgeführt.

Tabelle 3: Primer der *NOD2*-Genotypisierung

| Variante | Vorwärtsprimer | Rückwärtsprimer | Annealing |
|-----------|---|--|-----------|
| Arg702Trp | 5'-TTC CTG GCA GGG CTG TTG TC-3' | 5'-GTG GAA GTG CTT GCG GAG G-3' | 64,5° |
| Gly908Arg | 5'-ACT CAC TGA CAC TGT CTG TTG ACT CT-3' | 5'-AGC CAC CTC AAG CTC TGG TG-3' | 64,5° |
| 3020insC | 5'-GTC CAA TAA CTG CAT CAC CTA CCT AG-3' | 5'-CTT ACC AGA CTT CCA GGA TGG TGT-3' | 62,5° |

Tabelle 4: TaqMan-Sonden der *NOD2* Real-time PCR

| Variante | Wildtypspezifische Sonde | Mutationsspezifische Sonde |
|-----------|---|--|
| Arg702Trp | FAM-CCT GCT CCG GCG CCA GGC- TAMRA | TET-CCT GCT CTG GCG CCA GGC C- TAMRA |
| Gly908Arg | FAM-TT TTC AGA TTC TGG GGC AAC AGA GTG GGT-TAMRA | TET-TTC AGA TTC TGG CGC AAC AGA GTG GGT-TAMRA |
| 3020insC | FAM-C CCT CCT GCA GGC CCT TGA AAT-TAMRA | TET-CCT CCT GCA GGC CCC TTG AAA-TAMRA |

Jeder Reaktionsansatz enthielt 25 µl IQ Supermix (BioRad, München, Germany), 0,6 µl von jedem Primer (100 µM), 0,1 µl DNA und 20,6 µl H₂O. Die Fluoreszenz wurde über 40 PCR-Zyklen gemessen, und die Allelbestimmung erfolgte mit dem IQ Real-Time PCR Detection System.

3.5. Gastrointestinale Permeabilität

Zur Messung der gastrointestinalen Permeabilität macht man sich die physiologischerweise nur geringe Resorptions- und Metabolisierungsrate bestimmter oral applizierter Zucker als Testsubstanz zunutze. Durch Bestimmung der renalen Ausscheidungsrate solcher inerter Zucker können Rückschlüsse auf die Barrierefunktion des Gastrointestinaltraktes gezogen werden. Eine erhöhte gastroduodenale und/oder intestinale Permeabilität zeigt sich folglich in der erhöhten Ausscheidung der jeweiligen Testsubstanz im Urin. Als Testsubstanz eignet sich einer Kombination aus Saccharose, Laktulose und Mannit. Dabei dient die Saccharose als Marker für die gastroduodenale Permeabilität während der Quotient aus Laktulose und Mannit als Marker für die intestinale Permeabilität dient (dimensionsloser Normwert ist $< 0,03$). Durch den intestinalen Permeabilitätsindex wird die intestinale Oberfläche (Mannitol) berücksichtigt wie auch die Dichtigkeit der epithelialen tight junctions (Laktulose). Da die Resorptionsfläche bei intakter Permeabilität reduziert sein kann, muss bei einem gesteigerten Permeabilitätsindex gleichzeitig die Laktuloseausscheidung erhöht sein, um als erhöhte intestinale Permeabilität gewertet zu werden.

Tabelle 5: Testsubstanzen des gastrointestinalen Permeabilitätstests

| Parameter | Applikationsmenge | Permeabilitätsmarker | Normbereich | |
|------------|-------------------|---|-------------|-----------------|
| Saccharose | 20 g | Gastroduodenale Permeabilität | <0,23 % | |
| Laktulose | 10 g | Intestinale Permeabilität (Dichtigkeit) | <0,44 % | Quotient < 0,03 |
| Mannit | 5 g | Intestinale Permeabilität (funktionelle Darmoberfläche) | <27,8 % | |

Normbereich in Prozent der appliziertem Menge bzw. Quotient als dimensionsloser Wert

3.5.1. Testdurchführung

Die Bestimmung der gastrointestinalen Permeabilität erfolgte durch das endokrinologische Stoffwechsellabor unserer Klinik unter der Leitung von Frau Dr. Sabine Bühner zu wissenschaftlichen Zwecken. Die Daten der Permeabilität wurden bereits veröffentlicht (Bühner et al. 2006). Freundlicherweise war es uns gestattet, die Daten zur Korrelation mit dem *DLG5*-Gen zu nutzen.

Es wurde bei insgesamt 105 Morbus Crohn-Patienten, die sich zum Testzeitpunkt in Remission befanden ($CDAI < 150$), einen Permeabilitätstest durchgeführt. Zunächst wurde von den Studienteilnehmern nach 12 stündiger Nahrungskarenz und 48 stündiger Alkoholkarenz eine Morgenurinprobe zum Ausschluss von Markerzucker im Urin vor Testbeginn gewonnen. Anschließend waren die Teilnehmer nach vollständiger Blasenentleerung aufgefordert, die Testlösung bestehend aus 20 g Saccharose, 10 g Laktulose und 5 g Mannit, gelöst in 100 ml Wasser, zügig zu trinken. Der ab diesem Zeitpunkt angefallene Urin wurde in den folgenden 5 Stunden in einem mit Natriumacid als Konservierungsmittel versetztem Gefäß gesammelt. Erst nach 2 Stunden war das Trinken von Wasser erlaubt, Nahrungsaufnahme war während der gesamten Urinsammelzeit nicht gestattet. Aus dem 5h-Sammelurin wie auch aus der Urinprobe vor Testbeginn wurden 10 ml entnommen und bei -20°C gelagert. Im Labor angekommen wurden aus beiden Proben jeweils 500 μl des aufgetauten Urins entnommen und mit 50 μl internen Standards aus 2 Zuckern (Meso-Erythrit und Turanose) als Kaliberlösung gemischt. Zur Eiweißfällung erfolgte die Zugabe von 50 μl 20 %iger Sulfosalicylsäure (SSA) und zur Entsalzung die Zugabe einer Spatelspitze des Ionenaustauschers Amberlite MB-3. Nach anschließendem Zentrifugieren waren die Proben für die Analyse bereit.

Zur Analyse erfolgte zunächst eine Auftrennung des Stoffgemisches mittels HPLC (high performance liquid chromatography; HPLC-System Dionex, Idstein, Germany). Zuvor wurde die Analyseeinheit mit 4 Standardlösungen der zu analysierenden Zucker Saccharose, Lactulose und Mannitol extern kalibriert. Anschließend wurden die Einzelstoffe elektrochemisch durch gepulste Amperometrie, eine Form der Gleichspannungs-Amperometrie, detektiert und quantitativ bestimmt. Die Werte werden in Prozent der in der Testlösung befindlichen Menge angegeben. Eventuell bereits vor Testdurchführung im Urin vorhandene Zucker werden bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt.

3.6. Statistische Verfahren

3.6.1. Chi-Quadrat-Test

Mithilfe von Chi-Quadrat-Tests werden Merkmale anhand von beobachteten Häufigkeiten ihrer Merkmalsausprägungen analysiert, um dabei eine mögliche Assoziation zu prüfen. Voraussetzung ist eine ausreichend große Teilnehmerzahl, so dass die erwartete Häufigkeit nicht kleiner als 5 ist. Die Berechnung erfolgt anhand einer Kreuztabelle, in der die jeweiligen Merkmale anhand Ihrer Merkmalsausprägungen gegenüber gestellt werden. Das Prinzip dieses Tests ist, die beobachteten Häufigkeiten in jeder Zelle mit den bei Unabhängigkeit erwarteten Häufigkeiten zu vergleichen. Je grösser die Differenzen sind, desto mehr spricht dies für eine Abhängigkeit zwischen den Merkmalen. Mit dem Chi-Quadrat-Test lässt sich untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen besteht, jedoch nicht wie stark der Zusammenhang zwischen diesen ist.

Da unser Stichprobenumfang ausreichend groß ist, wird eine Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% angestrebt (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Unsere Daten lassen sich als Realisierung von Zufallsvariablen auffassen. Bei der sogenannten Chi-Quadrat-Verteilung auf Unabhängigkeit werden Transformationen von normalverteilten Zufallsvariablen betrachtet, die selbst nicht normalverteilt waren. Angegeben werden die Wahrscheinlichkeiten für die Realisationen unserer diskreten Zufallsvariablen innerhalb festgelegter Grenzen. Konnte mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit erster Art von $\alpha = 0,05$ die Unabhängigkeitshypothese verworfen werden, so bedeutet dies einen signifikanten Unterschied zwischen den beobachteten Gruppen.

Mit diesem Verfahren wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen *DLG5*-Varianten und den unterschiedlichen Erscheinungsformen CED vorliegt.

3.6.2. Exakter Test nach Fisher

Der exakte Test nach Fisher ist eine Abwandlung des Chi-Quadrat-Tests. Er kommt zum Einsatz, wenn eine Vierfeldertafel vorliegt und die erwartete Häufigkeit kleiner als 5 ist, also bei kleinen Stichprobenumfängen. Unter der Annahme einer Nullhypothese H_0 kann durch die Berechnung des p-Wertes nach Fisher die Wahrscheinlichkeit für eine beobachtete Verteilung und extremere Verteilungen bestimmt werden. Falls die gefundene Wahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 ist, lässt sich die Nullhypothese H_0 auf

dem 5%-Niveau ablehnen. Grundlage für die Berechnungen ist eine Vierfeldertafel mit kleinen Besetzungszahlen. Man geht vom Feld mit dem kleinsten Produkt der Diagonalen und dem am schwächsten besetzten Feld aus und stellt unter Beibehaltung der gleichen Randsummen alle Vierfeldertafeln auf, die in dem betreffenden Feld noch schwächer besetzt sind. Man nimmt die Randsummen als gegeben hin und fragt nach der Wahrscheinlichkeit dafür, dass die beobachtete Besetzung oder eine noch weniger wahrscheinliche rein zufällig zustande kommt. Es ergibt sich die Wahrscheinlichkeit p als eine Summe von Gliedern dieser Verteilung. Unter der Voraussetzung, dass die Randsummenpaare fest vorgegeben sind, ist die berechnete Wahrscheinlichkeit die exakte Lösung. Im Ergebnis kann die Nullhypothese abgelehnt werden, wenn die erhaltenen p -Werte $<0,05$ sind, da dies als statistisch signifikant betrachtet wird.

Anhand des exakten Tests nach Fisher prüften wir das Vorliegen signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen *DLG5*-Varianten und dem Auftreten von Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa. Des Weiteren wurde er beim Genotyp-Phänotyp-Vergleich und beim Vergleich der gastrointestinalen Permeabilität unter unterschiedlichen genotypischen Gruppen angewandt.

4. Ergebnisse

4.1. Phänotyp der CED-Patienten

Anhand intensiver, retrospektiver Aktenrecherche konnten von den insgesamt 391 genotypisierten CED-Patienten die klinischen und demographischen Daten von 366 CED-Patienten ermittelt werden. So war es möglich über nahezu jeden Patienten ein detailliertes, phänotypisches Bild zu erstellen. Es handelt sich um 227 Morbus Crohn-Patienten und 139 Colitis Ulcerosa-Patienten. Alle Patienten sind kaukasischen Ursprungs.

4.1.1. Phänotyp der Morbus Crohn-Patienten

Zur phänotypischen Analyse standen 227 Morbus Crohn-Patienten zur Verfügung. Unter dem Patientenkollektiv zeigte sich wie erwartet eine Prädominanz für das weibliche Geschlecht – 3/5 der Morbus Crohn-Patienten waren Frauen und 2/5 Männer. Der Altersdurchschnitt bei Krankheitsausbruch lag bei 30 Jahren. Bei insgesamt 42 % der Patienten war im Verlauf der Erkrankung ein chirurgisches Vorgehen im Sinne einer Darmresektion erforderlich. In der Fall-Kontroll-Studie von Stoll aus dem Jahre 2004, in der *DLG5* erstmalig als Crohn-Suszeptibilitätsgene deklariert wurde, bestand das Patientenkollektiv aus 538 Morbus Crohn-Patienten.

Die nachfolgende Tabelle beschreibt die Häufigkeitsverteilung demographischer und klinischer Merkmale bei Morbus Crohn-Patienten (n=227) als Absolutzahl (Prozentzahl). Die Anzahl der Morbus Crohn Patienten für das jeweilige phänotypische Merkmal weicht von der Gesamtzahl der Morbus Crohn Patienten ab, da nicht jedes Merkmal bei jedem Patienten retrospektiv reproduzierbar war. Ein chronischer Verlauf wurde definiert als Einnahme von Prednisolon für mindestens ein Jahr durchgehend oder beim Einsatz von Infliximab (bzw. Ciclosporin bei der Colitis Ulcerosa) oder bei Proktokolektomie.

Tabelle 6: Häufigkeit demographischer und klinischer Merkmale bei 227 Morbus Crohn-Patienten

| | |
|--|--------------------|
| Geschlecht (männlich:weiblich) | 87:140 (38,3:61,7) |
| Alter bei Erstdiagnose (Durchschnitt+/- Standardabweichung) | 30,3 +/- 10,99 |
| Erkrankungsdauer (in Jahren; Durchschnitt +/- Standardabweichung) | 10,1 +/- 8 |
| Positive CED Familienanamnese | 22 (11,6) |
| Rauchgewohnheiten | |
| Raucher | 81 (41,3) |
| Ex-Raucher | 7 (3,5) |
| Lokalisation | |
| Oberer GI-Trakt | 56 (25,9) |
| Jejunum/oberes Ileum | 50 (24,5) |
| Terminales Ileum | 179 (85,6) |
| Dickdarm | 182 (84,3) |
| Perianal | 70 (32,4) |
| Extraintestinale Manifestation | |
| periphere Arthralgien | 96 (44) |
| sakroiliakale Arthralgien | 31 (14,2) |
| Augenmanifestation | 22 (10,1) |
| Hautmanifestation | 18 (8,3) |
| Fisteln | 101 (46,3) |
| Stenosen | 143 (65,6) |
| Chronischer Verlauf | 66 (31,6) |
| Operationen | |
| Dünndarmresektion | 22 (10,1) |
| Ileozökalresektion | 73 (33,6) |
| Dickdarmresektion | 40 (18,3) |
| Nachresektion | 27 (12,4) |
| Fistel-OP | 59 (27,3) |

Häufigkeitsverteilung demographischer und klinischer Merkmale bei Morbus Crohn-Patienten (n=227) in Absolutzahl (Prozentzahl). Die Prozentzahl bezieht sich auf die Gesamtheit der MC-Patienten für das jeweilige phänotypische Merkmal.

4.1.2 Phänotyp der Colitis Ulcerosa-Patienten

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Häufigkeitsverteilung demographischer und klinischer Merkmale bei Colitis Ulcerosa-Patienten (n=139) in Absolutzahl (Prozentzahl).

Tabelle 7: Häufigkeit demographischer und klinischer Merkmale bei 139 Colitis Ulcerosa-Patienten

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| Geschlecht (männlich:weiblich) | 64:75 (46:54) |
| Alter bei Erstdiagnose | 35,13 +/- 13,95 |
| Erkrankungsdauer | 10,87 +/- 10,65 |
| Positive CED Familienanamnese | 5 (7,2) |
| Rauchgewohnheiten | |
| Raucher | 15 (19,2) |
| Ex-Raucher | 12 (15,6) |
| Lokalisation | |
| Proktitis | 8 (5,4) |
| Linksseitencolitis | 54 (36,5) |
| Pancolitis | 59 (39,3) |
| Pancolitis + Backwashileitis | 13 (8,8) |
| Extraintestinale Manifestation | |
| periphere Arthralgien | 63 (45,3) |
| sakroiliakale Arthralgien | 22 (15,9) |
| Augenmanifestation | 11 (7,9) |
| Hautmanifestation | 9 (6,5) |
| Primär sklerosierende Cholangitis | 13 (8,8) |
| Colon-Ca | 3 (2,2) |
| Chronischer Verlauf | 38 (28,1) |
| Steroidansprechen | |
| Ansprechen | 68 (60,2) |
| Abhängig | 21 (18,6) |
| Refraktär | 24 (21,2) |
| Operationen | |
| keine Operation | 126 (94,7) |
| Colektomie | 2 (1,5) |
| Colonteilresektion | 4 (3) |
| Appendektomie | 1 (0,8) |

Häufigkeitsverteilung demographischer und klinischer Merkmale bei Colitis Ulcerosa-Patienten (n=139) in Absolutzahl (Prozentzahl). Die Prozentzahl bezieht sich auf die Gesamtheit der CU-Patienten für das jeweilige phänotypische Merkmal.

4.2. Häufigkeitsverteilung der *DLG5*-Varianten und deren Assoziation zu CED

Alle 391 Patienten wurden auf das Vorliegen der sechs wichtigsten *DLG5*-Varianten hin genotypisiert. Wir verglichen die Mutationshäufigkeit bei den Patienten mit der Häufigkeit bei den gesunden Kontrollen. Als Kontrolle dienten 218 freiwillige Teilnehmer, die in keinem Verwandtschaftsverhältnis zu den CED-Patienten standen.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Häufigkeitsverteilung von Mutationen der sechs *DLG5*-Varianten (Tabelle 8). Wir verglichen die Trägerzahl von mindestens einem mutierten Allel in Absolutzahl (Prozentzahl) bei CED-Patienten (n=391) mit der Trägerzahl bei den Kontrollen (Exakter Fisher-Test). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der *DLG5*-Mutationshäufigkeiten zwischen Patienten und Kontrollen.

Im nächsten Schritt prüften wir einen Zusammenhang zwischen *DLG5*-Polymorphismen und CED unter Berücksichtigung des Erkrankungstyps, d.h. nach Aufteilung der Patienten in Morbus Crohn- und Colitis Ulcerosa-Patienten (Tabelle 9). Wir verglichen die Häufigkeitsverteilung der Varianten innerhalb des jeweiligen Patientenkollektivs mit der Häufigkeitsverteilung unter den gesunden Kontrollen. Dabei fiel eine signifikante Häufigkeit der rs2289308-Variante bei Colitis Ulcerosa-Patienten im Vergleich zur Häufigkeit bei den Kontrollen auf. 65,5% der Colitis Ulcerosa-Patienten trugen mindestens ein mutiertes Allel in der genannten Variante, während nur 54,1% der Kontrolle Träger eines mutierten Allels waren (p=0,031). Bezüglich der anderen fünf *DLG5*-Varianten konnte kein Zusammenhang zu Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa festgestellt werden. Die *DLG5_e26-* und p.D1507D-Variante waren identisch. Wir gehen davon aus, dass die Weitergabe dieser zwei Varianten von Generation zu Generation gekoppelt stattfindet, d.h. dass ein sogenanntes Kopplungsungleichgewicht zwischen diesen Variante besteht.

Tabelle 8: Häufigkeit der *DLG5*-Varianten bei CED

| Varianten | CED | Kontrollen | P-Wert | OR | 95%-CI |
|------------------|-------------|-------------|--------|------|--------------|
| p.R30Q | | | | | |
| Homozygot | 0 (0%) | 3 (1,4%) | 0,297 | 0,78 | [0,49;1,22] |
| Heterozygot | 57 (14,6%) | 36(16,6%) | | | |
| Wildtyp | 334 (85,4%) | 178 (82%) | | | |
| p.P1371Q | | | | | |
| Homozygot | 0 (0%) | 0(0%) | 0,643 | 0,86 | [0,47;1,59] |
| Heterozygot | 30 (7,7%) | 19 (8,8%) | | | |
| Wildtyp | 361 (92,3%) | 198 (91,2%) | | | |
| p.G1066G | | | | | |
| Homozygot | 24 (6,1%) | 17 (7,8%) | 0,498 | 0,89 | [0,64;1,24] |
| Heterozygot | 152 (38,9%) | 87 (40,1%) | | | |
| Wildtyp | 215 (55%) | 113 (52,1%) | | | |
| rs2289308 | | | | | |
| Homozygot | 56 (14,3%) | 27 (12,4%) | 0,086 | 1,35 | [0,96;1,89] |
| Heterozygot | 185 (47,3%) | 91 (41,9%) | | | |
| Wildtyp | 150 (38,4%) | 99 (45,6%) | | | |
| DLG5_e26 | | | | | |
| Homozygot | 57 (14,6%) | 27 (12,4%) | 0,123 | 1,31 | [0,93;1,83] |
| Heterozygot | 182 (46,5%) | 91 (41,9%) | | | |
| Wildtyp | 152 (38,9%) | 99 (45,6%) | | | |
| p.D1507D | | | | | |
| Homozygot | 57 (14,6%) | 27 (12,4%) | 0,123 | 1,31 | [0,93;1,83] |
| Heterozygot | 182 (46,5%) | 91 (41,9%) | | | |
| Wildtyp | 152 (38,9%) | 99 (45,6%) | | | |

Häufigkeitsverteilung der sechs *DLG5*-Varianten und Genotyp. Vergleich der Trägerzahl von mind. einem mutierten Allel bei CED-Patienten (n=391) mit Kontrollen (n=218) (Exakter Fisher-Test). Errechnung des relativen CED-Risikos (OR=Odds ratio) und des 95%-Konfidenzintervalls (CI).

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung der *DLG5*-Varianten bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa

| | Morbus Crohn | P- Wert | OR | Colitis Ulcerosa | P- Wert | OR | Kontrollen |
|------------------|---------------------|----------------|-----------|-------------------------|----------------|-------------|-------------------|
| p.R30Q | | | | | | | |
| Homozygot | 0 (0%) | | | 0 (0%) | | | 3 (1,4%) |
| Heterozygot | 31 (13,4%) | 0,195 | 0,71 | 24 (16,2%) | 0,778 | 0,89 | 36 (16,5%) |
| Wildtyp | 201 (86,6%) | | | 124 (83,8%) | | | 179 (82,1%) |
| p.P1371Q | | | | | | | |
| Homozygot | 0 (0%) | | | 0 (0%) | | | 0 (0%) |
| Heterozygot | 14 (6%) | 0,285 | 0,67 | 16 (10,8%) | 0,588 | 1,27 | 19 (8,7%) |
| Wildtyp | 218 (94%) | | | 132 (89,2%) | | | 199 (91,3%) |
| p.G1066G | | | | | | | |
| Homozygot | 19 (8,2%) | | | 5 (3,4%) | | | 17 (7,8%) |
| Heterozygot | 88 (37,9%) | 0,706 | 0,92 | 57 (38,5%) | 0,242 | 0,78 | 88 (40,4%) |
| Wildtyp | 125 (53,9%) | | | 86 (58,1%) | | | 113 (51,8%) |
| rs2289308 | | | | | | | |
| Homozygot | 34 (14,7%) | | | 22 (14,9%) | | | 27 (12,4%) |
| Heterozygot | 106 (45,7%) | 0,215 | 1,29 | 75 (50,7%) | 0,031 | 1,60 | 91 (41,7%) |
| Wildtyp | 92 (39,7%) | | | 51 (34,5%) | | | 100 (45,9%) |
| DLG5_e26 | | | | | | | |
| Homozygot | 34 (14,7%) | | | 23 (15,5%) | | | 27 (12,4%) |
| Heterozygot | 105 (45,3%) | 0,255 | 1,24 | 73 (49,3%) | 0,052 | 1,55 | 91 (41,7%) |
| Wildtyp | 93 (40,1%) | | | 52 (35,1%) | | | 100 (45,9%) |
| p.D1507D | | | | | | | |
| Homozygot | 34 (14,7%) | | | 23 (15,5%) | | | 27 (12,4%) |
| Heterozygot | 105 (45,3%) | 0,255 | 1,24 | 73 (49,3%) | 0,052 | 1,55 | 91 (41,7%) |
| Wildtyp | 93 (40,1%) | | | 52 (35,1%) | | | 100 (45,9%) |

Häufigkeitsverteilung der sechs *DLG5*-Mutationen und Genotyp. Vergleich der Trägerzahl von mind. einem mutierten Allel bei Morbus Crohn-Patienten (n=232) und Colitis Ulcerosa-Patienten (n=148) mit Kontrollen (n=218) (Exakter Fisher-Test). Errechnung des relativen Morbus Crohn- bzw. C. Ulcerosa-Risikos bei Vorliegen von mind. einem mutierten Allel (OR=Odds ratio).

4.3. *DLG5*-Varianten bei Trägern von *NOD2*-Mutationen

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa werden als komplexe genetische Erkrankungen verstanden. Die drei *NOD2*-Varianten sind nachweislich mit Morbus Crohn assoziiert. Um eine genetische Interaktion zwischen *NOD2*- und *DLG5*-Varianten zu prüfen, untersuchten wir die Häufigkeit von Sequenzvarianten im *DLG5*-Gen hinsichtlich ihres *NOD2*-Status bei Morbus Crohn-Patienten. Als *NOD2*-Risiko-Genotyp definierten wir das Vorliegen von mindestens einem mutierten Allel bei mindestens einer der drei Varianten: Arg702Trp, Gly908Arg, 3020insC.

Wir konnten unter den Morbus Crohn-Patienten, die Träger einer *NOD2*-Mutation sind, keine signifikant erhöhte Mutationsrate für eine der sechs *DLG5*-Varianten feststellen. Insgesamt haben zwar 96,8% der Morbus Crohn-Patienten mit einem positiven *NOD2*-Risiko-Genotyp eine *DLG5*-Mutation, aber auch 91,4% der Morbus Crohn-Patienten ohne *NOD2*-Risiko-Genotyp sind Träger einer *DLG5*-Mutation ($p=0,171$).

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der *DLG5*-Varianten eingeteilt nach *NOD2*-Status

| | NOD2 + | NOD2 - | P-Wert |
|------------------|---------------|---------------|---------------|
| p.R30Q | | | |
| Risiko Allel + | 12 (12,9%) | 19 (13,7%) | |
| Risiko Allel - | 81 (87,1%) | 120 (86,3%) | 1 |
| p.P1371Q | | | |
| Risiko Allel + | 7 (7,5%) | 7 (5%) | |
| Risiko Allel - | 86 (92,5%) | 132 (95%) | 0,575 |
| p.G1066G | | | |
| Risiko Allel + | 48 (51,6%) | 59 (42,4%) | |
| Risiko Allel - | 45 (48,4%) | 80 (57,6%) | 0,181 |
| rs2289308 | | | |
| Risiko Allel + | 60 (64,5%) | 80 (57,6%) | |
| Risiko Allel - | 33 (35,5%) | 59 (42,4%) | 0,338 |
| DLG5_e26 | | | |
| Risiko Allel + | 58 (62,4%) | 80 (57,6%) | |
| Risiko Allel - | 35 (37,6%) | 59 (42,4%) | 0,497 |
| p.D1507D | | | |
| Risiko Allel + | 58 (62,4%) | 80 (57,6%) | |
| Risiko Allel - | 35 (37,6%) | 59 (42,4%) | 0,497 |

Häufigkeitsverteilung von *DLG5*-Varianten (mind. ein mutiertes Allel) bei Träger von mind. einem mutiertem Allel der drei *NOD2*-Variante (Arg702Trp, Gly908Arg, 3020insC) in Absolutzahl (Prozentzahl bezieht sich auf die jeweilige Gesamtheit der Personengruppe mit bzw. ohne *NOD2*-Mutation) bei Morbus Crohn-Patienten (n=232). P-Werte ermittelt durch Exakter Fisher-Test.

4.4. Assoziation des *DLG5*-Genotyps zum Phänotyp

Im nächsten Schritt verglichen wir die Häufigkeit von klinischen Merkmalen mit der Häufigkeit von Varianten für jede der möglichen sechs *DLG5*-Sequenzvarianten. Unser Ziel ist, eine mögliche Assoziation zwischen *DLG5*-Varianten und klinischen Subtypen zu identifizieren.

4.4.1. Einfluss von *DLG5*-Varianten auf den Morbus Crohn Verlauf

Beim Vergleich der Häufigkeiten fiel auf, dass Morbus Crohn-Patienten mit mindestens einem mutierten Allel in der rs2289308-Variante signifikant seltener einen perianalen Befall haben (25,4% vs. 42,2%, $p=0,012$) und seltener Fisteln (39,8% vs. 55,6%, $p=0,027$) entstehen (Tabelle 11). Noch deutlicher ist die Differenz hinsichtlich der Anzahl von Dickdarmresektionen (11,7% vs. 27,8%, $p=0,004$) und Fisteloperationen (20,5% vs. 37,1%, $p=0,008$). Die Anzahl der Fälle in denen Infliximab als Reservetherapeutikum eingesetzt werden musste, ist ebenso signifikant geringer (13,4% vs. 26,7%, $p=0,02$). Hinsichtlich des weiteren Befallmusters und der weiteren eingesetzten operativen Maßnahmen wie auch medikamentösen Therapien, zeigt sich kein relevanter Unterschied.

Ähnliche Beobachtungen können für Träger einer *DLG5_e26*- bzw. *D1507D*-Varianten gemacht werden (Tabelle 12). Sowohl ein perianaler Befall (25,8% vs. 41,3%, $p=0,019$) wie auch Dickdarm- und Fisteloperationen (11,1% vs. 28,3%, $p=0,002$ bzw. 20,8% vs. 36,3%, $p=0,014$) und der Einsatz von Infliximab (13,7% vs. 26,1%, $p=0,031$) sind signifikant seltener. Die Ausbildung von Fisteln zeigt zwar auch einen negativen Trend, ist jedoch mit einem p -Wert von 0,05 nicht signifikant.

Diese Zahlen deuten auf eine Verbindung zwischen der Ausprägungsform des Morbus Crohns und dem Vorhandensein der rs228909- und der *DLG5_e26*- bzw. *D1507D*-Varianten im Sinne eines mildereren Krankheitsverlaufes hin. Ein protektiver Effekt der genannten Mutationen gegenüber einer aggressiven Verlaufsform für Morbus Crohn-Patienten muss dementsprechend diskutiert werden.

Tabelle 11: Genotyp-Phänotyp Vergleich der rs2289308-Variante bei Morbus Crohn

| | rs2289308 + | rs2289308 - | p-Wert | OR | 95%-CI |
|-----------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------------|
| Frühe Erstdiagnose (< 25 Jahre) | 50 (39,4) | 35 (38,9) | 1 | 1,02 | [0,59;1,77] |
| Lokalisation | | | | | |
| Oberer GI-Trakt | 32 (25,4) | 24 (26,7) | 0,88 | 0,94 | [0,58;1,98] |
| Jejunum/ob. Ileum | 31 (26,1) | 19 (22,4) | 0,62 | 1,22 | [0,64;2,33] |
| Terminales Ileum | 109 (89,3) | 70 (80,5) | 0,08 | 2,05 | [0,94;4,49] |
| Dickdarm | 104 (82,5) | 78 (86,7) | 0,45 | 0,27 | [0,16;0,46] |
| Rektum | 39 (32,8) | 37 (42,5) | 0,19 | 0,66 | [0,37;1,17] |
| Perianal | 32 (25,4) | 38 (42,2) | 0,012 | 0,466 | [0,26;0,83] |
| Extraintest. Manifestation | | | | | |
| Fisteln | 51 (39,8) | 50 (55,6) | 0,027 | 0,53 | [0,31;0,91] |
| Stenosen | 80 (62,5) | 63 (70) | 0,31 | 0,46 | [0,27;0,78] |
| Steroidansprechen | 59 (60,2) | 51 (68,9) | 0,26 | 1,46 | [0,78;2,73] |
| Azathioprineinsatz | 68 (57,1) | 53 (61,6) | 0,6 | 0,83 | [0,47;1,46] |
| Infliximabeinsatz | 16 (13,4) | 23 (26,7) | 0,02 | 0,42 | [0,21;0,86] |
| Operationen | | | | | |
| Ileoökalsektion | 41(32,3) | 32 (35,6) | 0,66 | 0,86 | [0,49;1,53] |
| Nachresektion neoterm. Ileum | 11 (9,1) | 14 (16,1) | 0,14 | 0,52 | [0,22;1,20] |
| Dickdarmresektion | 15 (11,7) | 25 (27,8) | 0,004 | 0,34 | [0,17;0,69] |
| Resektion allgemein | 54 (42,2) | 44 (48,9) | 0,34 | 0,76 | [0,44;1,31] |
| Nachresektion allgemein | 13 (10,2) | 14 (15,6) | 0,3 | 0,62 | [0,27;1,39] |
| Fistel-OP | 26 (20,5) | 33 (37,1) | 0,008 | 0,44 | [0,24;0,80] |

Häufigkeitsverteilung der rs2289308-Variante (mind. ein mutiertes Allel) für verschiedene klinische Merkmale in Absolutzahl (Prozentzahl bezieht sich auf die jeweilige Gesamtheit der Variantenträger bzw. Wildtypträger). P-Wert ermittelt durch Exakter Fisher-Test. Errechnung des relativen Risikos (OR=Odds ratio) für das jeweilige klinische Merkmal und des 95%-Konfidenzintervalls (CI).

Tabelle 12: Genotyp-Phänotyp Vergleich der DLG5_e26- bzw. D1507D-Variante bei Morbus Crohn

| | DLG5_e26+/ D1507D+ | DLG5_e26-/ D1507D- | p-Wert | OR | 95%-CI |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-------------|--------------------|
| Frühe Erstdiagnose (jünger 25J) | 49 (39,2) | 36 (39,1) | 1 | 1,00 | [0,58;1,74] |
| Lokalisation | | | | | |
| Oberer GI-Trakt | 30 (24,2) | 26 (28,3) | 0,53 | 0,81 | [0,44;1,50] |
| Jejunum/ob. Ileum | 30 (25,6) | 20 (23) | 0,74 | 1,07 | [0,56;2,0] |
| Terminales Ileum | 107 (89,2) | 72 (80,9) | 0,11 | 1,95 | [0,90;4,26] |
| Dickdarm | 102 (82,3) | 80 (87) | 0,45 | 0,70 | [0,34;1,47] |
| Rektum | 39 (33,3) | 37 (41,6) | 0,25 | 0,70 | [0,40;1,24] |
| Perianal | 32 (25,8) | 38 (41,3) | 0,019 | 0,49 | [0,28;0,88] |
| Extraintest. Manifestation | 70 (55,6) | 49 (53,3) | 0,78 | 1,1 | [0,64;1,88] |
| Fisteln | 51 (40,5) | 50 (54,3) | 0,05 | 0,57 | [0,34;0,98] |
| Stenosen | 78 (61,9) | 65 (70,7) | 0,2 | 0,68 | [0,39;1,20] |
| Chronischer Verlauf | 57 (59,4) | 53(69,7) | 0,2 | 1,56 | [0,84;2,92] |
| Steroidansprechen | 57 (59,4) | 53 (69,7) | 0,2 | 1,56 | [0,84;2,92] |
| Azathioprineinsatz | 67 (57,3) | 54 (61,4) | 0,57 | 0,84 | [0,48;1,48] |
| Infliximabeinsatz | 16 (13,7) | 23 (26,1) | 0,031 | 0,45 | [0,22;0,90] |
| Operationen | | | | | |
| Ileozökalresektion | 40 (32) | 33 (35,9) | 0,56 | 0,84 | [0,48;1,49] |
| Nachresektion neoterm. Ileum | 10 (8,4) | 15 (16,9) | 0,08 | 0,45 | [0,19;1,05] |
| Dickdarmresektion | 14 (11,1) | 26 (28,3) | 0,002 | 0,32 | [0,16;0,64] |
| Resektion allgemein | 52 (41,3) | 46 (50) | 0,22 | 0,70 | [0,41;1,21] |
| Nachresektion allgemein | 12 (9,6) | 15 (16,3) | 0,15 | 0,54 | [0,24;1,22] |
| Fistel-OP | 26 (20,8) | 33 (36,3) | 0,014 | 0,46 | [0,25;0,84] |

Häufigkeitsverteilung der DLG5_e26- bzw. D1507D-Varianten (mind. ein mutiertes Allel) für verschiedene klinische Merkmale in Absolutzahl (Prozentzahl bezieht sich auf die jeweilige Gesamtheit der Variantenträger bzw. Wildtypträger). P-Wert ermittelt durch Exakter Fisher-Test. Errechnung des relativen Risikos (OR=Odds ratio) für das jeweilige klinische Merkmal und des 95%-Konfidenzintervalls (CI).

Beim Vergleich des Geno- und Phänotyps für die R30Q-, P1371Q- und G1066G-Varianten konnten keine Assoziation zu bestimmten klinischen Subtypen festgestellt werden. Die Häufigkeitsverteilung hinsichtlich des Befallmusters, des Krankheitsverhaltens, der extraintestinalen Manifestationen sowie der eingesetzten operativen und medikamentösen Maßnahmen, zeigte unter den verschiedenen genotypischen Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht gezeigt).

4.4.2. Einfluss von *DLG5*-Varianten auf Colitis Ulcerosa-Verlauf

Bei der Suche nach einer Korrelation zwischen *DLG5*-Varianten und klinischen Subtypen bei Colitis Ulcerosa-Patienten fielen Patienten mit einem mutierten Allel der R30Q-Variante auf. Hier zeigte sich eine signifikante Häufung extraintestinaler Manifestationen (87% vs. 63,8%, $p=0,031$), wobei keine Korrelation zwischen der Mutation und den einzelnen extraintestinalen Manifestationen wie Arthralgien, Haut- und Augenmanifestation auszumachen ist. Das Risiko für Colitis Ulcerosa-Patienten extraintestinale Manifestationen zu erleiden ist um das 2,86-fache erhöht. Des Weiteren wird bei R30Q-Variantenträgern signifikant häufiger Ciclosporin eingesetzt (22,7% vs. 6,2%, $p=0,027$). Die Daten könnten auf einen schwereren Krankheitsverlauf der Colitis Ulcerosa für Träger der R30Q-Variante hinweisen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Fallzahl für den Einsatz von Ciclosporin mit 12 Patienten klein ist und dadurch keine abschließende Interpretation erfolgen kann. Die nicht erhöhte Rate an Operationen unter den R30Q-positiven Patienten spricht gegen die Hypothese eines schwereren Colitis Ulcerosa-Verlaufs.

Hinsichtlich der anderen phänotypischen Merkmale zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutationsträgern und Wildtyp-Patienten.

Tabelle 13: Genotyp-Phänotyp Vergleich der R30Q-Variante bei Colitis Ulcerosa

| | R30Q+ | R30Q- | p-Wert | OR | 95%-CI |
|---|-----------|-----------|--------------|-------------|---------------------|
| Erweiterter Befall (über linke Flexur hinausgehend) | 12 (54,5) | 61 (54,5) | 1 | 1,00 | [0,40;2,50] |
| Extraintest. Manifestation | 20 (87) | 74 (63,8) | 0,031 | 2,86 | [1,10;7,41] |
| Periphere Arthralgien | 12 (52,2) | 51 (44) | 0,5 | 1,4 | [0,57;1,39] |
| Sakroiliakale Arthralgien | 5 (21,7) | 17 (14,8) | 0,37 | 1,6 | [0,50;5,66] |
| Augenmanifestation | 1 (4,3) | 10 (8,6) | 0,64 | 0,56 | [0,11;2,91] |
| Hautmanifestation | 2 (8,7) | 7 (6,0) | 0,69 | 1,55 | [0,25;9,47] |
| PSC | 2 (9,1) | 11 (9,6) | 1 | 0,94 | [0,20;4,40] |
| Colon-Ca | 0 (0) | 3 (2,6) | 1 | 0,3 | [0,01;6,24] |
| Chronischer Verlauf | 9 (39,1) | 29 (25,9) | 0,21 | 1,91 | [0,71;5,17] |
| Steroidansprechen | 11 (64,7) | 57 (59,4) | 0,79 | 0,8 | [0,28;2,29] |
| Ciclosporin-Einsatz | 5 (22,7) | 7 (6,2) | 0,027 | 7,59 | [1,53;37,53] |
| Operationen | 1 (4,5) | 6 (5,4) | 1 | 0,84 | [0,11;6,49] |

Häufigkeitsverteilung der R30Q-Variante (mind. ein mutiertes Allel) bei Colitis Ulcerosa-Patienten für verschiedene klinische Merkmale in Abolutzahl (Prozentzahl bezieht sich auf die jeweilige Gesamtheit der Variantenträger bzw. Wildtypträger). P-Wert ermittelt durch Exakter Fisher-Test. Errechnung des relativen Risikos (OR=Odds ratio) für das jeweilige klinische Merkmal und des 95%-Konfidenzintervalls (CI).

Beim Vergleich der Mutationshäufigkeit innerhalb der anderen fünf *DLG5*-Varianten mit den phänotypischen Merkmalen der Colitis Ulcerosa ergab sich kein Anhalt für eine Assoziation (Daten nicht gezeigt). Der Trend zu einem protektiven Effekt von rs228908-, *DLG5_e26*- bzw. D1507D-Varianten wie er sich unter den Morbus Crohn-Patienten zeigte, konnte unter den Colitis Ulcerosa-Patienten nicht beobachtet werden.

4.5. Alter, Geschlecht und Familienanamnese

Weder unter den Morbus Crohn-Patienten noch unter den Colitis Ulcerosa-Patienten war eine Korrelation zwischen Mutationen in den *DLG5*-Varianten und dem Geschlecht, einer positiven Familienanamnese oder einem frühen Erkrankungsbeginn (< 25 Jahre) zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

4.6. Rauchverhalten

Wir untersuchten bei Morbus Crohn-Patienten wie auch bei Colitis Ulcerosa-Patienten die Anzahl von Rauchern bzw. Ex-Rauchern unter den Mutationsträgern und verglichen diese mit der Anzahl von Mutationsträgern unter den gesunden Kontrollen. In den Patientenkollektiven zeigte sich keine Häufung von Mutationsträgern unter den Patienten, die rauchen oder früher geraucht haben (Daten nicht gezeigt). Es gibt daher keinen Anhalt, dass die Kombination aus Rauchen und *DLG5*-Mutation als Risikofaktor für das Auftreten von Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa gewertet werden kann.

4.7. Gastrointestinale Permeabilität

Anhand des sogenannten 3-Zuckertests wurden die gastroduodenale und die intestinale Permeabilität bei 105 Morbus Crohn-Patienten bestimmt. Wir verglichen die Häufigkeit der jeweils erhöhten Permeabilität mit der Häufigkeit von Mutationen in den sechs *DLG5*-Varianten. In unserem Patientenkollektiv konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen Mutations- und Nichtmutationsträgern feststellen. Die Daten ergeben dementsprechend keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen *DLG5*-Mutationen und der erhöhten gastrointestinale Permeabilität von Morbus Crohn-Patienten.

Tabelle 14: Gastrointestinale Permeabilität und *DLG5*-Varianten bei Morbus Crohn-Patienten

| | Gastroduodenale Permeabilität | | | Intestinale Permeabilität | | |
|-------------------|-------------------------------|-----------|--------|---------------------------|-----------|--------|
| | erhöht | normal | p-Wert | erhöht | normal | p-Wert |
| p.R30Q | | | | | | |
| Risiko Allel+ | 5 (29,4) | 12 (70,6) | | 4 (23,5) | 13 (76,5) | |
| Risiko Allel- | 35 (40,4) | 52 (59,8) | 0,59 | 41 (46,6) | 47(53,4) | 0,11 |
| p.P1371Q | | | | | | |
| Risiko Allel+ | 2 (50) | 2 (50) | | 3 (75) | 1 (25) | |
| Risiko Allel- | 38 (38) | 62 (62) | 0,64 | 42 (41,6) | 59 (58,4) | 0,31 |
| p.G1066G | | | | | | |
| Risiko Allel+ | 18 (40) | 27 (60) | | 21 (45,7) | 25 (54,3) | |
| Risiko Allel- | 22 (37,3) | 37 (62,7) | 0,84 | 24 (40,7) | 35 (59,3) | 0,69 |
| rs2289308 | | | | | | |
| Risiko Allel+ | 24 (39,3) | 37 (60,7) | | 29 (47,5) | 32 (52,5) | |
| Risiko Allel- | 16 (37,2) | 27 (62,8) | 0,84 | 16 (36,4) | 28 (63,6) | 0,32 |
| DLG5_e26 | | | | | | |
| Risiko Allel+ | 23 (39) | 36 (61) | | 28 (47,5) | 31 (52,5) | |
| Risiko Allel- | 17 (37,8) | 28 (62,2) | 1 | 17 (37) | 29 (63) | 0,32 |
| p.D1507D | | | | | | |
| Risiko Allel+ | 23 (39) | 36 (61) | | 28 (47,5) | 31 (52,5) | |
| Risiko Allel- | 17 (37,8) | 28 (62,2) | 1 | 17 (37) | 29 (63) | 0,32 |
| DLG5 allg. | | | | | | |
| Risiko Allel+ | 37 (38,9) | 58 (61,1) | | 43 (44,8) | 53 (55,2) | |
| Risiko Allel- | 3 (33,3) | 6 (66,7) | 1 | 2 (22,2) | 7 (77,8) | 0,3 |

Häufigkeitsverteilung von *DLG5*-Varianten (mind. ein mutiertes Allel) bei Morbus Crohn-Patienten (n=105) mit erhöhter bzw. normaler gastroduodenaler und intestinaler Permeabilität in Absolutzahl (Prozentzahl bezieht sich auf die jeweilige Gesamtheit der Variantenträger bzw. Wildtypträger). P-Wert ermittelt durch Exakter Fisher-Test.

5. Diskussion

Morbus Crohn wie auch Colitis Ulcerosa sind multifaktorielle Erkrankungen, deren Ätiologie und Pathogenese bis heute nicht vollständig geklärt sind. Im Jahre 2004 berichteten Stoll und Kollegen in einer Studie an zwei großen europäischen Bevölkerungsgruppen bestehend aus deutschen und britischen Patienten von der Entdeckung eines weiteren CED-Gens: *DLG5* auf Chromosom 10q23.

DLG5 steht für Drosophila Discs Large Homolog 5. Es wird am meisten in Plazentagewebe, in Herz- und Skelettmuskulatur, in der Leber, im Dünndarm und im Kolon exprimiert (Sha et al. 2002). Das *DLG5*-Transkriptionsprodukt gehört zur Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinase (MAGUK). Es enthält 4 PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne (Src-homology 3), gefolgt von einer Guanylatkinase (GUK)-Domäne. Außerdem liegt N-terminal eine Domäne unbekannter Funktion, DUF622 genannt. Die Funktion des *DLG5*-Transkriptionsproduktes ist noch nicht gänzlich erforscht. Es wird ihm eine wichtige Rolle beim Erhalt der epithelialen Zellintegrität zugesprochen (Nakamura et al. 1998). Bekannt ist, dass MAGUK-Proteine mit anderen Proteinen interagieren und so an der Bildung großer Proteinkomplexe beteiligt sind. Sie fungieren als Bindungspartner von Vinexin und Beta-Catenin an Zell-Zell-Kontaktstellen (Wakabayashi et al. 2003) und sind entscheidend beim Erhalt der Zellform und der Zellpolarität (Humbert et al. 2003).

Die Aufdeckung von *DLG5* zog eine Reihe von Forschungsarbeiten nach sich mit dem Ziel, die Assoziation mit CED zu replizieren. Die Ergebnisse sind jedoch nicht einheitlich, so dass bis heute die Geltung von *DLG5* als CED-Gen kontrovers diskutiert wird.

In unserer Studie wollen wir die Assoziation der wichtigsten Varianten im *DLG5*-Gen mit CED untersuchen. Des Weiteren prüfen wir unter Morbus Crohn-Patienten eine vermehrte Häufigkeit von *DLG5*-Mutationen bei *NOD2*-Trägern, um eine mögliche Interaktion beider Gene aufzuspüren. Unter der Annahme, dass *DLG5*-Varianten mit einem bestimmten phänotypischen Erscheinungsbild der Erkrankung assoziiert sind, führen wir eine detaillierte Phänotyp-Genotyp-Analyse der Patienten durch. Nicht zuletzt beschäftigen wir uns mit der bisher ungeklärten Permeabilitätssteigerung bei CED-Patienten. Unsere Hypothese ist, dass Veränderungen im *DLG5*-Gen zu einer Fehlfunktion der intestinalen Barriere führen und dadurch eine chronische Entzündung

ermöglicht wird. Wir untersuchen daher, ob ein Zusammenhang zwischen *DLG5*-Varianten und einer erhöhten gastrointestinalen Permeabilität besteht.

5.1. Assoziation von *DLG5* Varianten mit CED – aktuelle Datenlage

Im Jahre 2004 wurde erstmals durch Stoll und Kollegen eine Assoziation zwischen Varianten im *DLG5*-Gen und CED in einer großen Studie, aus über 400 Trios (erkranktes Kind plus Eltern) bestehend, beschrieben und anschließend in einer großen unabhängigen Fallkontrollstudie bestätigt (Stoll et al. 2004). Die R30Q-Variante ließ sich signifikant häufiger bei CED-Patienten ($p=0,004$) und bei Morbus Crohn-Patienten ($p=0,04$) nachweisen. Ebenso war die seltene Variante P1371Q unter CED-Patienten signifikant häufiger vorzufinden. Der SNP *DLG5_e26* dagegen war signifikant seltener bei CED-Patienten nachzuweisen, so dass ein protektiver Effekt auf die Entwicklung CED angenommen wurde.

In unserem Studienkollektiv konnten wir keine der initialen Assoziationen replizieren. Im Gegenteil, die Trägerhäufigkeit von mindestens einem mutierten Allel der R30Q-Variante war bei den Kontrollen häufiger als bei CED-Patienten (18 % vs. 14,6%, $p=0,297$). Beim Vergleich der Morbus Crohn-Patienten mit den Kontrollen findet sich ebenso eine höhere Rate an R30Q-Variantenträger bei den Kontrollen (17,8% Kontrollen vs. 13,4% Morbus Crohn-Patienten, $p=0,195$). Die seltene P1371Q-Variante war bei 7,7% der CED-Patienten und bei 8,8% der Kontrollen nachweisbar ($p=0,643$), so dass kein Zusammenhang zu erkennen ist. Die Daten für unseren Morbus Crohn-Patienten und P1371Q sind ähnlich. In Bezug auf die *DLG5_e26*-Variante, sind 60,9% der CED-Patienten Träger während nur 54,4% der Kontrollen Träger sind, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,123$). Werden nur die Morbus Crohn-Patienten analysiert, zeichnet sich ein minimaler, nicht signifikanter Trend im Sinne eines protektiven Effekts der *DLG5_e26*-Variante ab. Ein mutiertes Allel der *DLG5_e26*-Variante ist unter den Kontrollen etwas häufiger vorzufinden als unter den Morbus Crohn-Patienten (59,9% Morbus Crohn vs. 54,1% Kontrollen, $p=0,255$). Der von Stoll und Kollegen propagierte protektive Effekt der *DLG5_e26*-Variante für die Entwicklung CED konnte in unserer Arbeit demnach nicht bestätigt werden. Zusammenfassend ließ sich in unserer Patientenkohorte für keine der sechs Varianten eine Assoziation mit CED feststellen. Bei getrennter Analyse von Morbus Crohn- und Colitis Ulcerosa-Patienten fiel eine signifikante Häufung der rs2289308-Variante unter unseren Colitis Ulcerosa-

Patienten auf (65,5% Colitis Ulcerosa vs. 54,1% Kontrollen, $p=0,031$). Diese Mutation ist eine der acht Sequenzvarianten, die den von Stoll benannten Haplotyp A bilden. Für Morbus Crohn war kein Zusammenhang zu *DLG5*-Varianten festzustellen.

Zahlreiche weitere Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit der Bedeutung von *DLG5* bei CED, wobei die Ergebnisse unterschiedlich sind. Dabei war der Fokus v.a. auf die Polymorphismen R30Q, *DLG5_e26* und P1371Q gerichtet. Die erste Studie, die sich dem neuentdeckten *DLG5* als CED-Prädispositionsgen für kaukasische Patienten annahm, untersuchte Patienten aus Kanada, Italien und Großbritannien (Daly et al. 2005). Hier wurde eine signifikante Häufung der R30Q-Variante bei Morbus Crohn-Patienten in einer Fallkontrollstudie bestehend aus italienischen und kanadischen Patienten ($p=0,003$) und in einer TDT-Analyse bestehend aus kanadischen und britischen Familien beobachtet ($p=0,018$). Eine TDT-Analyse ist eine familienbasierte Assoziationsstudie, mit der ein Vererbungsungleichgewicht aufgedeckt werden kann, d.h. bestimmte Markerallele die bevorzugt von Eltern auf das erkrankte Kind vererbt werden. Im dritten Studienkollektiv, eine britische Fallkontrollstudie, war die R30Q-Assoziation nicht zu replizieren. Der von Stoll beschriebene protektive Effekt der *DLG5_e26*-Variante und die Assoziation der P1371Q-Variante zu CED wurden wie in unserer Forschungsarbeit in keiner der drei Studien nachgewiesen. Daly und Kollegen sprechen sich demnach für *DLG5* als CED-Risikogen aus, jedoch mit einem schwächeren Effekt als ursprünglich propagiert.

Eine große Anzahl an darauffolgenden Studien aus Süddeutschland, Schottland, Belgien, Norwegen, Großbritannien, Ungarn und Italien konnten, im Gegensatz zur initialen Studie, keine Assoziation zwischen *DLG5*-Varianten und einem gehäuftem Auftreten von CED feststellen (Török et al. 2005, Noble et al. 2005, Vermeire et al. 2005, Medici et al. 2006, Tremelling et al. 2006, Lakatos et al. 2006, Ferraris et al. 2006, Pearce et al. 2007, Cucchiara et al. 2007). In der schottischen Studie ließ sich wie in unserer Studie die R30Q-Variante bei den Kontrollen häufiger als bei Morbus Crohn-Patienten (11,4% CED vs. 13,2% Kontrollen) nachweisen.

Aus Kanada stammte eine Studie, die statt einer negativen, eine positive Assoziation der *DLG5_e26*-Mutation und CED bzw. Morbus Crohn in ihrer Kohorte feststellte (30,5% Kontrollen vs. 36,1 % CED, $p=0,01$ und vs. 36,6% Morbus Crohn, $p=0,001$) (Newmann et al. 2006). Die P1371Q-Variante zeigte ebenfalls eine signifikante Häufung unter CED-

und Morbus Crohn-Patienten (6,1% Kontrollen vs. 9,6% CED, $p=0,01$ und vs. 10,3% Morbus Crohn, $p=0,008$) während die R30Q-Variante kein Krankheitsrisiko darstellte.

Im Jahre 2007 wurde wiederum in einer neuseeländischen Studie die initial negative Assoziation von DLG5_e26-Mutationen mit CED repliziert (30,6% CED vs. 34,8% Kontrollen, $p=0,036$) (Browning et al. 2007). Die Genveränderungen R30Q und P1371Q zeigten dagegen keine Krankheitsassoziation.

Die Vielzahl der unterschiedlichen Ergebnisse machen klar, dass die Beschreibung von *DLG5* als krankheitsverursachende Genveränderung im Jahre 2004 überdacht werden muss. Die Mehrzahl der Studien konnte wie in unserer Arbeit keine Assoziation der drei Hauptvarianten in *DLG5* mit CED feststellen. Die in unserer Studie nachgewiesene Assoziation der rs2289308-Mutation mit Colitis Ulcerosa wurde in keiner anderen Studie beschrieben, daher sollte die Interpretation äußerst vorsichtig erfolgen. Das an Colitis Ulcerosa erkrankte Patientenkollektiv besteht aus 148 Patienten und ist somit relativ klein. Weitere Studien sind notwendig, die sich mit der rs2289308-Variante befassen, um dessen Bedeutung zu klären.

Die Bandbreite der Mutationshäufigkeit unter CED-Patienten kaukasischen Ursprungs ist stark schwankend und belegt die regionalen Unterschiede. Dabei können phänotypische Unterschiede unter den Studienteilnehmern wie auch eine genetische Heterogenität innerhalb der kaukasischen Bevölkerung eine entscheidende Rolle spielen. Die nachfolgende Tabelle führt die unterschiedlichen Studienergebnisse hinsichtlich der R30Q-Variante auf.

Tabelle 15: Häufigkeit der R30Q-Variante in verschiedenen Populationen

| Studie Jahr | Population | n | CED | | Kontrollen | | P- Wert |
|-------------------|----------------|------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| | | | R30Q+ | R30Q- | R30Q+ | R30Q- | |
| Stoll 2004 | Deutschland | 525 | 132 (25,1) | 393 (74,9) | 88 (17,1) | 427 (82,9) | 0,002 |
| Daly 2005 | Quebec/Italien | 664 | 73 (11) | 591 (89) | 24 (5,9) | 380 (94,1) | 0,006 |
| | GB | 1378 | 128 (9,3) | 1250 (90,7) | 96 (9,7) | 890 (90,3) | 0,72 |
| Noble 2005 | Schottland | 650 | 125 (19,2) | 525 (80,8) | 63 (24,6) | 193 (75,4) | 0,08 |
| Vermeire 2005 | Belgien | 608 | 130 (22,5) | 447 (77,5) | 62 (20,6) | 239 (79,4) | 0,55 |
| Medici 2006 | Norwegen | 386 | 95 (8,2) | 1067 (91,8) | 94 (8,7) | 980 (91,2) | 0,65 |
| Newman 2006 | Kanada | 1162 | 71 (18,4) | 315 (81,6) | 49 (21,8) | 177 (78,2) | 0,65 |
| Lakatos 2006 | Ungarn | 773 | 170 (22) | 603 (78) | 42 (28) | 108 (72) | 0,11 |
| Büning 2006 | Deutschland | 391 | 57 (14,6) | 334 (85,4) | 39 (18) | 178 (82) | 0,30 |
| Cucchiara 2007 | Italien | 336 | 44 (13,1) | 292 (86,9) | 59 (17) | 288 (83) | 0,17 |
| Browning 2007 | Neuseeland | 793 | 168 (21,2) | 625 (78,8) | 80 (19,5) | 330 (80,5) | 0,55 |

Ergebnisse unterschiedlicher Studien bezüglich der R30Q-Variante (mind. ein mutiertes Allel) bei CED-Patienten und gesunden Kontrollen in Absolutzahl (Prozentzahl). Berechnung der P-Werte durch Exakter Fisher-Test.

5.1.1. *DLG5*-Heterogenität in unterschiedlichen Populationen

Wie bereits erwähnt, weisen die regionalen Unterschiede hinsichtlich des Auftretens von *DLG5*-Varianten auf die zugrundeliegende genetische Heterogenität in den unterschiedlichen Populationen. Alle bisher aufgeführten Studienergebnisse beziehen sich auf Populationen kaukasischen Ursprungs. Dabei differieren die Prävalenzraten der R30Q-Variante erheblich. Eine griechische Studie konnte als alleinige europäische Studie weder in ihrer Patientenkohorte noch bei den Kontrollen mutierte R30Q-Varianten feststellen (Gazouli et al. 2005). Inwieweit *DLG5*-Varianten in anderen ethnischen Gruppen überhaupt existieren ist noch nicht geklärt.

Eine japanische Studie fand heraus, dass die R30Q-Variante in der japanischen Bevölkerung völlig fehlt (Yamazaki et al. 2002). Eine andere Mutation hingegen, rs3758462 auf Intron15 des *DLG5*-Gens, war signifikant mit japanischen Morbus Crohn-Patienten assoziiert ($p=0,023$) (Yamazaki et al. 2004). Die Studie von Yamazaki und Kollegen heben die Tatsache hervor, dass ethnisch unterschiedliche Populationen, trotz phänotypischer Ähnlichkeit, nicht notwendigerweise die gleichen Prädispositionsgene besitzen. Dies ist für das *NOD2*-Gen gut dokumentiert: Während die drei SNPs 3020insC, Arg702Trp und Gly908Arg nachweislich mit Morbus Crohn in der europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung assoziiert sind, sind die Mutationen in der asiatischen Bevölkerung nicht vorzufinden (Croucher et al. 2003; Yamazaki et al. 2002). Selbst innerhalb Europas gibt es beträchtliche Unterschiede mit der weitaus höheren Mutationsrate unter zentraleuropäischen Morbus Crohn-Patienten (Hugot et al. 2001) im Vergleich zu nordeuropäischen Morbus Crohn-Patienten (Arnott et al. 2004). Hinsichtlich der *DLG5*-Varianten, ist bisher noch keine klare regionale Struktur zu erkennen. Das für *NOD2*-Mutationen typische Nord-Süd-Gefälle deutet sich auch für *DLG5*-Varianten an, mit deutlich niedrigeren Prävalenzraten in Norwegen und Großbritannien im Vergleich zu zentraleuropäischen Bevölkerungen.

Um die Rolle *DLG5* bei CED in Abhängigkeit der ethnischen Zugehörigkeit weiter zu beleuchten, bedarf es weiterer Studien u.a. aus Asien, Afrika und Lateinamerika.

5.1.2. *DLG5*-Mutationen an phänotypische Merkmale gebunden?

Eine anderer Erklärungsansatz für die Diskrepanz der Studienergebnisse sind nicht berücksichtigte phänotypische Differenzen zwischen den untersuchten Studiengruppen wie beispielsweise das Geschlecht. Während für andere komplexe Erkrankungen, z.B. kardiovaskuläre Krankheiten, geschlechtsspezifische Geneffekte gut dokumentiert sind, so wurde das Geschlecht bei der Suche nach dem genetischen Hintergrund chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zunächst außer Acht gelassen.

Eine 2006 veröffentlichte Studie analysierte, ob eine geschlechtsspezifische Assoziation der R30Q-Mutation mit Morbus Crohn vorliege (Friedrichs et al. 2006). Die Mutationshäufigkeit war unter männlichen und weiblichen Morbus Crohn-Patienten ähnlich (10,1% Männer, 10,9% Frauen), unter den gesunden Kontrollen gab es jedoch bedeutende Unterschiede (5,2% Männer, 11,3% Frauen). Es zeigte sich eine signifikante Mutationshäufigkeit der R30Q-Variante unter männlichen Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu männlichen Kontrollen ($p=0,001$), so dass Friedrichs und Kollegen R30Q als einen geschlechtsspezifischen Risikofaktor für Männer interpretierten. Vermutlich wird die Assoziation durch eine geschlechtsabhängige Transmission Ratio Distortion (TRD) unter den gesunden Kontrollen verursacht. Warum die Transmission Ratio Distortion unter den Morbus Crohn-Patienten nicht zu beobachten ist, bleibt allerdings unbeantwortet. Unter betroffenen Kindern wies eine amerikanische Studie eine geschlechtsspezifische negative Assoziation der R30Q-Variante mit Morbus Crohn für Mädchen nach ($p=0,006$), so dass ein protektiver Effekt der R30Q-Variante auf Morbus Crohn für Mädchen angenommen wurde (Biank et al. 2007). Eine Metaanalyse sammelte die Daten von Morbus Crohn-Patienten hinsichtlich der R30Q-Mutation von elf zuvor durchgeführten Studien und verglich die Trägerhäufigkeit zwischen Patienten und Kontrollen unter Berücksichtigung des Geschlechts (Browning et al. 2008). Es wurde ein, wenn auch nur marginaler, protektiver Effekt der R30Q-Variante für Frauen bestätigt ($p=0.049$, $OR=0.87$). Nach Einbeziehung der geschlechtsspezifischen Daten anderer Studien zeigte sich R30Q deutlich mit einem verminderten Morbus Crohn-Risiko für Frauen assoziiert ($p=0.010$, $OR= 0.86$).

Die neuen Erkenntnisse hinsichtlich des geschlechtsspezifischen *DLG5*-Risikos veranschaulichen die Möglichkeit von phänotypischer Abhängigkeit, wenn über *DLG5* als CED-Gen diskutiert wird. Es bleibt unklar, inwiefern die heterogenen Ergebnisse

vergängerer Studien durch die fehlende Berücksichtigung phänotypischer Merkmale begründet sind.

5.1.3. *DLG5* und *NOD2* Interaktion

Das *NOD2*-Gen ist das am häufigsten replizierte Gen, das im Zusammenhang mit Morbus Cohn steht. Da es sich bei CED um eine multifaktorielle, polygenetische Erkrankung handelt, müssen bei der Suche nach neuen Prädispositionsgenen potentielle Gen-Gen-Interaktionen berücksichtigt werden.

In unserer Studie konnten wir keine erhöhte *DLG5*-Mutationshäufigkeit bei Morbus Crohn-Patienten feststellen, die Träger eines *NOD2*-Risikos sind, im Vergleich zur Patientengruppe ohne *NOD2*-Risiko. Insgesamt haben zwar 96,8% der Morbus Crohn-Patienten mit einem positiven *NOD2*-Risiko-Genotyp eine *DLG5*-Mutation, aber auch 91,4% der Morbus Crohn-Patienten ohne *NOD2*-Risiko-Genotyp sind Träger einer *DLG5*-Mutation ($p=0,171$). Werden die einzelnen *DLG5*-Varianten hinsichtlich ihres *NOD2*-Status analysiert, so findet man ebenso wenig eine Assoziation. Hinsichtlich der R30Q-Variante sind 12,9% der *NOD2*-positiven Morbus Crohn-Patienten und 13,7% der *NOD2*-negativen Morbus Crohn-Patienten Mutationsträger. Somit haben wir keinen Anhalt für eine Interaktion zwischen dem *NOD2*-Gen auf der perizentromeren Region von Chromosom16 und dem *DLG5*-Gen auf Chromosom 10q23.

Unsere Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Studie von Stoll und Kollegen. Neben der neuentdeckten Assoziation von *DLG5*-Polymorphismen mit CED, wurde von einer potentiellen Interaktion zwischen der R30Q-Variante und *NOD2*-Mutationen berichtet (Stoll et al. 2004). Anhand einer TDT-Analyse wurde gezeigt, dass unter Morbus Crohn-Trios (betroffenes Kind plus Eltern) die Übertragungshäufigkeit der R30Q-Variante bei *NOD2*-positiven Patienten signifikant häufiger ist als unter *NOD2*-negativen Patienten. Von 302 Morbus Crohn-Trios betrug die Übertragungsrate 30:12 (T:U) für *NOD2*-positive Patienten und 28:28 (T:U) für *NOD2*-negative Patienten.

Die darauf folgenden Studien führten auch in diesem Punkt zu kontroversen Ergebnissen. Eine Vielzahl von Studien konnte keine Assoziation von *DLG5*-Varianten mit *NOD2*-Mutationen unter ihren Patienten feststellen (Török et al. 2005; Noble et al. 2005; Pearce et al. 2007). Während eine Studie an flämischen Patienten keine Assoziation der *DLG5*-Varianten mit einem gehäuften CED-Auftreten nachweisen konnte, zeigte sich unter den Patienten eine signifikante Häufigkeit von *DLG5*-

Mutationen bei *NOD2*-positiven Patienten im Vergleich zu *NOD2*-negativen Patienten (12,2% vs. 8,7%, $p=0,033$) (Vermeire et al. 2005). Eine andere Studie fasste die Daten von 1600 Morbus Crohn-Patienten aus den Niederlanden zusammen und analysierte Interaktionen zwischen fünf verschiedenen Genen, denen ein Zusammenhang mit Morbus Crohn nachgesagt wird, u.a. die P1371Q-Variante des *DLG5*-Gens (Weersma et al. 2009). Es zeigte sich eine moderate, signifikante Interaktion zwischen *DLG5* und *NOD2*.

Ob eine Interaktion zwischen *DLG5* und *NOD2* besteht, bleibt unklar. Die Ergebnisse erlauben zum jetzigen Zeitpunkt noch keine eindeutige Schlussfolgerung.

5.2. Genotyp-Phänotyp-Analyse

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen umfassen eine Entität von Erkrankungen mit unterschiedlicher Erscheinungsform. Die Ursache der unterschiedlichen Ausprägung ist weitgehend ungeklärt. Wer leidet unter extraintestinalen Manifestationen? Wer reagiert nicht auf Steroide? Und bei wem werden Operationen unumgänglich? Wir versuchten in unserer Studie, klinische Subtypen der CED und deren genetische Prädisposition zu identifizieren. Unsere Zukunftsvision beinhaltet bereits bei Diagnosestellung eine Genotypisierung, um den Krankheitsverlauf und den Schweregrad abschätzen zu können, um auf diese Weise frühzeitig ein individuell abgestimmter Therapieplan einleiten zu können.

5.2.1. Protektiver Einfluss von *DLG5*-Varianten auf Morbus Crohn-Verlauf

Bei der Analyse unserer Morbus Crohn-Patienten fielen die rs2289308- und die *DLG5_e26*- bzw. die D1507D-Varianten auf. In allen drei Fällen war ein perianaler Befall ($p=0,012$; $p=0,019$), der Einsatz von Infliximab ($p=0,02$; $p=0,031$), Dickdarm- ($p=0,004$; $p=0,002$) und Fistel-Operationen ($p=0,008$; $p=0,014$) signifikant seltener bei Variantenträger im Vergleich zu Wildtyp-Patienten. Patienten, die eine rs2289308-Variante aufweisen sind zudem signifikant seltener von Fisteln betroffen ($p=0,027$). Diese Tendenz zeigt sich zwar auch bei Trägern der *DLG5_e26* bzw. D1507D-Mutation, wobei der Unterschied hier nicht signifikant ist ($p=0,05$). Die Daten legen einen protektiven Effekt der genannten *DLG5*-Mutationen gegenüber einer aggressiven Verlaufsform nahe.

Unsere Vermutung wird erhärtet durch die Ergebnisse einer neuseeländischen Studie. Hier gelang es Browning und Kollegen, eine negative Assoziation der DLG5_e26-Varianten und CED in ihrer neuseeländischen Patientengruppe nachzuweisen (Browning et al. 2007). Gleichzeitig war die Mutationshäufigkeit signifikant niedriger in der Subgruppe von Morbus Crohn-Patienten mit Fisteln (OR=0,59; 95%-CI [0,34;0,98]) und der Subgruppe von Morbus Crohn-Patienten bei denen Immunmodulatoren eingesetzt wurden (OR=0,75; 95%-CI [0,57;0,98]). Auch für Colitis Ulcerosa-Patienten ließ sich ein protektiver Effekt beobachten: hier waren Mutationsträger seltener von extraintestinalen Manifestationen betroffen (OR=0,57; 95%-CI [0,36;0,90]) und es lag seltener eine positive Familienanamnese vor (OR=0,56; 95%-CI [0,35;0,88]).

Die ersten veröffentlichten *DLG5*-Studien analysierten nicht den Phänotyp der Patienten und können dementsprechend keine Aussage zu möglichen Assoziation mit bestimmten Subtypen machen (Stoll et al. 2004; Daly et al. 2005; Noble et al. 2005). Einige später veröffentlichte Studien sprachen sich gegen einen Zusammenhang zwischen der DLG5_e26-Variante und dem klinischen Erscheinungsbild aus (Török et al. 2005; Newmann et al. 2006).

Trotz einiger negativer Studienergebnisse bleibt der Verdacht eines milderen Krankheitsverlaufes bei Trägern einer DLG5_e26-Mutation bestehen. Was die rs2289308-Mutation angeht, so ist es fraglich inwieweit eine Genveränderung, die in unserer Studie mit dem Auftreten der Colitis Ulcerosa assoziiert ist, gleichzeitig einen protektiven Einfluss auf den Verlauf Morbus Crohns ausüben kann.

5.2.2. R30Q-Variante als Marker für einen schweren Colitis Ulcerosa-Verlauf?

Die Daten der Phänotyp-Genotyp-Analyse unserer Colitis Ulcerosa-Patienten geben Hinweise auf einen erschwerten Krankheitsverlauf für R30Q-Mutationsträger. Colitis Ulcerosa-Patienten, die eine R30Q-Variante aufweisen, leiden signifikant häufiger unter extraintestinalen Manifestationen als Wildtyppatienten ($p=0,031$; OR=2,86). Die genannte Genveränderung ist außerdem mit einem vermehrten Einsatz von Ciclosporin assoziiert ($p=0,027$; OR=7,59), wobei diese Subgruppe mit 12 Colitis Ulcerosa-Patienten sehr klein ist. Die Tatsache, dass nicht gleichzeitig eine erhöhte Operationsindikation unter den R30Q-positiven Patienten besteht, spricht wiederum gegen einen erschwerten Krankheitsverlauf, zumindest gegen einen konservativ nicht zu beherrschenden Krankheitsverlauf.

In einer Vielzahl weiterer Arbeiten ist die Wirkung des R30Q-Polymorphismus auf das klinische Erscheinungsbild hin untersucht worden. Die Ergebnisse sind uneinheitlich. So wird in den bereits erwähnten Studien aus Süddeutschland, Kanada und Belgien ein Zusammenhang zwischen der R30Q-Variante und einem bestimmten Phänotyp verneint (Török et al. 2005, Newmann et al. 2006; Vermeire et al. 2005). In einer ungarischen Studie ist allerdings eine Wirkung der genannten Mutation, zu einem schwereren Krankheitsbild hin übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, gut beschrieben. Es wurde eine Assoziation des R30Q-Polymorphismus mit einer Steroidresistenz unter Morbus Crohn-Patienten erkannt (Lakatos et al. 2006). 16,3% der Variantenträger waren steroidresistent, während nur 7,6% der Nichtvariantenträger steroidresistent waren ($p=0,07$; $OR=0,72$). Als Ursache der Steroidresistenz diskutierten die Wissenschaftler die epitheliale Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren, wie NF- κ B, die zur Hemmung der Transkriptionsaktivität glukokortikoider Rezeptoren führt. Bei britischen Morbus Crohn-Patienten wurde wiederum gezeigt, dass Träger der R30Q-Variante signifikant häufiger unter einem Ileumbefall leiden als Wildtyp-Patienten ($p=0,042$) (Pearce et al. 2007).

Die Ergebnisse dieser Studien festigen den Verdacht, dass die R30Q-Mutation in Verbindung mit einem bestimmten Krankheitsbild steht. Ob es sich tatsächlich um einen aggressiveren Krankheitsverlauf handelt, muss in weiteren Studien untersucht werden. Gleichzeitig muss jedoch hinterfragt werden, inwieweit Genvarianten, deren Krankheitsassoziation fraglich ist, das klinische Erscheinungsbild bestimmen können. Andererseits ist nicht ausgeschlossen, dass verschiedene Sequenzvarianten für unterschiedliche klinische Subtypen der Erkrankung verantwortlich sind. Dies wäre ein Erklärungsansatz für die divergierende Datenlage zu *DLG5*.

In Zukunft sind Studien notwendig, die den Phänotyp ihrer Patienten durch standardisierte Methoden dokumentieren, um Korrelationen zwischen Genveränderungen und klinischen Merkmalen untersuchen zu können und um die Ergebnisse weltweit vergleichen zu können. Durch interkontinentale Kooperation verschiedener Forschungszentren muss ein Datenaustausch ermöglicht werden und auf diese Art große Meta-Analysen stattfinden. Erst durch solch umfangreiche Studien wird es möglich sein, die Rolle von *DLG5*-Varianten bei der Ausprägung bestimmter phänotypischer Subtypen zu klären. Es bleibt weiterhin zu beantworten welche pathophysiologischen Prozesse durch *DLG5*-Genveränderungen in Gang gesetzt

werden und auf welche Weise diese das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung prägen.

5.3. Störung der gastrointestinalen Barriere

Eine gesteigerte gastrointestinale Permeabilität bei CED-Patienten ist häufig beobachtet worden (Katz, K.D. et al. 1989; Wyatt et al. 1993). Die Ursache und die Folgen der veränderten Durchlässigkeit sind jedoch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um ein dem Entzündungsprozess weit vorausgehendes, genetisch bedingtes Phänomen handelt. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass 10-54 % der Verwandten ersten Grades von Morbus Crohn-Patienten eine erhöhte intestinale Permeabilität aufweisen auch ohne klinische Symptome (Hollander.1993; May et al. 1993). Eine intestinale Barrierestörung kann dem Krankheitsausbruch bis zu 8 Jahre vorausgehen (Irvine et al. 2000). Ein weiterer Beleg für den genetischen Hintergrund ist die Assoziation von *NOD2*-Veränderungen mit einer gesteigerten Permeabilität bei 26% der Verwandten ersten Grades von Morbus Crohn-Patienten (Buhner et al. 2006). Durch ein vermehrtes Eindringen von Bakterien und anderen intraluminalen Antigenen ist eine Überaktivierung des angeborenen, darmassoziierten Immunsystems denkbar. Die Entzündungsspirale ist in Gang gesetzt: es kommt zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), was die Barrierefunktion der Darmmukosa weiter negativ beeinflusst und den Entzündungsprozess am Laufen erhält. Die Identifizierung der verantwortlichen Gene ist eine große Herausforderung der heutigen CED-Forschung.

Da das *DLG5*-Genprodukt eine wichtige Rolle für die epitheliale Zellintegrität zu spielen scheint, vermuten wir, dass *DLG5*-Genveränderungen zu einer gestörten Barrierefunktion der Darmmukosa führen und dadurch der Weg zu einer Entzündungsreaktion gebahnt wird.

Es wurde die gastroduodenale und die intestinale Permeabilität von 105 Morbus Crohn-Patienten getestet, die sich zum Testzeitpunkt in Remission befanden. Es stellte sich heraus, dass 38,5% der Patienten eine erhöhte gastroduodenale Permeabilität und 42,9% eine erhöhte intestinale Permeabilität aufweisen. Leider gelang es uns nicht, einen Zusammenhang zwischen *DLG5*-Mutationen und einer veränderten Permeabilität aufzudecken. Die Häufigkeitsverteilung der sechs untersuchten *DLG5*-Varianten waren

nicht signifikant unterschiedlich bei Patienten mit erhöhter gastrointestinaler Permeabilität verglichen mit denjenigen ohne erhöhte gastrointestinaler Permeabilität.

Unsere Daten liefern keinen Anhalt für eine veränderte Barrierefunktion, die durch *DLG5*-Varianten verursacht wird. Die Ergebnisse unserer Studie sollten jedoch nur mit Vorsicht interpretiert werden, da die Patientengruppe mit einer erhöhten gastroduodenalen und/oder intestinalen Permeabilität mit 45 Personen recht klein ist. Es ist dementsprechend nicht auszuschließen, dass *DLG5* trotz unserer Ergebnisse Einfluss auf die Darmpermeabilität hat. Wir hoffen, dass zukünftige großangelegte Studien Aufschluss über die veränderte Permeabilität und den Zusammenhang mit *DLG5* bringen werden. Bislang gibt es jedoch keine Institution, die unsere Hypothese vertritt und die gastrointestinale Permeabilität im Hinblick auf *DLG5*-Varianten untersucht hat.

5.3.1. Ursache der veränderten Permeabilität

Mit zunehmender Erkenntnis über die Pathogenese CED richtete sich der Fokus der Forscher immer mehr auf die biologischen Prozesse, die hinter der Krankheitsentstehung stehen. Die gestörte gastrointestinale Permeabilität scheint dabei Schlüsselrolle zu spielen. Ein besseres Verständnis der Folgen und Ursachen der gastrointestinalen Permeabilitätsstörung ist eine große Herausforderung der CED-Forschung.

5.3.1.1. Tight junctions

Die Barrierefunktion des Darmes wird u.a. parazellulär durch den apikalen Haftkomplex (sog. apical junction complex) reguliert, der die Kontaktstelle zwischen benachbarten Epithelzellen darstellt. Dieser Komplex besteht aus zwei Strukturen. Die adherens junctions sind zirkuläre Strukturen, die für den mechanischen Zusammenhalt benachbarter Epithelzellen verantwortlich sind. Die am apikalen Pol des Haftkomplexes liegende tight junctions versiegeln den Interzellulärraum gegenüber dem extrazellulären Milieu und fungieren als dynamische Barriere, die das epitheliale Kompartiment vom darunter liegenden Interstitium trennt. Verschiedene Transmembranproteine sind am molekularen Aufbau der tight junctions beteiligt – das Occludin, die Proteinfamilie der Claudine sowie die JAM-Proteine (junctional adhesion molecule).

Die für unterschiedliches Gewebe spezifische tight junction-Struktur resultiert aus einer unterschiedlichen Zusammensetzung verschiedener Claudine. Innerhalb der Claudinfamilie gibt es abdichtende Proteine (Claudin-1, -4 und -5) und Proteine mit porenbildender Funktion (Claudin-2 und -16). Je nach Zusammensetzung ist eine Modulation der tight junction-Permeabilität möglich. Die JAM-Proteine ihrerseits binden auf ihrer zytoplasmatischen Seite an eine Reihe von Struktur- und Signalproteinen, z.B. an Adapterproteine der MAGUK-Gruppe wie ZO-1, ZO-2 und ZO-3.

In der Mukosa von CED-Patienten führen proinflammatorische Zytokine zu einer verstärkten Internalisierung von tight junction-Proteine, wodurch die Barrierefunktion beeinträchtigt wird (Ivanov et al. 2004). In einer weiteren Studie konnte elektronenmikroskopisch eine verminderte Expression von Occludin, Claudin-5 und -8 sowie eine verstärkte Expression des porenbildenden Claudin-2 bei Morbus Crohn-Patienten festgestellt werden, was in eine verminderte Dichte und Diskontinuität des tight junction-Strangs führte (Zeissig et al. 2007).

Wie bereits beschrieben gehört das *DLG5*-Transkriptionsprodukt zur Gruppe der MAGUK-Proteine, die mit tight junction-Proteine interagieren. Unter diesem Gesichtspunkt ist eine Involvierung des *DLG5*-Genprodukts in der Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit der tight junctions durchaus denkbar.

5.3.1.2. Apoptose

Die Apoptose ist unter physiologischen Bedingungen ein kontrollierter „programmierter Tod“ einzelner Zellen. Es gibt Hinweise, dass eine erhöhte Apoptoserate intestinaler Epithelzellen bei Colitis Ulcerosa-Patienten zur defekten Darmbarriere beitragen. Die gesteigerte Apoptose wird hier durch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukin-13 induziert (Gitter et al. 2004). Die Folge des vermehrten Zelltodes sind epitheliale Läsionen, z.B. Mikroerosionen, die in einem sehr frühen Entzündungsstadium der Colitis Ulcerosa auftreten, und eine daraus resultierende Beeinträchtigung der intestinalen Barrierefunktion.

5.4. Die Suche nach weiteren Kandidatengen

Die Suche nach CED-Genen ist aufgrund der nur geringen Penetranz und komplexer Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen äußerst schwierig. Umso wichtiger ist es, die statistische Stärke zu verbessern, indem Studien auf der Grundlage sehr großer

Datenbanken durchgeführt werden und auf diese Weise auch Genloci geringer Penetranz detektiert werden können. Neben familienbasierte Kopplungsanalysen haben genomweite Assoziationsstudien große Fortschritte bei der Suche nach neuen Kandidatengenomen erzielt. Hier ist es ausgehend vom gesamten menschlichen Genom möglich, DNA-Abschnitte zu identifizieren, die möglicherweise Risikogene beinhalten.

Anhand der Kombination dreier zuvor durchgeführter, genomweiter Scans mit einer Summe von 3230 CED-Fälle und 4829 Kontrollen gelang es Barrett und Kollegen insgesamt 21 neue Genloci zu identifizieren, die potentielle CED-Anfälligkeit gene beinhalten (Barrett et al. 2008). Weitere elf zuvor beschriebene genetische Assoziationen wurden bestätigt. Die Neuentdeckung verspricht nicht nur ein Blick in bisher unbekannt pathophysiologische Mechanismen, sondern kann eventuell die genetischen Defekte, die hinter der veränderten Barrierefunktion stehen, tiefer beleuchten. Veränderungen im *DLG5*-Gen zeigten in dieser Arbeit keine Assoziation zu CED.

5.4.1. Potentielle Permeabilitätsgene

E-Cadherin (*CDH1*) sind Calcium-abhängige transmembrane Glykoproteine, die eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der gastrointestinalen Permeabilität spielen. Sie befinden sich im Epithel, u.a. an den bereits beschriebenen adherens junctions. In einer kanadischen Studie konnte gezeigt werden, dass Mutationen innerhalb des *CDH1*-Gens mit Morbus Crohn assoziiert sind. Bei Trägern der Risikohaplotypen kommt es im intestinalen Epithel zu einer zytoplasmatischen Anhäufung einer verkürzten E-Cadherin-Form und zu einer falschen Lokalisation von E-Cadherin und Beta-Catenin in der Plasmamembran. Die Forscher gehen davon aus, dass dies ein Erklärungsansatz für die beeinträchtigte Barrierefunktion bei Morbus Crohn-Patienten sein könnte (Muisse et al. 2009)

Ebenso die *STAT3* (signal transducer and activator of transcription3) kodierenden Region ist möglicherweise bei der Aufrechterhaltung der gastrointestinalen Permeabilität involviert. Es handelt sich um einen Signalübertragungsmechanismus, der von Zytokinen an der Zellwand ausgehend, im Zellkern die Transkription verschiedene Gene vorwiegend hämatopoetischer Zellen moduliert. Zahlreiche Zytokine, die bei CED beteiligt sind, haben beeinflussen auf den *STAT3*-Signalweg. Selektive Epithelzellen-*STAT3*-knockout-Mäusen waren hochgradig anfällig für die Entwicklung einer Kolitis (Pickert et al. 2009). Bei CED-Patienten scheint eine adäquate *STAT3*-Aktivierung durch

IL-22 unentbehrlich für die Regeneration verletzter, intestinaler Mukosa und somit für die Wiederherstellung einer intakten Barrierefunktion (Neufert C et al. 2010).

Eine Assoziation zwischen einer erhöhten Morbus Crohn-Anfälligkeit und Mutationen des *OCTN1/2* (organic cation transporter)-Gens wurde erstmals 2004 in der kanadischen Bevölkerung durch Peltekova und Kollegen beschrieben (Peltekova et al. 2004). Das *OCTN1*- und *-2*-Gen befinden sich im IBD5-Lokus auf Chromosom 5q31 und werden u.a. in intestinalen Epithelzellen exprimiert. Zahlreiche Studien wie auch Metaanalysen genomweiter Assoziationsstudien konnten IBD5 als einen Genlokus mit erhöhter Anfälligkeit für Morbus Crohn bestätigen (Barett et al. 2008). Die genauen Funktionen der Kationen-Transporter und die Verbindung zu CED sind nicht vollständig geklärt. Neben dem *OCTN1/2*-Gen befinden sich zahlreiche Gene immunregulatorischer Zytokine innerhalb des IBD5-Lokus, die potentielle CED-Gene mit möglichem Einfluss auf die Permeabilität (Reinhard et al. 2006) darstellen.

Die Daten der genomweiten Assoziationsstudien liefern Hinweise für eine Beteiligung zahlreicher weiterer Gene mit möglichem Einfluss auf die intestinale Barrierefunktion, wobei genauere funktionelle Daten bisher fehlen. Dazu gehören die Gene *PTGER4*, *ITLN1*, *DMBT1* und *XBP1*. Inwieweit Gene involviert sind, die direkt für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion verantwortlich sind, z.B. die Occludin-, Claudin- oder JAM-Proteine kodierende Gene, wird derzeit untersucht.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Erforschung des genetischen Hintergrunds chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist ein sich rapide und ständig weiterentwickelndes Feld. Die Identifizierung der verantwortlichen Gene könnte der Schlüssel zu einer optimierten, dem einzelnen Patienten angepasste Therapie liefern. Nach der bahnbrechenden Entdeckung *NOD2* als Crohn-Suszeptibilitätsgen war die Beschreibung *DLG5* als weiteres CED-Gen durch Stoll und Kollegen im Jahre 2004 vielversprechend. Das *DLG5*-Transkriptionsprodukt gehört zur Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinase (MAGUK). MAGUK-Proteine sind als Komponenten des Zytoskelettes an der Bildung großer Proteinkomplexe beteiligt. Ihnen wird neben der Signalübertragung an Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle beim Erhalt der epithelialen Zellintegrität zugesprochen.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir 391 CED-Patienten hinsichtlich der wichtigsten *DLG5*-Varianten. Wir konnten die als erste im Jahre 2004 beschriebene Assoziation zwischen den drei *DLG5*-Varianten R30Q, P1371Q und *DLG5_e26* mit CED nicht replizieren. Eine andere, bisher kaum untersuchte Variante, rs2289308, zeigte sich signifikant erhöht in unserer Colitis Ulcerosa-Patientenkohorte. Mit der Interpretation dieses Resultats sind wir jedoch zurückhaltend, da weitere Studien zu dieser Variante fehlen. In Zusammenschau der Befunde gehen wir nicht davon aus, dass Varianten im *DLG5*-Gen einen entscheidenden Einfluss auf das Auftreten CED haben.

Als eine der ersten Forschungsarbeiten erstellten wir ein genaues phänotypisches Bild unserer Patienten, um es mit *DLG5*-Varianten zu korrelieren. Unserer Hypothese ist eine Verknüpfung der *DLG5*-Varianten an klinische Subtypen der Erkrankung auf der Grundlage unterschiedlicher molekulargenetischen Ursachen der verschiedenen Ausprägungsformen von CED. Dies wäre ein Erklärungsansatz für die kontroverse Studienlage, da bisher das klinische Erscheinungsbild wie z.B. Befallsmuster, Krankheitsverhalten, Operationen und Therapieansprechen nicht ausreichend berücksichtigt wurden. Unsere Arbeit liefert Hinweise für einen erschwerten Krankheitsverlauf bei Vorliegen eines R30Q-Polymorphismus bei Colitis Ulcerosa. Obwohl wir den initial von Stoll und Kollegen berichteten protektiven Einfluss der *DLG5_e26*-Variante bezogen auf das Auftreten CED nicht replizieren konnten, zeigte sich in unserer Morbus Crohn-Kohorte ein signifikant milderer Krankheitsverlauf bei

Trägern der rs2289308- und DLG5_e26 bzw. D1507D-Varianten. Diese Tendenzen müssen in zukünftigen, großangelegten Studien untersucht werden, um eine klare Aussage über den Einfluss der einzelnen Mutationen auf den Krankheitsverlauf machen zu können.

Es ist inzwischen allgemein anerkannt, dass Mutationen im *NOD2*-Gen zu einem erhöhten Morbus Crohn-Risiko beitragen. Wir prüften bei unseren Morbus Crohn-Patienten Interaktionen zwischen *DLG5* und *NOD2* unter der Annahme, dass das Vorliegen einer kombinierten Mutation zu einer Potenzierung des Morbus Crohn-Risikos führt. Die Ergebnisse liefern jedoch keinen Anhalt für unsere Hypothese. Die *DLG5*-Mutationshäufigkeit unterschied sich nicht zwischen Morbus Crohn-Patienten mit *NOD2*-Risiko von denen ohne *NOD2*-Risiko.

Mit zunehmenden Erkenntnissen über mögliche genetische Ursachen für die Entstehung CED richtete sich das Augenmerk der Forscher auf die komplexen, biologischen Prozesse hinter dieser bisher nicht vollständig verstandenen Erkrankung. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die gastrointestinale Permeabilität dabei eine Schlüsselrolle spielt. Obwohl das *DLG5*-kodierende Protein maßgeblich für die epitheliale Integrität verantwortlich ist, konnte in dieser Arbeit unsere Hypothese, dass die bei Morbus Crohn-Patienten beobachtete gesteigerte gastrointestinale Permeabilität durch *DLG5*-Veränderungen mit verursacht wird, nicht bestätigt werden. Welche Gene sich hinter der gestörten Barrierefunktion verbergen bleibt offen.

Die im Jahr 2004 beschriebene Assoziation *DLG5* mit CED ging mit viel Hoffnung einher, wobei die Studienergebnisse der letzten 6 Jahren keinen eindeutigen Schluss bzw. keine Assoziation zu CED zulassen. Die Datenlage ist heterogen und es wird bis heute über die Ursache der divergierenden Ergebnisse diskutiert wie auch über die Gültigkeit von *DLG5* als CED-Suszeptibilitätsgen. In Anbetracht der Ergebnisse unserer Studie gehen wir nicht davon aus, dass *DLG5* eine wichtige Rolle für die Entstehung CED spielt.

Dank molekulargenetischer Fortschritte konnten in den letzten Jahren zahlreiche neue Risikoloci identifiziert werden. Ideal wäre es bereits bei Diagnosestellung eine möglichst genaue Einschätzung des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens mittels Genotypisierung, um einen individuell abgestimmten Therapieplan einleiten zu können. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt reichen die Kenntnisse noch nicht aus, um die

Genotypisierung in den klinischen Alltag von CED-Patienten mit einzubinden und dadurch einen Benefit für den Patienten zu erreichen.

7. Literaturverzeichnis

1. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. "NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?" *Genes Immun.* 2004; 5(5):417-25.
2. Bairead E, Harmon DL, Curtis AM, et al. "Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogenous Irish population." *Eur J Hum Genet.* 2003; 11(3):237-44.
3. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. "Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease." *Nat Genet.* 2008; 40(8):955-62.
4. Biank V, Friedrichs F, Babusukumar U, et al. "DLG5 R30Q variant is a female-specific protective factor in pediatric onset Crohn's disease." *Am J Gastroenterol.* 2007; 102(2):391-8.
5. Binder V. "Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease." *Dig Dis.* 1998; 16(6):351-5.
6. 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.* 2007; 13(9):1069-76.
7. Browning BL, Annesse V, Barclay ML, et al. "Gender-stratified analysis of DLG5 R30Q in 4707 patients with Crohn disease and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts." *J Med Genet.* 2008; 45(1):36-42.
8. Boyko EJ, Koepsell TD, Perera DR, et al. "Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers" *N Engl J Med.* 1987; 316(12):707-10.
9. Buhner S, Buning C, Genschel J, et al. "Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of NOD2 3020insC mutation?" *Gut.* 2006; 55(3):342-7.
10. Büning C, Genschel J, Bühner S, et al. "Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation." *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 19(10):1073-8.
11. Calkins BM, Mendeloff AI, et al. "Epidemiology of inflammatory bowel disease." *Epidemiol Rev.* 1986; 8:60-91.

12. 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.* 2003; 11(1):6-16.
13. Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, et al. "Role of NOD2, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases." *World J Gastroenterol.* 2007; 13(8):1221-9.
14. Daly MJ, Pearce AV, Farwell L, et al. "Association of DLG5 R30Q variant with inflammatory bowel disease." *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(7):835-9.
15. Davey MP, Martin TM, Planck SR, et al. "Human endothelial cells express NOD2/CARD15 and increase IL-6 secretion in response to muramyl dipeptide." *Microvasc Res.* 2006; 71(2):103-7.
16. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, et al. "Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis." *Am J Gastroenterol.* 2004; 99(12):2393-404.
17. Ferraris A, Torres B, Knafelz D, et al. "Relationship between NOD2, SLC22A4/5, and DLG5 polymorphisms and early-onset inflammatory bowel diseases: an Italian multicentric study." *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12(5):355-61.
18. Friedrichs F, Brescianini S, Annese V, et al. "Evidence of transmission ratio distortion of DLG5 R30Q variant in general and implication of an association with Crohn disease in men." *Hum Genet.* 2006; 119(3):305-11.
19. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, et al. "Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists." *Eur J Immunol.* 2005; 35(8):2459-70.
20. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, et al. "Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population." *World J Gastroenterol.* 2005; 11(5):681-5.
21. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." *J Biol Chem.* 2003; 278(11):8869-72.
22. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, et al. "Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis." *FASEB J.* 2000; 14(12):1749-53.

23. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, et al. "A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort." *Am J Hum Genet.* 1999; 64(3):808-16.
24. Heliö T, Halme L, Lappalainen M, et al. "CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease." *Gut.* 2003; 52(4):558-62.
25. Hollander D. "Permeability in Crohn's disease: altered barrier functions in healthy relatives?" *Gastroenterology.* 1993; 104(6):1848-51
26. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." *Nature.* 2001; 411(6837):599-603.
27. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. "Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16." *Nature.* 1996; 379(6568):821-3.
28. Humbert P, Russell S, Richardson H, et al. "Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer." *Bioessays.* 2003; 25(6):542-53.
29. 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.* 2003; 278(8):5509-12.
30. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. "Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease." *Gastroenterology.* 2002; 123(1):86-91.
31. Irvine EJ, Marshall JK. "Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk." *Gastroenterology.* 2000; 119(6):1740-4.
32. Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA, et al. "The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption." *Novartis Found Symp.* 2004; 263:115-24; discussion 124-32, 211-8.
33. Jess T, Gomborg M, Matzen P, et al. "Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies." *Am J Gastroenterol.* 2005; 100: 2724-2729.
34. Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, et al. "Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives." *Gastroenterology.* 1989; 97(4):927-31.

35. Kugathasan S, Loizides A, Babusukumar U, et al. "Comparative phenotypic and CARD15 mutational analysis among African American, Hispanic, and White children with Crohn's disease" *Inflamm Bowel Dis*. 2005; 11(7):631-8.
36. Lakatos PL, Fischer S, Claes K, et al. "DLG5 R30Q is not associated with IBD in Hungarian IBD patients but predicts clinical response to steroids in Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12(5):362-8.
37. Lala S, Ogura Y, Osborne C, et al. "Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells." *Gastroenterology*. 2003; 125(1):47-57.
38. Lesage S, Zouali H, Cézard JP, et al. "CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease." *Am J Hum Genet*. 2002; 70(4):845-57.
39. May GR, Sutherland LR, Meddings JB, et al. "Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease?" *Gastroenterology* 1993. 104:1627–1632.
40. Mayberry JF, Judd D, Smart H, et al. "Crohn's disease in Jewish people--an epidemiological study in south-east Wales." *Digestion*. 1986;35(4):237-40.
41. Medici V, Mascheretti S, Croucher PJ, et al. "Extreme heterogeneity in NOD2 and DLG5 Crohn disease-associated polymorphisms between German and Norwegian populations." *Eur J Hum Genet*. 2006; 14(4):459-68.
42. Muise AM, Walters TD, Glowacka WK, et al. "Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease." *Gut*. 2009; 58(8):1121-7.
43. Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, et al. "Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55" *FEBS Lett*. 1998; 433(1-2):63-7.
44. Neufert C, Pickert G, Zheng Y, et al. "Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis." *Cell Cycle*. 2010; 9(4):652-5.
45. Newman WG, Gu X, Wintle RF, et al. "DLG5 variants contribute to Crohn disease risk in a Canadian population." *Hum Mutat*. 2006; 27(4):353-8.
46. Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, et al. "DLG5 variants do not influence susceptibility to inflammatory bowel disease in the Scottish population." *Gut*. 2005; 54(10):1416-20.
47. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." *Nature*. 2003; 411(6837):603-6.

48. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al. "Familial occurrence of inflammatory bowel disease." *N Engl J Med*. 1991; 324(2):84-8.
49. Orholm M, Binder V, Sørensen TI, et al. "Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study." *Scand J Gastroenterol*. 2000; 35(10):1075-81.
50. Pearce AV, Fisher SA, Prescott NJ, et al. "Investigation of association of the DLG5 gene with phenotypes of inflammatory bowel disease in the British population." *Int J Colorectal Dis*. 2007; 22(4):419-24.
51. Peeters M, Cortot A, Vermeire S, et al. "Familial and sporadic inflammatory bowel disease: different entities?" *Inflamm Bowel Dis*. 2000; 6(4):314-20.
52. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. "Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease." *Nat Genet*. 2004; 36(5):471-5.
53. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. "STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing." *J Exp Med*. 2009; 206(7):1465-72.
54. Reinhard C, Rioux JD. "Role of the IBD5 susceptibility locus in the inflammatory bowel diseases." *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12(3):227-38.
55. 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.
56. Shah G, Brugada R, Gonzalez O, et al. "The cloning, genomic organization and tissue expression profile of the human DLG5 gene." *BMC Genomics*. 2002;3(1):6.
57. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, et al. "Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease." *Nat Genet*. 2004; 36(5):476-80.
58. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. "Mucosal flora in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology*. 2002; 122(1):44-54.
59. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, et al. "Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study." *BMJ*. 1996; 312(7023):95-6.
60. Todate A, Suda T, Kuwata H, et al. "Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells." *J Leukoc Biol*. 2001; 70(5):723-9.
61. Török HP, Glas J, Tonenchi L, et al. "Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease." *Gut*. 2005; 54(10):1421-7.

62. Tremelling M, Waller S, Bredin F, et al. "Genetic variants in TNF-alpha but not DLG5 are associated with inflammatory bowel disease in a large United Kingdom cohort." *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(3):178-84.
63. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, et al. "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.* 1988; 29(7):990-6.
64. Vermeire S, Pierik M, Hlavaty T, et al. "Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD." *Gastroenterology.* 2005; 129(6):1845-53.
65. Vermeire S, Rutgeerts P. "Current status of genetics research in inflammatory bowel disease." *Genes Immun.* 2005; 6(8):637-45. Review.
66. Vidal V, Dewulf J, Bahr GM, et al. "Enhanced maturation and functional capacity of monocyte-derived immature dendritic cells by the synthetic immunomodulator Murabutide." *Immunology.* 2001; 103(4):479-87.
67. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, et al. "NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2." *J Biol Chem.* 2006; 281(4):2005-11.
68. Wakabayashi M, Ito T, Mitsushima M, et al. "Interaction of Ip-dlg/KIAA0583, a membrane-associated guanylate kinase family protein, with vinexin and beta-catenin at sites of cell-cell contact." *J Biol Chem.* 2003; 278(24):21709-14.
69. Weersma RK, Stokkers PC, van Bodegraven AA, et al. "Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort." *Gut.* 2009; 58(3):388-95.
70. Wyatt J, Vogelsang H, Hübl W, et al. "Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease." *Lancet.* 1993; 341(8858):1437-9.
71. Yamazaki K, Takazoe M, et al. "Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease." *J Hum Genet.* 2004; 49(12):664-8.
72. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, et al. "Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease." *J Hum Genet.* 2002; 47(9):469-72.
73. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, et al. "Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease." *Gut.* 2007; 56(1):61-7

8. Anhang

8.1. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.2. Selbständigkeitserklärung

Ich, Ghyslaine Sastre Ortegon, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Varianten im *DLG5*-Gen und deren Einfluss auf Entstehung und Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 26.04.2011

Ghyslaine Sastre Ortegon

8.3. Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Carsten Büning für die langjährige Betreuung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich Frau Dr. Janine Büttner für die Hilfestellung meinen Dank aussprechen. Ich danke weiterhin meiner Familie und meinen Freunden insbesondere Carlos Sastre Ortegon, Barbara Grond, Isabelle Pitre, Winfried Kranz, Alice v. Samson-Himmelstjerna, Karla Wieland, Annelie Neuhoff, Maria Vehreschild, Katrin Gehr-Zemojtel, Christoph Schmidt sowie Funda und Pablo Villavicencio Lorini ohne deren Unterstützung diese Arbeit heute nicht vollendet wäre.