

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hepatologie und  
Gastroenterologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Assoziationsstudien von Varianten des  
*ATG16L1*- und *Myosin IXb*-Gens bei Patienten mit  
chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tahir Durmus  
aus Berlin

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. H. Witt  
                             2. Priv.-Doz. Dr. med. B. Siegmund  
                             3. Prof. Dr. med. M. Zenker

Datum der Promotion: 08.04.2011

**Widmung**  
Meinen Eltern.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1 Chronisch Entzündliche Darmerkrankung .....	8
1.1.1 Allgemeine Aspekte .....	8
1.1.2 Epidemiologie der CED .....	8
1.1.3 Klinik, Pathologie und Verlauf .....	9
1.1.4 Klassifikation der CED .....	13
1.1.5 Ätiologie und Pathogenese der CED .....	14
1.1.6 Assoziierte Genmutationen .....	15
1.1.7 Fragestellung .....	23
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Patienten und Kontrollen .....	24
2.1.1 Rekrutierung .....	24
2.1.2 Klinische Daten der CED-Patienten .....	25
2.2 Materialien .....	26
2.2.1 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.2.2 Chemikalien und Reagenzien .....	26
2.2.3 Enzyme und zugehörige Puffer .....	26
2.2.4 Primer und Sonden .....	26
2.2.5 Geräte .....	27
2.3 Methoden .....	27
2.3.1 DNA Extraktion .....	27
2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	28
2.3.3 Genotypisierung des <i>rs2241880</i> im <i>ATG16L1</i> .....	29
2.3.4 Genotypisierung der <i>MYO9B</i> -Varianten .....	29
2.3.5 Stratifikation mit <i>CARD15</i> -Varianten .....	30
2.3.6 Schmelzkurvenanalyse anhand von FRET-Proben .....	30
2.3.7 Bestimmung der intestinalen Permeabilität .....	34
2.3.8 Statistische Analyse .....	35
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Charakterisierung der Studienpopulationen .....	36
3.1.1 Demographische und klinische Daten der Studienpopulationen .....	36

3.2 Allelfrequenzverteilungen der untersuchten genetischen Varianten .....	39
3.2.1 Verteilung der c.898A>G-Genotypen im <i>ATG16L1</i> bei CED-Patienten und Kontrollen .....	39
3.2.2 Stratifikation des <i>ATG16L1</i> -Genotyps aller Morbus Crohn Patienten auf den <i>CARD15</i> -Status .....	41
3.2.3 Allelfrequenzverteilung der <i>Myosin IXb</i> -Varianten bei CED-Patienten und Kontrollen .....	43
3.3 Genotyp-Phänotyp Korrelationen .....	46
3.3.1 Effekt der <i>ATG16L1</i> c.898A>G-Variante auf den klinischen Verlauf von MC und CU .....	46
3.3.2 Effekt der untersuchten <i>MYO9B</i> -Varianten auf den klinischen Verlauf der CED .....	46
3.3.3 Effekt der <i>MYO9B</i> -Varianten auf die intestinale Permeabilität bei MC .....	47
3.3.4 Effekt des <i>ATG16L1</i> -Status auf die intestinale Permeabilität bei MC .....	48
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1 <i>ATG16L1</i> .....	49
4.1.1 <i>ATG16L1</i> und Morbus Crohn .....	49
4.1.2 <i>ATG16L1</i> und Colitis Ulcerosa .....	51
4.1.3 <i>ATG16L1</i> ( <i>rs2241880</i> ) – pathogenetische Implikationen eines unabhängigen Risikofaktors für die CED .....	52
4.2 <i>Myosin IXb</i> .....	54
4.2.1 <i>Myosin IXb</i> und Morbus Crohn .....	54
4.2.2 <i>Myosin IXb</i> und Colitis Ulcerosa .....	57
4.2.3 <i>Myosin IXb</i> – Aktuelle Datenlage in der Literatur .....	58
4.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen .....	59
4.3.1 <i>ATG16L1</i> .....	59
4.3.2 <i>Myosin IXb</i> .....	60
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>72</b>
<b>8 Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>73</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	<b>74</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATG16L1	Autophagy 16-like 1
C	Cytosin
CARD15	Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 15
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung(en)
CU	Colitis ulcerosa
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
FL	Fluoreszein
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
fw	Forward
G	Guanin
GIT	Gastrointestinaltrakt
IL	Interleukin
IL23R	Interleukin 23 Rezeptor
LNA	Locked Nucleic Acid
LPS	Lipopolysacharide
MAF	Minor Allele Frequency

MC	Morbus Crohn
MYO9B	Myosin 9b
N	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOD2	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Protein 2
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
Rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minnute)
Rv	reverse
SA	Standardabweichung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
TGFb1	Transforming Growth Factor beta 1
Var	Variante mit niedrigerer Frequenz
Wt	Wildtyp (häufiger vorkommendes Allel)

# **1 Einleitung**

## **1.1 Chronisch Entzündliche Darmerkrankung**

### **1.1.1 Allgemeine Aspekte**

Der Begriff chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED) fasst histopathologisch verschiedene Entzündungsreaktionen des Gastrointestinaltrakts zusammen, welche sich initial oft klinisch ähnlich äußern. Die CED beginnt häufig mit rezidivierendem oder anhaltendem Durchfall, Bauchschmerzen und Abgeschlagenheit. Die häufigsten Vertreter der CED sind der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU). Die kollagene und lymphozytäre Colitis, die typischerweise koloskopisch unauffällig erscheinen, jedoch histologisch typische Befunde liefern, werden auch mikroskopische Colitiden genannt. Allen verbesserten diagnostischen Möglichkeiten zum Trotz bleiben 10-15% der chronisch verlaufenden Colitiden unklar und können bei Diagnosestellung innerhalb der CED nicht als Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa spezifiziert werden, weshalb diese Formen als Colitis indeterminata bezeichnet werden. Die meisten dieser Fälle können erst im weiteren klinischen Verlauf als Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa eingeordnet werden [1]. Sowohl der Morbus Crohn als auch die Colitis ulcerosa weisen bereits charakteristische Befunde in der Koloskopie oder in den verschiedenen radiologischen Verfahren auf. Im Folgenden soll auf diese beiden häufigsten Formen der CED weiter eingegangen werden.

### **1.1.2 Epidemiologie der CED**

Die meisten Patienten mit einer CED erkranken zwischen dem 20. und 35. Lebensjahr. Ein zweiter Häufigkeitsgipfel der CED ist um das 60. Lebensjahr zu beobachten [2, 3]. Die Inzidenzraten für CED variieren in den prospektiv angelegten europäischen Studien für MC von 1,7 - 16,5 / 100.000 und für CU zwischen 1,4 - 8,6 / 100.000 [4]. Sowohl in Europa als auch in Nordamerika zeigt sich in der Tendenz ein Nord-Süd-Gefälle der Inzidenz der CED. Darüber hinaus ist die Häufigkeit der Erkrankung abhängig von der Ethnie. Unabhängig von der geographischen Variabilität, lässt sich nämlich festhalten, dass Menschen jüdischen Ursprungs in der Regel höhere Inzidenzraten aufweisen als Weiße



anderen Ursprungs, die wiederum häufiger betroffen sind als schwarze Menschen [5]. Allgemein lässt sich daher aussagen, dass Menschen mit einer hellen Hautfarbe, insbesondere in den westlichen Industrienationen, häufiger an einer CED erkranken als Menschen mit schwarzer Hautfarbe. Interessanterweise lässt sich auch eine Dynamik hierin beschreiben, insofern als die Inzidenz der CED in den westlichen Industrienationen während des letzten Jahrhunderts stetig zunahm und aktuell offenbar ein Plateau erreicht. Im Vergleich dazu kann weiterhin eine steigende Inzidenz in den sich entwickelnden Ländern beobachtet werden [3, 6, 7]. Allerdings sind qualitativ hochwertige epidemiologische Daten aus den sich entwickelnden Ländern rar, sodass nach wie vor eine rege Diskussion um die Interpretation der epidemiologischen Daten geführt wird [4, 6]. So ist zum Beispiel die CED in den hoch industrialisierten asiatischen Länder wie Japan oder Korea weniger häufig als in den westlichen Industrienationen, sodass nicht allein der Entwicklungsstand, sondern möglicherweise auch die Anpassung an einen westlichen Lebensstil die Inzidenzraten beeinflusst [5, 8]. Zusammenfassend zeigen die epidemiologischen Daten die erhebliche klinische Signifikanz der Erkrankung, ihre offensichtliche Abhängigkeit von Umweltfaktoren, aber auch eine genetische Suszeptibilität.

Im Folgenden sollen nach Erläuterung der klinischen Charakteristika die ätiologischen Gesichtspunkte der CED beleuchtet werden.

### **1.1.3 Klinik, Pathologie und Verlauf**

Der Begriff chronisch-entzündliche-Darmerkrankung spiegelt bereits mehrere Merkmale der in ihr zusammengefassten Krankheitsentitäten wider. Das primäre Substrat der CED ist der Gastrointestinaltrakt, wobei im Verlauf der Erkrankung auch extraintestinale Manifestationen auftreten können.

Der Morbus Crohn kann im Unterschied zur CU den gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT) betreffen. Ein weiterer auch zum Verständnis dieser Erkrankungsentitäten wichtiger Unterschied zur CU besteht darin, dass der inflammatorische Prozess im Rahmen des MC die gesamte gastrointestinale Wand betrifft, während sich die CU nur auf Stratum mucosae und submucosae beschränkt. Im Gegensatz zur CU, die lediglich lumenseitig aktiv ist, führt der chronische Entzündungsprozess der gesamten Darmwand beim MC meist

zu fibrotisch-stenosierenden oder infiltrierend-fistelnden Läsionen. Diese Veränderungen stellen sich typischerweise in histologischen Präparaten, aber auch in radiologischen Verfahren bildgebend dar. In der akut entzündeten Darmwand sind eine Hyperperfusion und die ödematöse Schwellung bereits makroskopisch erkennbar. Histologisch ist eine erhöhte Anzahl von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten im entzündeten Darmgewebe zu finden. Vor allem bei der CU ist eine Rarefizierung der Becherzellen ein häufiger Befund. Typisch für den Morbus Crohn ist die Ausbildung von Granulomen, welche oft zentral nekrotisierend sein können, während bei der Colitis Ulcerosa die Ausbildung von Kryptenabszessen im Vordergrund steht.

Erwachsene Patienten leiden meist unter schleimigen oder blutigen Durchfällen. Fieber, abdominale Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen sowie Gewichtsabnahme bis hin zur Anorexie. Paraklinisch sind in akuten Schüben eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins, eine erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, eine Leuko- sowie eine Thrombozytose festzustellen, während Blutungen zu einer Anämie führen können.

Obwohl der MC diskontinuierlich sich im gesamten GIT manifestieren kann, ist meist primär das terminale Ileum betroffen, weshalb die Erkrankung auch als Ileitis terminalis bezeichnet wurde. Die Entzündung des terminalen Ileum kann jedoch – wenn auch viel seltener – bei der CU als eine „Backwash Ileitis“ auftreten – also eine Ausbreitung der Inflammation aus entzündeten Colonabschnitten über die Bauhin'sche Klappe hinweg ins terminale Ileum. In der Regel beschränkt sich bei der CU die Entzündungsreaktion lediglich auf das Colon und breitet sich im Gegensatz zu MC kontinuierlich von anal nach oral aus. Nichtsdestotrotz ist in selteneren Fällen auch bei der CU ein diskontinuierlicher Befall des Colons gegeben (wie z.B. bei einer Backwash Ileitis). Bei dem Befall von Jejunum und proximalen Anteilen des Ileums können Malabsorptionssymptome im Vordergrund stehen. Die Malabsorption und die daraus folgende Gedeihstörung ist der wichtigste klinische Hinweis für eine CED im Kindesalter.

Auch Symptome des Harntrakts können zunächst die eigentliche Ursache im GIT maskieren, da die entzündlich bedingte Darmwandverdickung, ödematöse Mesenterialreaktion und Lymphknotenvergrößerungen die Ureteren obstruieren oder reaktiv eine entzündliche Mitreaktion der Harnblase mit Dysurie hervorrufen können. Postprandiale Schmerzen können auf der einen Seite in den frühen Stadien durch den obstruierenden

Effekt der entzündlichen Darmwandverdickungen und Spasmen begründet sein, und auf der anderen Seite durch einen chronischen Entzündungsprozess und den konsekutiven fibrotischen Stenosen vor allem beim MC erklärt werden. Weitere wichtige Komplikationen des MC sind Fistelbildungen und Darmwandperforationen. Die rezidivierende und schwere inflammatorische Reaktion der Ileozökalregion kann im Verlauf eine lokalisierte Atrophie der Darmwand bedingen. Aufgrund dieser Ausdünnung der Darmwand treten gehäuft Mikroperforationen auf, die zunächst Adhäsionen und im Verlauf Fisteln in praktisch alle Nachbarstrukturen bilden können. So können erhöhte Entzündungswerte unklarer Genese auch durch Abszesshöhlen im Mesenterium bedingt sein, in die enterale Fisteln münden. Fisteln, die proximale Teile des Dünndarms betreffen, können eine Malabsorption verstärken oder hervorrufen, da zum einen die Passage des Chymus durch das übrige Ileum deutlich reduziert sein kann und außerdem eine unphysiologische bakterielle Besiedlung des Dünndarms auftreten kann. Über 30% der Patienten mit MC entwickeln eine perianale Beteiligung, die durch Inkontinenz, Hämorrhoidalleiden, analen Strikturen, anorektalen Fisteln und perirektalen Abszessen symptomatisch werden kann. Vor allem Strikturen und Fistelgänge erfordern häufig eine chirurgische Intervention.

Bei extremen Verlaufsformen der CU, die klinisch mit akuten abdominalen Schmerzen und schweren Blutungen einhergehen, kann es sich differentialdiagnostisch um die toxische Colitis oder das toxische Megacolon handeln. Das „toxische Megacolon“ ist definiert durch eine Vergrößerung des Kalibers des Colon transversum auf über 7 cm, bei einem Verlust der Haustrierung und schweren Krankheitssymptomen. Ein akutes Abdomen und peritonitische Zeichen, die gerade unter der Therapie mit Glucocorticoiden klinisch auch mild ausfallen können, können auf eine lebensbedrohliche Darmperforation hindeuten, die eine chirurgische Intervention unumgänglich macht.

Abhängig von der Dauer der Erkrankung und von der Ausdehnung der Colitis steigt das Risiko einer malignen Entartung bei der CU, die daher im Gegensatz zum MC auch als Präkanzerose für das colorectale Karzinom angesehen wird.

In der folgenden Tabelle sind Unterscheidungsmerkmale von MC und CU gegenübergestellt.

<b>Differenzialdiagnose von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn</b>		
	<b>Colitis ulcerosa</b>	<b>Morbus Crohn</b>
<b>Epidemiologie</b>		
Geschlechterverhältnis (m : w)	1:1	2:1
Nikotin	protektiv	kann auslösen
genetische Komponente	ja, geringer als MC	ja
<b>Klinische Symptome</b>		
Hämatochezie	häufig	selten
Abgang von Blut und Schleim	häufig	selten
Dünndarmbefall	nein (außer bei „backwash ileitis“)	ja
Befall des oberen GI-Traktes	nein	ja
extraintestinale Manifestationen	häufig	häufig
Dünndarmileus	selten	häufig
Kolonobstruktion	selten	häufig
perianale Fisteln	nein	häufig
<b>Biochemisch</b>		
ANCA-positiv	häufig	selten
ASCA-positiv	selten	häufig
<b>Histopathologie</b>		
transmurale Entzündung der Mucosa	nein	ja
gestörte Kryptenarchitektur	ja	ungewöhnlich
Kryptitis und Kryptenabszesse	ja	ja
Granulome	nein	Ja
Fissuren o. sogenannte „skip lesions“	selten	häufig

**Tabelle 1:** Differenzialdiagnose der CED [9]

Beide Krankheitsentitäten können sich auch extraintestinal manifestieren. Dabei besteht die Hypothese, dass Antigene, die die Überreaktion des Immunsystems im GIT fördern, eine autoimmunologische Kreuzreaktion mit extraintestinalen Organsystemen hervorrufen [10]. Dermatologische Phänomene wie das Erythema nodosum oder die Pyoderma gangraenosum, hepatobiliäre Erkrankungen wie die primär-sklerosierende Cholangitis (PSC), okuläre Symptome, aber auch Arthralgien und Arthritiden seien hier stellvertretend genannt (Tabelle 2).

<b><u>Extraintestinale Manifestationen</u></b>	
<b>Muskuloskelettale Manifestationen</b>	periphere Arthritis Typ-1-Pauciartikuläre Arthritis Typ-2-Polyarthritis axiale Arthropathien Morbus Bechterew
<b>Dermatologische Manifestationen</b>	Pyoderma gangraenosum Erythema nodosum
<b>Okuläre Manifestationen</b>	anteriore/posteriore Uveitis Episkleritis/Skleritis
<b>Hepatobiliäre Manifestationen</b>	primär sklerosierende Cholangitis (PSC) Autoimmunhepatitis (AIH) Overlap-Syndrom/Autoimmuncholangitis

**Tabelle 2:** Extraintestinale Manifestationen bei CED [9, 10]

#### 1.1.4 Klassifikation der CED

Die Montreal-Klassifikation (2005) und die Wiener Klassifikation (1998) sind internationale Einigungen zur Einteilung, Beschreibung und Klassifikation der CED [11, 12]. Die Montreal-Klassifikation ist die jüngere Klassifikation, weist jedoch in ihrem Grundgerüst keine gravierenden Unterschiede zur Wiener Klassifikation auf. Die folgende Übersicht fasst die Montreal-Klassifikation zusammen.

<b>Diagnosealter</b>		<b>Krankheitsverhalten</b>		<b>Lokalisation</b>	
A1	< 16 Jahre	B1	Nicht B2 oder B3	L1	Terminales Ileum
A2	17 – 40 Jahre	B2	Strikturierend	L2	Colon
A3	>40 Jahre	B3	Penetrierend	L3	Ileocolon
		B3p	Perianal penetrierend	L4	Oberer GIT
				L4+	Distaler GIT

**Tabelle 3:** Morbus Crohn – Montreal Klassifikation

Intensität		Entzündungslokalisation	
S1 (leicht)	Bis 4 Stuhlgänge / Tag Paraklinik normal	E1	Proktitis
S2 (mittel- schwer)	4-6 blutige Stuhlgänge / Tag keine Zeichen der systemischen Beteiligung	E2	Linksseitencolitis
S3 (schwer)	> 6 blutige Stühle / Tag + Fieber, HF > 90/min, Hb < 10,5 g/dl oder BSG > 30 mm n.W.	E3	Pancolitis

**Tabelle 4:** Colitis ulcerosa – Montreal Klassifikation

### 1.1.5 Ätiologie und Pathogenese der CED

Eine Vielzahl genetischer Forschungsarbeiten legten in den letzten Jahren den Grundstein für ein besseres Verständnis der Ursachen und der Krankheitsmechanismen der CED [13].

Die derzeit gültige Hypothese zur Entstehung der CED geht von einer Dysregulation des mucosalen Immunsystems aus, die durch genetisch bestimmte Wirtseigenschaften, z.B. die Barrierefunktion des Mucosaepithels und auf der anderen Seite durch exogene Faktoren wie z.B. die Beschaffenheit der bakteriellen Darmflora, bedingt wird [14-16]. Es konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden, dass es sich bei der CED um eine durch bestimmte Bakterien verursachte Erkrankung handelt. Vielmehr wird als Auslöser eine chronische Überreaktion des mucosalen Immunsystems gegenüber der physiologischen Darmflora diskutiert. Inwieweit die entzündlichen Reaktionen auch durch autoimmunreaktive Prozesse begünstigt sind, ist nicht zur Gänze geklärt. Die Imbalance des mucosalen Immunsystems scheint dabei auf eine Störung der diffizilen Regulation des intestinalen Immunsystems zurück zu gehen, welches, in ständigem Kontakt mit luminalen, exogenen Antigenen, permanenter einer Art entzündlicher Aktivität unterliegt [17]. Beim Eindringen eines potenziell gefährlichen Agens reagieren diese Immunzellen physiologischerweise heftig und schnell, um jedoch ebenso schnell wieder in ihrer Funktion eingedämmt zu werden. Es ist daher anzunehmen, dass bei der CED diese Regulation gestört ist und eine chronisch-inflammatorische Reaktion, ohne ausreichende Inhibition

entsteht. Die Basis für diese Hypothesen wird zu einem wichtigen Teil aus Erkenntnissen über die genetischen Grundlagen der CED abgeleitet, die in den letzten Jahren durch die fortgeschrittenen molekularbiologischen Methoden ermöglicht wurden. Im Folgenden sollen die Genvarianten dargelegt werden, für die eine signifikante Assoziation mit der CED nachgewiesen werden konnte.

### 1.1.6 Assoziierte Genmutationen

Es ist bereits seit langem bekannt, dass die CED gehäuft bei Verwandten auftritt [18, 19]. Weiterhin ist in zahlreichen Zwillingsstudien gezeigt worden, dass Zwillinge überzufällig häufig an MC oder CU erkranken [20-24]. Während eine genetische Komponente anzunehmen war, wurden verantwortliche Genloci und Varianten erst in den letzten Jahren identifiziert. Im Lichte dieser Untersuchungen erscheint die CED als eine polygene Erkrankung, die unterschiedliche und offenbar genetisch beeinflusste Subgruppen aufweist. Genomweite Scan-Studien und Kandidatengenstudien konnten diesbezüglich bereits eine Reihe von Genloci auf verschiedenen Chromosomen identifizieren, die mit der CU und dem MC oder nur einer der beiden Erkrankungen assoziiert sind. Diese Genloci werden daher als Inflammatory Bowel Disease - n (IBD - n) bezeichnet - Tabelle 5 zeigt die ersten IBD-Gene.

	<b>Chromosom</b>	<b>Gen</b>	<b>Assoziation</b>	<b>Referenz</b>
<b><i>IBD1</i></b>	16q12	<i>NOD2/CARD15</i>	MC	[25-27]
<b><i>IBD2</i></b>	12p13.2-q24.1	-	MC, UC	[28, 29]
<b><i>IBD3</i></b>	6p21.3	MHC, TNF	MC, UC	[30-32]
<b><i>IBD4</i></b>	14q11-q12	-	MC	[33]
<b><i>IBD5</i></b>	5q31	<i>OCTN1/2</i>	MC	[27, 34]
<b><i>IBD6</i></b>	19p13	-	MC, CU	[34, 35]
<b><i>IBD7</i></b>	1p36	-	MC, CU	[36, 37]
<b><i>IBD8</i></b>	16p	-	MC	[38]
<b><i>IBD9</i></b>	3p26	-	MC	[39, 40]

**Tabelle 5:** Assoziierte Genloci und Gene aus OMIM (National Center for Biotechnology Information, Online Mendelian Inheritance in Man).

Gemeinsame genetische Assoziationen von MC und CU legen ähnliche zugrundeliegende Pathomechanismen nahe, während spezifische Assoziationen mit nur einer Untergruppe der CED eigenständige Mechanismen der Erkrankungsentität postulieren lassen. Die in der Tabelle 5 zusammengefassten Genloci konnten Hinweise auf die zugrundeliegenden Pathomechanismen geben. So kodiert *CARD15*, auch als *NOD2* bezeichnet, für einen intrazellulären Rezeptor, der in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und im intestinalen Epithel exprimiert wird. Insbesondere ist das Protein *CARD15* auch in Paneth-Zellen nachweisbar, die durch Produktion von Lysozymen, Peptidasen und Defensinen eine wichtige Rolle im angeborenen darmassoziierten Immunsystem besitzen. *CARD15* sowie weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie sind für die immunologische Erkennung grampositiver und -negativer Bakterien essentiell. Sie können Muramylpeptide binden, die ein wichtiger Bestandteil der bakteriellen Zellwand sind [41, 42]. *CARD15* erkennt dabei nicht nur bakterielle Peptide, sondern nimmt auch eine regulative Funktion in der intrazellulären Signalkaskade ein [43, 44]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Varianten im *CARD15*, die mit dem Auftreten eines MC assoziiert sind, im leucinreichen Anteil des C-Terminus des Proteins lokalisiert sind. Dieser Teil ist für die Bindung der bakteriellen Muramylpeptide verantwortlich, sodass Mutationen in dieser Region zu einem Funktionsverlust des *CARD15*-Rezeptors führen. In zahlreichen Arbeiten konnte eine signifikante Assoziation dieser *CARD15*-Varianten mit MC gezeigt werden [25, 26, 44, 45]. Die Identifizierung von *CARD15*-Varianten als Risikofaktor für den MC stärkte jene Hypothesen zur Entstehung der CED, die mit einer Wechselwirkung des Immunsystems und der bakteriellen Darmflora im Sinne einer Entzündungstriggerung argumentierten.

Interessanterweise wurde in Asien sowohl in chinesischen als auch in japanischen Kohorten keine Häufung von *CARD15*-Varianten bei MC-Patienten gefunden, sodass zumindest in diesen Populationen andere genetische Faktoren vorhanden sein müssen, die das genetische Risiko an einer CED zu erkranken bestimmen [46-48].

Es konnten zahlreiche *CARD15*-Veränderungen mit dem Auftreten eines MC assoziiert werden. Darunter stellt ein Insertionspolymorphismus im heterozygoten Zustand einen 2-



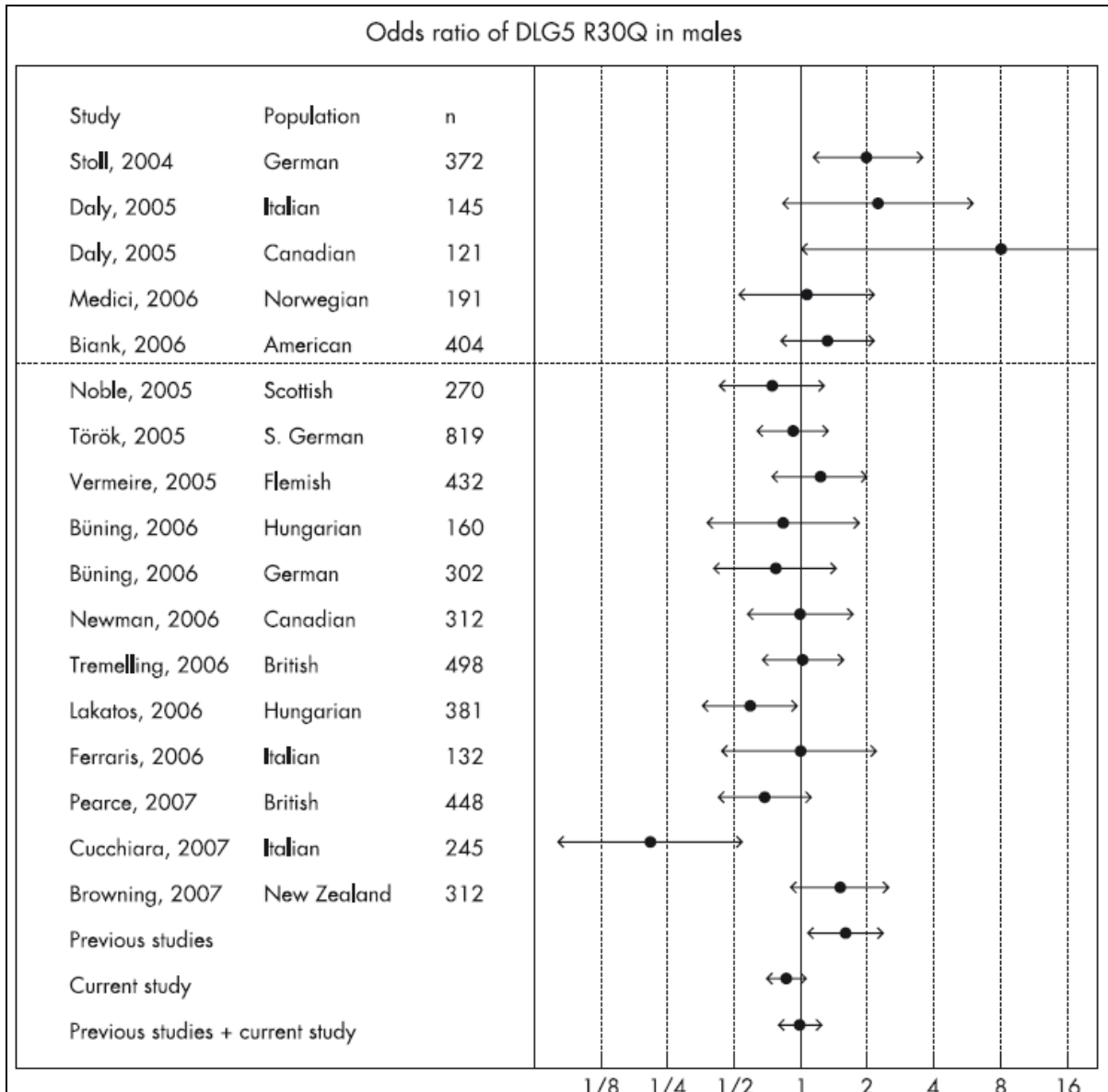
4-fachen Risikofaktor für das Auftreten eines MC dar, während homozygote Mutationen mit einem über 40-fach erhöhten Risiko einhergehen [49, 50]. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der *CARD15*-Insertionsvariante mit einem fibrostenosierenden Verlauf des MC korreliert [49, 50].

Duerr *et al.* beschrieben 2006, ausgehend von einer genomweiten Studie an 547 Patienten und 548 Kontrollen, eine Assoziation zwischen MC und einer Variante im *IL23R*-Gen (rs11209026, c.1142G>A), die einen Aminosäureaustausch, p.Arg381Gln (p.R381Q), zur Folge hat. Ungleich der bereits beschriebenen Assoziation wurde hierbei ein protektiver Effekt dieser Variante beschrieben, da signifikant mehr Kontrollen als Patienten diese Variante besaßen [51]. *IL23R* ist ein Baustein des *IL23*-Rezeptors, welcher durch die Assoziation von *IL23R* mit *IL12RB1* gebildet wird. Interleukin 23 (*IL23*) ist ein proinflammatorisches Cytokin, das zusammen mit TGF- $\beta$ 1 und Interleukin 6, die Entwicklung von Interleukin 17 sezernierenden T-Zellen fördert [52]. T-Zellen, die durch ihre *IL17*-Sekretion charakterisiert sind, wurden in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, sowie im Zusammenhang mit der immunologischen Reaktion auf bakterielle Infektionen bereits beschrieben [53, 54]. Daher würde die *IL23R*-Variante durch eine antinflammatorischen Wirkung den protektiven Effekt erklären können. In Tiermodellen konnte die essentielle Rolle von *IL23* an der Ausbildung der Colitis nachgewiesen und dadurch die Hypothese weiter gestützt werden [55, 56]. Es konnte gezeigt werden, dass *IL23* nicht nur durch die Beeinflussung der Interleukin 17 sezernierenden T-Zellen, sondern auch durch die Beeinflussung weiterer proinflammatorischer sowie immunsuppressiver Kaskaden seine proinflammatorische Aktivität entfaltet [57]. Die initial von Duerr *et al.* beschriebene *IL23R*-Variante konnte von mehreren unabhängigen Gruppen in ihrem protektiven Effekt in unterschiedlichen Populationen bestätigt werden [58-61]. Ein protektiver Effekt konnte in folgenden Studien auch für die Colitis ulcerosa gezeigt werden [59, 61, 62]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass keine Epistase zwischen der assoziierten *IL23R*-Variante und den bereits etablierten *CARD15*-Varianten besteht [62, 63].

Weiterhin wurden auch die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) in Zusammenhang mit der CED gebracht. So wurde von Franchimont *et al.* eine Assoziation von *TLR4*-Varianten mit MC und CU, und von Török *et al.* die Assoziation von *TLR9*-Varianten mit MC berichtet [64,

65]. TLR sind auf Immunzellen hoch exprimiert und sind essentiell für die Erkennung bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) sowie für die Initiierung einer Immunantwort. Franchimont *et al.* berichteten dabei von der Assoziation der nicht synonymen Variante im *TLR4* Asp299Gly mit MC und CU. Diese Variante führt zu einer schlechteren Erkennung bakterieller LPS, und damit zu einer höheren Suszeptibilität für Infektionen mit gramnegativen Bakterien. Damit wurde die These der Triggerung der CED durch bakterielle Infektionen unterstützt [64].

Viele Arbeiten, die initial eine Assoziation von genetischen Varianten mit der CED beschrieben, konnte in den folgenden Jahren jedoch nicht bestätigt werden. So wurde von Stoll *et al.* 2004 eine signifikante Assoziation einer nicht synonymen Varianten, p.Arg30Gln (p.R30Q, *rs1248696*) im *DLG5* (*Drosophila Discs Large Homolog 5*) mit dem MC beschrieben [66]. Dieses Ergebnis wurde in einer weiteren Arbeit an etwa 1000 CED-Patienten aus Italien und Kanada sowie 700 Kontrollen überprüft und bestätigt [67]. In weiteren unabhängigen, großen Populationen wurden diese Ergebnisse überprüft, konnten aber nicht repliziert werden [68, 69]. Ein Erklärungsversuch stellte die Arbeit von Friedrichs *et al.* aus derselben Arbeitsgruppe, die die initiale Assoziation beschrieben hatte, dar, als nach Geschlecht stratifizierte Populationen aus Deutschland, Kanada und Italien untersucht wurden. Hier wurde ein statistisch signifikanter Unterschied der Allelfrequenzverteilung der *DLG5*-Variante *rs1248696* bei Männern und Frauen beschrieben, wobei bei Männern eine Assoziation mit MC bestünde, dies jedoch auf Frauen nicht zuträfe [70]. In einer umfassenden Metaanalyse wurde 2008 jedoch gezeigt, dass auch dieser Zusammenhang durch die Arbeiten der folgenden Jahre aus unabhängigen Populationen nicht bestätigt werden konnte [71]. In der folgenden Tabelle sind dabei die in der Metaanalyse betrachteten Arbeiten zusammengefasst. Dabei ist die Odds Ratio für die Frequenz der *DLG5*-Varianten bei an MC erkrankten Männern gegenüber Kontrollen angegeben.



**Abbildung 1:** Odds Ratio für *DLG5 R30Q* Genotyp bei Männern mit MC gegenüber Kontrollen, Wert < 1 entspricht einer erniedrigten Frequenz bei MC erkrankten Männern; aus “Gender-stratified analysis of *DLG5 R30Q* in 4707 patients with Crohn disease and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts.” Browning *et al.* 2008. [71].

Vor kurzem wurde eine Assoziation von MC und einer Variante (*rs2241880*) im *ATG16L1*-Gen (autophagy-related 16-like 1), das auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (2q37.1) lokalisiert ist, von 2 unabhängigen Forschergruppen im Rahmen genomweiter Scans beschrieben [72, 73]. *rs2241880* liegt in der kodierenden Sequenz an Position 898 des *ATG16L1* und bedingt einen Adenin-Guanin-Austausch (c.898A>G)<sup>1</sup>, der auf Proteinebene zum Einbau eines Alanins anstatt eines Threonins (p.Thr300Ala) führt [72, 73].

*ATG16L1* ist ein wichtiger Bestandteil des Proteinkomplexes, der für die Autophagozytose zuständig ist [74]. Während die Phagozytose in erster Linie den Abbau extrazellulärer Proteine durch Makrophagen beschreibt, handelt es sich bei der Autophagozytose um den Hauptabbauweg intrazellulärer Proteine. Dabei werden Proteine und Zellorganellbestandteile in eine, aus einer Lipiddoppelschicht bestehenden Membran verpackt, das sogenannte Autophagosom. Dieses verschmilzt anschließend mit Lysosomen, die hydrolytische Enzyme und Phosphatasen zur Degradation des Proteininhalts enthalten. In den letzten Jahren zeigte sich zunehmend, dass das Autophagosom ähnlich wie auch das Ubiquitin-Proteasom-System, bakterielle Bestandteile zersetzt und damit eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation einnimmt [75]. Daher ist *ATG16L1* ein interessanter Kandidatengenen für CED Studien, da wie bereits oben beschrieben, dem intestinalen immunologischen Gleichgewicht in der Pathogenese der CED offenbar eine zentrale Rolle beigemessen werden kann.

Weiterhin ist eine erhöhte intestinale Permeabilität bei CED-Erkrankten sowie ihren Verwandten beschrieben [76]. Als Erklärungsmodell spielen dabei drei Faktoren eine bedeutende Rolle:

---

<sup>1</sup> Alle genetischen Veränderungen sind auf cDNA Ebene nummeriert und mit einem "c" vor der Nummer gekennzeichnet. Die Position +1 entspricht dem A des Translationsstartcodons ATG in der mRNA Referenzsequenz. Jeder Aminosäurenwechsel ist durch ein "p" gekennzeichnet

1) Es muss eine genetische Prädisposition des intestinalen bzw. mucosalen Immunsystems vorhanden sein, damit eine abnormale Interaktion mit intraluminale Antigenen entstehen kann.

2) das tatsächliche Vorhandensein intraluminale Antigenen und

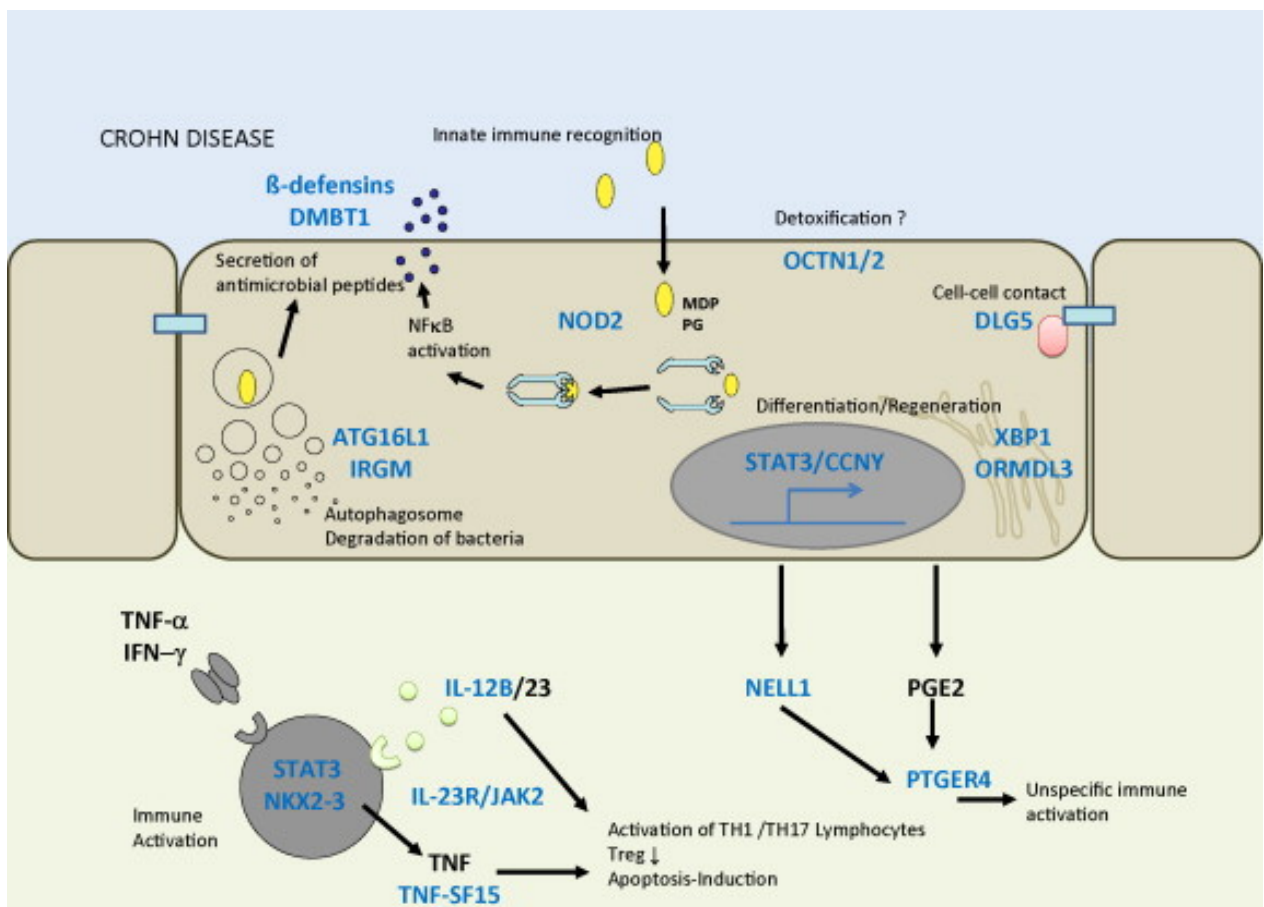
3) die Beschädigung bzw. die Aufhebung der intestinalen Barriere, sodass intraluminale Antigenen tatsächlich Kontakt mit dem intestinalen Immunsystems haben können [77, 78].

2005 wurde durch Monsuur *et al.* eine Assoziation des Myosin IXb-Gens (*MYO9B*) mit der Zöliakie beschrieben [8]. Die Zöliakie ist eine glutensensitive Enteropathie, die bei Aufnahme glutenhaltiger Lebensmittel zu einer chronischen Inflammation des Dünndarms führt. Als mögliches pathogenetisches Korrelat für die berichteten Polymorphismen im *Myosin IXb*-Gen wurde die Hypothese der Veränderung der intestinalen Permeabilität vorgeschlagen, da Myosin IXb offenbar in der Remodellierung des Zytoskeletts der Enterozyten mitwirkt [8]. Wie weiter oben bereits erwähnt, ist eine Assoziation der CED mit einem Locus (IBD 6) auf dem Chromosom 19p13 (Tabelle 5) durch Kopplungsanalysen bekannt gewesen [34, 35]. Daher lag es nahe zu überprüfen, ob Veränderungen im *MYO9B* mit CED assoziiert sind. Mehrere *MYO9B*-Varianten wurden von Boderg-raven *et al.* in niederländischen, britischen und kanadisch-italienischen Populationen untersucht. Tatsächlich wurde hierbei eine signifikante Assoziation der *MYO9B*-Varianten mit der CED gefunden [79]. Interessanterweise war dabei die Assoziation mit der CU noch stärker als beim MC. Es folgten jedoch sowohl Bestätigungen dieses Ergebnisses [80], als auch Untersuchungen, die keine Assoziation darstellen konnten [81].

Der Vergleich des relativen Risikos an einer CED zu erkranken, wenn Geschwister erkrankt sind, mit dem kumulativen Risiko, das durch die bereits beschriebenen Genloci (siehe Tabelle 5) erklärt werden kann, zeigt, dass lediglich 30% der erkrankten Geschwisterpaare durch die zur Zeit bekannten genetischen Variationen erklärt werden können [73]. Daher müssen weitere Gene existieren, die an der Pathogenese der CED beteiligt sind. Darüber hinaus müssen beschriebene Gene in verschiedenen unabhängigen Kohorten in unabhängigen Gruppen kontrolliert werden, um tatsächlich die erwähn-

ten vielversprechenden ersten Berichte über Assoziationen der CED wie z.B. mit *ATG16L1* oder *MYO9B* zu bestätigen oder zu widerlegen.

Durch molekularbiologischen Untersuchungen werden die erläuterten Genvarianten zunehmend in einen funktionellen Zusammenhang gebracht. Die Übersichtsarbeit von Rosenstiel et. liefert dabei die folgende Illustration, die die weiter oben einzeln erläuterten, mit der CED assoziierten Varianten in einem pathomechanistischen Zusammenhang darstellt [82].



**Abbildung 2:** aus, "Towards a molecular risk map – recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease" Rosenstiel *et al.* 2009 [82].

### 1.1.7 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, in einem großen europäischen Kollektiv von CED-Patienten die Frequenz der c.898G>A *ATG16L1*-Variante (*rs2241880*) zu ermitteln und mit der Frequenz in einem repräsentativen gesunden Kontrollkollektiv zu vergleichen. Der Nachweis der Variation erfolgte durch Schmelzkurvenanalysen der Amplifikate mittels FRET-Sonden (FRET: fluorescence resonance energy transfer) am LightCycler. Durch eine anschließende statistische Analyse sollte eine Aussage über die Assoziation der *ATG16L1*-Variante mit der CED getroffen werden. Falls die in den genomweiten Studien beschriebene Assoziation des *rs2241880* im *ATG16L1* in dieser Arbeit sich bestätigen ließe, sollten in denselben Populationen potentielle Gen-Gen-Interaktionen mit *CARD15* untersucht werden. Diese Arbeit stellt damit den ersten Bestätigungsversuch der durch Hampe *et al.* und Rioux *et al.* in genomweiten Ansätzen beschriebenen *ATG16L1* Assoziation mit der CED in einem unabhängigen und gezielten Kandidatengenanalyseverfahren an drei großen europäischen Kohorten dar.

Außerdem sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob *MYO9B*-Varianten mit der CED assoziiert sind. Die bisher publizierten teilweise widersprüchlichen Ergebnisse sollen dabei in drei großen und von den bisher untersuchten Populationen unabhängigen Kohorten aus Deutschland, Ungarn und den Niederlanden überprüft werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob tatsächlich Varianten im *Myosin IXb*-Gen die intestinale Permeabilität klinisch messbar beeinflussen, was als mögliches pathogenetisches Erklärungsmodell vorgeschlagen wurde. Es wurden daher 4 ausgewählte *MYO9B*-Varianten (*rs1545620* im Exon 20 [p.Ser1011Ala]; *rs1457092* im Intron 20; *rs2305764* im Intron 28; *rs2279002* im Intron 32) im Rahmen dieser Arbeit untersucht, von denen in anderen Populationen eine Assoziation mit der CED berichtet wurde.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Patienten und Kontrollen

#### 2.1.1 Rekrutierung

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Studie wurden von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Charité Berlin geprüft und genehmigt (EK-Vorgangsnr. 1834/Si. 258).

In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, bei denen ein MC oder eine CU durch klinische, endoskopische, radiologische und histologische Befunde diagnostiziert wurde. Die Diagnosekriterien waren dabei nach der Montreal-Klassifikation standardisiert [11].

Die Patienten wurden an drei verschiedenen europäischen Zentren rekrutiert: An der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Deutschland, an der Medizinischen Fakultät der Universität von Szeged, Ungarn, und am Medizinischen Zentrum der Radboud Universität in Nijmegen, Niederlande. Insgesamt wurden 910 Patienten, die an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung litten, rekrutiert. Zusätzlich wurden 707 gesunde Erwachsene untersucht. Jede DNA-Probe wurde auf das Vorhandensein der betreffenden Variation im *ATG16L1* (*rs2241880*) und auf vier Veränderungen im *Myosin IXb*-Gen (*rs1545620*, *rs1457092*, *rs2305764*, *rs2279002*) untersucht. Bei 614 Patienten wurde ein MC diagnostiziert, während 296 Patienten an einer CU litten. Es handelte sich bei allen Patienten und Kontrollen um Kaukasier. Im Einzelnen wurden 489 Patienten in der Charité (Campus Mitte und Campus Virchow) untersucht, von denen 310 an einem MC und 179 an einer CU erkrankt waren. An dem zweiten Standort der Studie in Szeged, Ungarn, wurden insgesamt 264 (147 MC und 117 CU) Patienten für die Studie gewonnen. Weitere 157 Patienten mit MC wurden am Medizinischen Zentrum der Radboud Universität in Nijmegen, Niederlande, rekrutiert.

Zusätzlich wurden als Vergleichskollektiv 707 gesunde Erwachsene (285 aus Deutschland, 207 aus Ungarn und 215 aus den Niederlanden) untersucht.



### **2.1.2 Klinische Daten der CED-Patienten**

Die klinischen Daten wurden retrospektiv aus den klinischen Akten erhoben. Aus Deutschland und Ungarn wurden folgende Daten der MC Patienten erhoben: Alter, Alter bei Diagnose, Geschlecht, familiäre oder spontane Krankheit (als familiäre Krankheit wurden solche Fälle eingestuft, bei denen mindestens ein Verwandter ersten oder zweiten Grades die Diagnose einer CED hatte), Rauchgewohnheiten (Raucher, Raucheranamnese oder nie geraucht), Lokalisation der Entzündung (nach der Montreal-Klassifikation), Befallsmuster, extraintestinale Manifestationen (periphere Arthralgien, Augen- und Hautbeteiligung, primär sklerosierende Cholangitis), chirurgische Interventionen unterschieden in Indikationen (Stenosen, Fistelungen) und Art (z.B. Ileozökalresektion, Dünn- oder Dickdarmresektion, mehrfache chirurgische Interventionen).

Geringfügig davon abweichend wurden folgende Daten von den Patienten aus Nijmegen dokumentiert: Alter, Alter bei Diagnose, Geschlecht, familiäre oder spontane Krankheit, Lokalisation der Entzündung, perianale Beteiligung und chirurgische Interventionen.

Für die CU wurden Alter bei Diagnose, Geschlecht, familiäre oder spontane Krankheit, Rauchgewohnheiten, Lokalisation der Krankheit (Proktitis, linksseitige Colitis), extraintestinale Manifestationen, Art und Datum der chirurgischen Interventionen und das Auftreten von colorektalen Karzinomen dokumentiert.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Verbrauchsmaterialien

DNA-Extraktionskit	QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden
Konische Polystyrolröhrchen	Falcon 15ml u. 50ml, Bexton Dickinson Labware
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 1,5ml, Eppendorf Hamburg Qiagen Collection Tubes 15ml, Qiagen, Hilden Tubes 4ml 75x11,5mm, Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Combitips plus 2,5ml u. 10ml, Eppendorf, Hamburg Eurotips 100µl u. 1000µl; Eppendorf, Hamburg Tips 10µl, 100µl, 1000µl, Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	96-well Format, Greiner
PCR-Reaktionsgefäße	PCR Tubes 0,2ml <i>Strips</i> a 8 Tubes u.Caps, Biozym Diagnostik
Parafilm	American National Can, Menaska, WI
Mikrotiterplatte	Nunc, Dänemark
LightCycler-Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Ethanol, absolut (100%)	Merck, Darmstadt
Steriles Wasser	Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen

### 2.2.3 Enzyme und zugehörige Puffer

Taq-Polymerase	5U/µl, AmpliTaq Go -Id, Perkin Elmer
PCR-Puffer	10x PCR buffer (+15mM MgCl <sub>2</sub> ), Perkin Elmer
dNTPs	dNTPs, je 2,5mM, Perkin Elmer

### 2.2.4 Primer und Sonden

PCR-Primer	10µM, TIB MOLBIOL, Berlin
FRET-Sonden	5µM, TIB MOLBIOL, Berlin

## 2.2.5 Geräte

Zentrifuge	Varifuge RF, Heraeus, Hanau Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschinen	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
Vortexer	Minishaker MS1, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, 28405, U.S.A
LightCycler	LightCycler II, Roche Diagnostics, Mannheim Light Cycler 480, Roche Diagnostics, Mannheim
Pipetten	Eppendorf Multipette plus, Hamburg Eppendorf Research Pipetten 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl, Eppendorf, Hamburg 3,5ml Transferpipette, Sarstedt, Nümbrecht Multichannel Finnpipette 5-50µl, Finnpipette 40-200µl; Thermo LabSystems
Kapillarzentrifuge	LC Carousel Centrifuge, Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler Software	Version 3.5, Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 DNA Extraktion

Genomische DNA wurde aus Leukozyten extrahiert. Zur DNA-Extraktion, der an unserem Zentrum gesammelten Patienten- und Kontrollproben wurde das "QIAamp DNA Mini Kit" nach Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dabei werden 200 µl Blut mit 20 µl Protease und Puffer AL in einem 2 ml Microcentrifuge Tube gut gemischt und für 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (100%) zugefügt. Die mit Ethanol gemischte Probe wurde auf eine Säule übertragen und eine Minute bei 8000 rpm (~ 6000 x g) zentrifugiert, sodass die Flüssigkeit von der DNA getrennt wurde. Nach diesem Schritt ist die DNA an der Säule gebunden. Die Säulen wurden mit Puffern gemäß den Herstellerangaben beladen und bei 8000 rpm eine Minute lang bzw. im letzten Schritt bei 14000 rpm (~20000 x g) drei Minuten lang zentrifugiert,

um die gebundene DNA zu waschen. Da DNA wasserlöslich ist, kann die gereinigte DNA im letzten Schritt aus der Säule unter Zugabe von Wasser herausgelöst werden. Dazu wurde die Säule mit 200 µl destilliertem Wasser beladen und das Röhrchen erneut bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Nutzung gelagert.

### 2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine sehr elegante und einfache Methode dar, um DNA *in vitro* zu vervielfältigen. Zur Vervielfältigung kleiner Abschnitte des Genoms werden zwei Primer ausgewählt, ein Vorwärtsprimer (fw) und einen Rückwärtsprimer (rv) für den komplementären DNA-Strang, die den zu replizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Bei einer Anzahl von etwa 20 Basenpaaren des Primers kann von einer spezifischen Bindung des Primers an den gewünschten DNA-Abschnitt im Genom ausgegangen werden. Da die DNA bei Raumtemperatur in einer Doppelhelixform vorliegt, wird in einem Temperaturzykler das Reaktionsgemisch bis auf annähernd 95°C erhitzt, sodass die DNA aufschmilzt und die Primer an die DNA-Stränge beim Abfallen der Temperatur binden können. Eine spezielle DNA-Polymerase, die auch bei hohen Temperaturen nicht denaturiert und damit funktionsfähig bleibt, baut frei im Reaktionsgemisch vorhandene Nukleotide (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) entlang der Ablesematrix als neuen Strang an. Dieser Zyklus wird so oft wiederholt bis der Ziel-DNA-Abschnitt in genügender Menge repliziert vorliegt und somit weiter untersucht werden kann.

In dieser Arbeit wurde folgendes PCR-Protokoll verwendet:

- 1,0 µl DNA-Lösung (20 ng/µl)
- 0,25 µl pro Primer(fw und rv) (10 µM)
- 0,15 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
- 1,0 µl 10 mM Desoxy-Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), „dNTP“
- 2,5 µl 10-fach konzentrierte PCR-Pufferlösung

- 17,0 µl H<sub>2</sub>O

### 2.3.3 Genotypisierung des *rs2241880* im *ATG16L1*

Die Primersequenzen für *rs2241880* im *ATG16L1*-Locus waren:

5'-ATTTgTCTTTATgTTATTTCTTAggAgACg- 3' (forward)

und

5'-TgCAggCCTAgAAAggACC- 3' (reverse).

Die PCR wurde in Eppendorf Tubes mit 0,5 - 1U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 400 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM forward Primer, 0.1 µM reverse Primer und 2µl genomischer DNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Reaktion durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler initial bei 95°C 12 min lang erhitzt und dann 40 Zyklen bei 95°C jeweils 20 s lang denaturiert. Die Annealingreaktion lief 40 s bei 56°C, die Elongation bei 72°C 90 s lang und der abschließende Extensionsschritt 2 min lang bei 72°C.

### 2.3.4 Genotypisierung der *MYO9B*-Varianten

Das PCR-Protokoll zur Genotypisierung für die *MYO9B*-Varianten ist analog zu dem obigen für die Genotypisierung des *ATG16L1*-Locus geschilderten Protokoll (2.7.3) mit dem einzigen Unterschied, dass die Annealingreaktion hier bei 60°C für 40 sek. durchgeführt wurde. Vor Durchführung der PCR wurden verschiedene Primervarianten auf ihre Tauglichkeit überprüft. Der Übersicht halber werden hier lediglich die endgültig verwendeten Primer in der folgenden Tabelle dargelegt. Dabei gibt die obere Sequenz die Basenpaarabfolge von 5` nach 3` Richtung des Vorwärtsprimers und die untere den Rückwärtsprimer wider:

<b>Exon 20 (rs1545620)</b>	5'-GCTGCCGTGTACCACCA-3'
	5'-CTTAGTGCCACAGGCCAGA-3'
<b>Intron 20 (rs1457092)</b>	5'-GGCATCCACCAGGCACA-3'
	5'-GGCAGGGGAGAGGTGAACA-3'
<b>Intron 28 (rs2305764)</b>	5'-GCCAACCTCCTCCTTGTTTC-3'
	5'-AGGGGTGACTTATTCAAGACTACTGC-3'
<b>Intron 32 (rs2279002)</b>	5'-GGGGTGCTGAAGCAGTG-3'
	5'-CCACCAACACGACCTGAGAT-3'

**Tabelle 6:** Primer für die Myosin IXb-Varianten

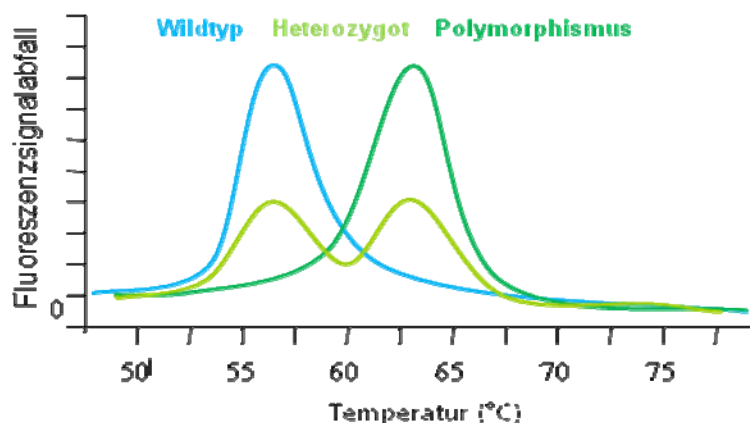
### 2.3.5 Stratifikation mit *CARD15*-Varianten

Die Genotypisierung der drei häufigsten *CARD15*-Varianten (p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und c.3020insC) wurde vor der Entstehung dieser Studien im Rahmen einer anderen Studie durchgeführt. Die statistische Analyse der diesbezüglichen Datenbank ermöglichte die Beurteilung möglicher Gen-Gen-Interaktionen mit den in dieser Studie untersuchten Genen (*ATG16L1* und *MYO9B*).

### 2.3.6 Schmelzkurvenanalyse anhand von FRET-Proben

Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET) beschreibt das physikalische Phänomen, bei dem ein energetisch angeregter Fluoreszenzfarbstoff (Donor-Fluorophor) einem benachbarten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) Energie übertragen kann. Dafür müssen Donor- und Akzeptor-Fluorophor in enger räumlicher Nähe sein. Als Ausgangspunkt für die Schmelzkurvenanalyse dient der durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitt. Das Amplifikationsprodukt wird mit zwei fluoreszenzmarkierten FRET-

Sonden hybridisiert, wobei die Sequenz dieser Sensorsonden komplementär zur gesuchten Variante ist (bzw. zum Wildtypen, dann vice versa). Wenn die gesuchte Variante vorhanden ist, ist die Bindungskraft des entstehenden doppelsträngigen DNA-Fragments stärker, als beim Wildtyp, da im letzteren Fall eine Basenfehlpaarung (mismatch) zwischen FRET-Sonde und Zielsequenz die vollständige Bindung verhindert. Dies macht man sich bei der Schmelzkurvenanalyse zunutze, da jede Verbindung eine eigene sequenzspezifische Schmelzkurve aufweist und im geschilderten Fall die Schmelztemperatur der gesuchten Variante höher liegt als die des Wildtyps. Das zu untersuchende DNA-Amplifikat wird mit einem Sondenmix bestehend aus Sensorsonde (Donor) und Ankersonde (Akzeptor) gemischt. Zunächst wird das Gemisch bei 95°C denaturiert. Danach wird die Temperatur auf etwa 40°C gesenkt, sodass die Sonden an die komplementären DNA-Einzelstränge binden können (annealing). Nach der Annealingreaktion befinden sich gebundene Donor- und Akzeptorsonde räumlich so nahe zueinander, dass Energie vom Donor auf das Akzeptor-Fluorophor übertragen werden kann. Die dabei von der Ankersonde kommende Fluoreszenzstrahlung mit für die Ankersonde spezifischen Wellenlänge wird ständig gemessen. Nach dieser Reaktion wird die Temperatur des Gemisches sukzessiv in 0,2°C Schritten bis auf 85°C erhöht. Bei Erreichen der Schmelztemperatur des Hybrids dissoziiert die Ankersonde von der Zielsequenz und es ist ein Abfall des Fluoreszenzsignals messbar. Zur besseren Veranschaulichung ist es geläufig die erste negative Ableitung der Funktion des Fluoreszenzsignals abhängig von der Zeit darzustellen. Dieser Zusammenhang ist in der Abbildung 3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Fluoreszenzsignalabfalls in Abhängigkeit von der Temperatur in °C. Fluoreszenzsignalabfall wird in diesem Graphen als die negative erste Ableitung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur ausgedrückt

Die Schmelzkurvenanalysen wurden an einem LightCycler-Gerät (LightCycler 480, Roche Diagnostics) durchgeführt. Die Patientenproben wurden nach Durchführung einer PCR auf das Vorhandensein der gesuchten Varianten im *ATG16L1* und *MYO9B* untersucht. Die Sequenz der komplementären und Fluoreszenz markierten (mit einer Wellenlänge von 610 oder 640 fluoreszierend) Ankersonde für *rs2241880* des *ATG16L1* war:

5'-gTAgCTggTACCCTCACTTCTTTACCAgA-FL.

Die Sequenz der LightCycler-Rot610-markierten Probe war:

5'-LC610-CCAggATgAg[C]ATCCACATTgT-Phosphat.

Der Übersicht wegen sind die Sondensequenzen für die *MYO9B*-Varianten in der folgenden Tabelle 7 wiedergegeben, dabei ist die obere Sequenz die Sensorsonde und die untere jeweils die Ankersonde.

In der Ankersonde des Intron 28 sind drei LNA-Basen eingebaut um die Schmelztemperatur zu erhöhen, da sonst die Schmelztemperatur der kurzen Ankersonde zu niedrig gewesen wäre, um eine gute Diskriminierung der Kurven zu erlauben. LNA (locked nucleic acid) ist ein RNA Derivat, welches eine modifizierte Ribose enthält. Dabei ist zwischen dem 2'-Sauerstoffatom und dem 4'-Kohlenstoffatom des Ribosemoleküls ein Methylenrest eingebaut, welcher die Ribose in der N-Typ-Konformation hält („locked“). Es können einzelne LNA-Basen direkt in DNA-Moleküle eingebunden werden. Diese verhalten sich wie dNTP's, bilden jedoch stärkere Verbindungen aus, als reine DNA-Duplexe. Dadurch kann die Schmelztemperatur von Sonden mit LNA-Basen erhöht werden und erlauben somit eine bessere Diskriminierung von Basenfehlpaarungen. Die Erhöhung der Schmelztemperatur durch DNA-LNA-Verbindungen beträgt 1 - 3°C pro LNA-Molekül [83].



Exon 20 ( <i>rs1545620</i> )	CCCCTCCATG <b>C</b> GGCCTG-FL
	640-TGCCGGTAGAGCTTCCGCTGCCAGTA-Phosphat
Intron 20 ( <i>rs1457092</i> )	AGAAGCCCC <b>C</b> AGGAGGATATCAGC-FL
	610-GCTCCCGTCCCAGCACCCACAG-Phosphat
Intron 28 ( <i>rs2305764</i> )	CCGTATATG <b>C</b> GGGGGAA-FL
	610-AACACA <u>C</u> TCA <u>C</u> AGTG-Phosphat
Intron 32 ( <i>rs2279002</i> )	TCGCTGTGACC <b>A</b> GCCCAG-FL
	640-AGGCAGGACCACCCAGTTCACAAAC-Phosphat

**Tabelle 7:** Sondensequenzen für die *MYO9B*-Varianten. Oben ist jeweils die Sensorsonde wiedergegeben, die in allen Fällen komplementär zum Wildtyp ist. Die mutierte Stelle ist jeweils hervorgehoben. Unterstrichen sind eingebaute LNA-Basen.

Die Schmelzkurvenanalysen wurden an kapillarbasierten und plattenbasierten LightCyclern durchgeführt. In jedem Lauf des LightCyclers wurden sowohl Proben von CED-Patienten als auch Kontrollfälle untersucht. Alle Primer und FRET-Sonden wurden gemäß der publizierten Nukleotidsequenzen (GenBank #NT\_005120.15) synthetisiert (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Berlin).

Pro Ansatz wurden 4 µl PCR-Produkt in Glaskapillaren (Roche, Mannheim) mit 1,5 µl Sondengemisch versetzt. Das Sondengemisch beinhaltet pro Ansatz 17,5 µl steriles Wasser, 0,2 µl Sensorsonde und 0,2 µl Ankersonde. Die Kapillaren wurden mit einem Kunststoffdeckel verschlossen und 20 Sekunden bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Schmelzkurvenanalyse im LightCycler unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung bei 95°C für 60 s, Abkühlen auf 45°C für 10 s (Änderung 20°C/s), Schmelzkurvenanalyse mit langsamer Temperaturerhöhung auf 72°C (Änderung 0,05°C/s) und erneutes Abkühlen auf 40°C für 2 s (Änderung 20°C/s). Die Aufzeichnung

und Auswertung der Schmelzkurven erfolgte computergesteuert (Roche Molecular Biochemicals). Analog wurde beim plattenbasierten LightCycler vorgegangen. Hierbei wurden 384-well plates (16 x 24) verwendet und dabei ein Reaktionsgemisch von 5 µl / well verwendet. Der plattenbasierte LightCycler 480 erlaubt die Messung zweier Wellenlängen (610 und 640), sodass in jedem Reaktionswell je zwei Ansätze ausplattiert wurden, welche dann in zwei Messschritten analysiert werden konnten. Daher wurden die Varianten in Intron 20 (610) und Intron 28 (640) sowie die Varianten in Exon 20 (640) und Intron 32 (610) gemeinsam untersucht.

### **2.3.7 Bestimmung der intestinalen Permeabilität**

Die gastrointestinale Permeabilität beschreibt die Durchlässigkeit der Darmmucosa für verschiedene Substanzen. Sie kann auf der einen Seite bei entzündlichen Erkrankungen erhöht sein und auf der anderen Seite durch eine bereits bestehende erhöhte Durchlässigkeit eine erhöhte Exposition der Darmmucosa für luminale Antigene bedeuten, die u.a. zu entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (GIT) disponiert.

Es gibt verschiedene Methoden die Permeabilität im GIT zu messen. In der gastroenterologischen Klinik der Charité wird seit etwa 10 Jahren die gastroduodenale und intestinale Permeabilität routinemäßig durch den sogenannten Drei-Zucker-Test bestimmt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der oralen Verabreichung von inerten Zuckern, die im Körper nicht verstoffwechselt werden (oder nur in einem spezifischen Bereich des GIT wie z.B. Saccharose im Dünndarm durch die Saccharase-Isomaltase) und über den Harn zügig wieder ausgeschieden werden. Anschließend erfolgt die Messung der Zuckerkonzentrationen im ausgeschiedenen und gesammelten Harn. Der Zuckerwert im Harn ist dadurch ein Maß dafür wie viel der oral aufgenommenen Dosis tatsächlich gastroduodenal oder intestinal (abhängig von dem verwendeten Zucker) durch die Mucosa transportiert wurde.

Durch Aktenanalyse konnte festgestellt werden, dass bei 105 MC-Patienten aus Deutschland, die im Rahmen dieser Studie genotypisiert wurden, die gastroduodenale und intestinale Permeabilität mit dem Drei-Zucker-Test (Lactulose, Mannitol und Saccharose) gemessen wurde. Dabei wurde Saccharose als Marker für die gastroduodenale

Permeabilität und das Lactulose / Mannitol – Verhältnis für die intestinale Permeabilität (Permeabilitäts-Index, PI) verwendet.

Als Kontrollen wurden die Testergebnisse von insgesamt 96 gesunden Freiwilligen (56 weiblich, 40 männlich) in die Untersuchung eingeschlossen. Das Durchschnittsalter dieser Kontrollgruppe betrug  $35 \pm 12$  Jahre. Als normale Permeabilität wurde der Durchschnittswert  $\pm 2$  Standardabweichungen angenommen. Während der Permeabilitätsmessung waren alle MC Patienten in Remission, gemäß dem CDAI (Crohn's Disease Activity Index).

### 2.3.8 Statistische Analyse

Die Allelhäufigkeiten für einzelne Loci zwischen den Patienten (CED, MC und CU) und den Kontrollen wurden anhand von  $2 \times 2$  Kontingenztafeln verglichen. Für die gepoolte Analyse aller drei Kohorten wurde der zweiseitige Cochran-Mantel-Haenszel Test in dem Programm R durchgeführt (The R Project for Statistical Computing; <http://www.r-project.org/>). Die Allelhäufigkeiten in den einzelnen Kohorten wurden mit dem Exakten Test nach Fisher (zweiseitig) bestimmt. Die Odds ratios und die Konfidenzintervalle wurden anhand von  $2 \times 2$  Kontingenztafeln für die Allelhäufigkeiten geschätzt.

Um die statistische Interaktion zwischen *CARD15*-Varianten zu bestimmen, definierten wir einen *CARD15*-Risikogenotyp (+/-), bei welcher mindestens eine der drei häufigsten *CARD15*-Varianten (p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und c.3020insC) vorlag. Für die gepoolte Analyse der Allelhäufigkeiten der einzelnen Loci und der *CARD15*-Risikogenotypen aller drei Kohorten wurde wiederum der zweiseitige Cochran-Mantel-Haenszel Test angewendet. Die Allelhäufigkeiten der einzelnen Kohorten wurden mit dem zweiseitigen Exakten Fisher Test miteinander verglichen.

Für Genotyp-Phänotyp-Assoziationen der untersuchten Varianten und den verschiedenen klinischen Befunden wie z.B. Erkrankung mit Fisteln (siehe oben „Klinische Daten der CED-Patienten“) wurde ebenfalls der Exakte Test nach Fisher herangezogen. Für die Analyse des Alters, des Diagnosealters und des absoluten Wertes der gastroduodenalen und intestinalen Permeabilitätstests wurde der Wilcoxon-U-Mann-Whitney-Test verwen-

det. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software GAUSS Mathematical and Statistical System, Version 8.0.0 (Aptech Systems, Inc, Black Diamond, USA) und SPSS/PC+V13.01 Software (SPSS, Chicago, USA).

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Charakterisierung der Studienpopulationen**

#### **3.1.1 Demographische und klinische Daten der Studienpopulationen**

In dieser Studie wurden insgesamt 910 CED-Patienten aus drei verschiedenen Populationen untersucht: Berlin, Deutschland; Szeged, Ungarn und Nijmegen, Niederlande. In der niederländischen Kohorte wurden nur MC Patienten rekrutiert.

Es wurde in allen drei Populationen neben Geschlecht, Diagnosealter, Krankheitsdauer, Rauchgewohnheiten und Familienanamnese auch die Krankheitslokalisierung erfasst. Darüber hinaus wurde bei Patienten, die an einem Morbus Crohn erkrankt sind, das Vorhandensein eines Risikoallels im *CARD15* untersucht. Das insbesondere beim MC klinisch wichtige Krankheitsverhalten, wie stenosierende oder infiltrierende Entzündungsreaktionen wurde ebenfalls erfasst. Auch extraintestinale Manifestationen sowie krankheitsbedingte chirurgische Eingriffe für MC- und CU-Patienten wurden dokumentiert. Da die CU als prädisponierender Faktor für das Colon-Karzinom gilt, wurde bei erkrankten Patienten das Auftreten eines Colon-Karzinoms in die Dokumentation aufgenommen.

Die folgenden Tabellen 8, 9 (MC) und 9 (CU) fassen die Ergebnisse, die zur Charakterisierung der unterschiedlichen Populationen dienen, zusammen.

	<b>Deutschland</b>	<b>Ungarn</b>	<b>Niederlande</b>
Anzahl insgesamt MC-Patienten	310	147	157
Geschlecht (männlich / weiblich)	120/190	64/83	57/100
Diagnosealter (Median, SA) in Jahren	27 +/- 11,0	25 +/- 11,8	23 +/- 9,5
Krankheitsdauer in Jahren (Median, SA)	10,3 +/- 7,6	10+/-7,5	20+/-8,9
Familiäre CED, n, (%)	29 (13%)	10 (6,8%)	9 (15,8%)
Rauchgewohnheit, n, (%)	116 (42,8%)	62 (42,1%)	n.b.
<b>Lokalisation (Wien)</b>			
L1: Ileum	66 (21,3%)	22 (15,0%)	40 (26,5%)
L2: Colon	63 (20,3%)	61 (41,5%)	31 (20,5%)
L3 Ileocolon	170 (54,8%)	56 (38,1%)	78 (51,7%)
L4: Oberer GIT	11 (3,5%)	8 (5,4%)	2 (1,3%)
Perianaler Befall	84 (29,7%)	41 (27,9%)	26 (40,6%)
<b>Entzündungsverhalten (Wien)</b>			
B1: Nicht stenosierend oder infiltrierend	89 (28,7%)	48 (34,0%)	32 (20,8%)
B2: Stenosierend	82 (26,5%)	39 (27,7%)	35 (22,7%)
B3: Infiltrierend	139 (44,8%)	54 (38,3%)	87 (56,5%)
Chirurgische Interventionen, n, (%)	124 (48,8%)	63 (45,3%)	97 (64,2%)
Extraintestinale Manifestationen, n, (%)	141 (49,1%)	35 (24,5%)	n.b.

**Tabelle 8:** Demographische und klinische Daten der MC-Patienten

	<b>Deutschland</b>	<b>Ungarn</b>	<b>Niederlande</b>
--	--------------------	---------------	--------------------

Positiv	127 (41,0%)	49 (33,3%)	61 (38,9%)
Negativ	183 (59,0%)	98 (66,7%)	96 (61,1%)

**Tabelle 9:** *CARD15*-Status für MC-Patienten

	Deutschland	Ungarn
Anzahl insgesamt CU-Patienten	179	117
Geschlecht (männl./weibl.)	82 / 95	44 / 73
Diagnosealter (Median, SA) in Jahren	32 +/- 14,2	31 +/- 8,3
Krankheitsdauer in Jahren (Median, SA)	7,5 +/- 10,0	13,5 +/- 8,3
Familiäre CED, n, (%)	10 (5,6%)	4 (3,4%)
Rauchgewohnheit, n, (%)	20 (11,1%)	12 (10,3%)
<b>Lokalisation (Wien)</b>		
Proktitis	15 (8,4%)	15 (12,8%)
Linksseitige Colitis	69 (38,5%)	67 (57,3%)
Pancolitis	95 (53,1%)	35 (29,9%)
Chirurgische Interventionen, n, (%)	6 (3,4%)	9 (7,7%)
Colon-Karzinom, n, (%)	3 (1,7%)	1 (0,9%)
Extraintestinale Manifestationen, n, (%)	99 (55,3%)	30 (25,6%)

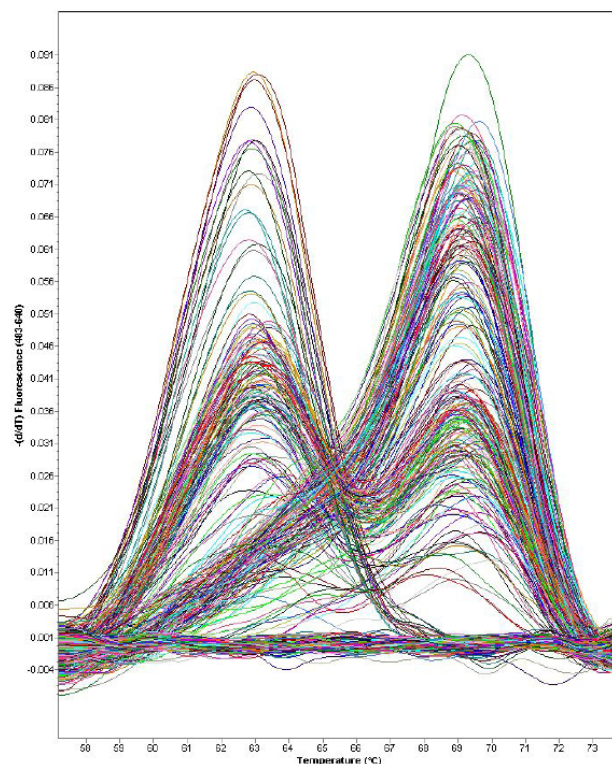
**Tabelle 10:** Demographische und klinische Daten CU-Patienten

Insgesamt betrachtet war die klinische Manifestationsform in den drei unterschiedlichen Populationen mit Morbus Crohn bzw. den beiden Populationen mit Colitis ulcerosa in Bezug auf Alter, Geschlecht, familiäre Häufung, Rauchgewohnheiten, Entzündungslokalisation, Komplikationen und die Inzidenz von chirurgischen Interventionen ähnlich.

## 3.2 Allelfrequenzverteilungen der untersuchten genetischen Varianten

### 3.2.1 Verteilung der c.898A>G-Genotypen im *ATG16L1* bei CED-Patienten und Kontrollen

Mittels Schmelzkurvenanalyse wurde der Genotyp bezüglich der c.898A>G-Variante im *ATG16L1*-Gen bei CED Patienten und gesunden Kontrollen bestimmt. Da die Sonden für die vollständige Hybridisierung beim Genotyp ohne die c.898A>G-Variante hergestellt wurde, fällt das Vorliegen einer genotypischen Variante jeweils durch eine herabgesetzte Schmelztemperatur auf (unvollständige Hybridisierung). Exemplarisch sind die Schmelzkurven eines Probenausschnitts in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Auf der x-Achse ist die Temperatur, auf der y-Achse der Fluoreszenzabfall angegeben, analog zu Abbildung 3.

Anschließend wurden die c.898A>G-Allelhäufigkeiten der CED Patienten aus Deutschland, Ungarn und den Niederlanden mit den ethnisch entsprechenden Kontrollgruppen verglichen. Außerdem wurde eine Analyse der Allelhäufigkeiten aller drei Kollektive zusammen im Vergleich zum Gesamtkontrollkollektiv durchgeführt. Die Genotypen aller drei Kontrollpopulationen befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium.

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 614 Patienten mit Morbus Crohn und 707 gesunde Probanden als Kontrolle auf das Vorhandensein des SNP *rs2241880*, c.898A>G untersucht. Die *ATG16L1* c.898G-Allelfrequenz betrug 57,4% bei MC-Patienten und 51,1% bei Kontrollen. Im Cochran-Mantel-Haenszel-Test fand sich für diese Differenz ein P-Wert von  $p = 0,0005$ . Damit bestand in den Daten des Gesamtkollektivs eine hochsignifikante Assoziation von c.898G mit Morbus Crohn

Auch wenn die Kohorten separat untersucht wurden, blieb die signifikante Assoziation zu MC in der deutschen und der niederländischen Kohorte bestehen ( $p=0,02$ ). Bei den 310 deutschen MC-Patienten fand sich c.898G in 55,6% der Allele gegenüber 48,9% in der Kontrollgruppe. In der niederländischen MC-Gruppe betrug die Allelfrequenz für c.898G 63,1% gegenüber 54,4% in Kontrollen.

In der ungarischen Gruppe stellte sich bei den MC-Patienten eine ähnliche Allelfrequenz wie in der deutschen MC-Gruppe mit 55,1% dar. Die Frequenz bei Kontrollen betrug 50,0%. Bei einer Gesamtanzahl von lediglich 147 ungarischen MC-Patienten und 207 gesunden ungarischen Kontrollen konnte ein Trend, jedoch keine Signifikanz festgestellt werden ( $p = 0,19$ ).

Ferner wurden im Rahmen dieser Studie insgesamt 296 Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht, wovon 179 Patienten aus Berlin und 117 aus Szeged, Ungarn, rekrutiert wurden. In diesen beiden Populationen hatte das *ATG16L1*-Allel c.898G einen ähnlichen Anteil. Bei CU-Patienten aus Deutschland betrug die Frequenz für c.898G 51,4% und bei ungarischen Patienten 52,1%. Der Allelanteil der gesunden Kontrollpopulationen unterschied sich mit 48,9 % in Deutschland und 50,0 % in Ungarn nicht von den Patientengruppen (Deutschland  $p = 0,50$ , Ungarn  $p = 0,44$ ). Damit konnte keine Assoziation der *rs2241880* Varianten und der Colitis ulcerosa nachgewiesen werden.



Die Genotypen und statistischen Ergebnisse gegenüber den Kontrollen sind im Einzelnen in der folgenden Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11:** Allelfrequenzverteilung *ATG16L1* c.898GA (*rs2241880*)

		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>AF (%)</b>	<b>OR</b>	<b>95% KI</b>	<b>P-Wert</b>
<b>Gesamt-</b> <b>kollektiv</b>	<b>CED</b>	174	461	275	55,55	0,83	[0,722-0,954}	<b>0,009</b>
	<b>MC</b>	105	313	196	57,41	0,77	[0,660-0,898]	<b>0,001</b>
	<b>CU</b>	69	148	79	51,69	0,97	[0,800-1,175]	0,753
	<b>Ktrl.</b>	170	354	183	50,92			
<b>Deutsch-</b> <b>land</b>	<b>CED</b>	106	237	146	54,09	0,81	[0,662-1,001]	0,051
	<b>MC</b>	63	149	98	55,65	0,76	[0,608-0,960]	<b>0,021</b>
	<b>CU</b>	43	8	48	51,40	0,91	[0,696-1,181]	0,468
	<b>Ktrl.</b>	74	143	68	48,95			
<b>Ungarn</b>	<b>CED</b>	49	146	69	53,79	0,86	[0,664-1,111]	0,248
	<b>MC</b>	23	86	38	55,10	0,82	[0,604-1,099]	0,181
	<b>CU</b>	26	60	31	52,14	0,92	[0,666-1,265]	0,602
	<b>Ktrl.</b>	49	109	49	50,00			
<b>Nieder-</b> <b>lande</b>	<b>MC</b>	19	78	60	63,06	0,70	[0,520-0,942]	<b>0,018</b>
	<b>Ktrl.</b>	47	102	66	54,42			

**Tabelle 11:** Genotypenverteilung bei CED Patienten aus Deutschland, Ungarn und den Niederlanden für c.898A>G im *ATG16L1*. Es sind absolute Zahlen für die Wiedergabe der Allelhäufigkeiten angegeben. In der vierten Spalte der prozentuale Anteil der Allelvarianten (AF%) angegeben. Die Odds-Ratio (OR) und Konfidenzintervalle (KI) wurden anhand der Allelfrequenzen in 2x2 Kontingenztafeln geschätzt. P-Werte für CED, MC und CU wurden im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen berechnet. Zur Bestimmung der P-Werte wurde der Cochran-Mantel-Haenszel-Test herangezogen.

### 3.2.2 Stratifikation des *ATG16L1*-Genotyps aller Morbus Crohn Patienten auf den *CARD15*-Status

Um potenzielle Gen-Gen-Interaktionen zu berücksichtigen, wurden die Genotypen für c.898A>G (*rs2241880*) im *ATG16L1* mit dem Vorhandensein eines *CARD15*-Risikoallels stratifiziert. Als Risikovarianz im *CARD15* wurden dabei 3 bereits gut etablierte nicht synonyme Varianten herangezogen: p.Arg702Trp, p.Gly908Arg und c.3020insC.

In der folgenden Tabelle 12 ist die Stratifikation einzeln dargestellt. Dabei steht *CARD15+* für das Vorhandensein mindestens einer der oben erwähnten Veränderungen.

<b>Morbus Crohn</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	<b>P-Wert</b>
<b>Alle Kohorten</b>				
<i>CARD15 +</i>	62	195	123	0,51
<i>CARD15 -</i>	43	118	73	
<b>Deutschland</b>				
<i>CARD15 +</i>	39	83	62	0,17
<i>CARD15 -</i>	24	66	36	
<b>Ungarn</b>				
<i>CARD15 +</i>	14	62	21	0,53
<i>CARD15 -</i>	9	24	17	
<b>Niederlande</b>				
<i>CARD15 +</i>	9	50	40	0,22
<i>CARD15 -</i>	10	28	20	

**Tabelle 12:** Stratifikation der *ATG16L1*-Genotypen aller MC-Patienten für *CARD15*-Varianten. „*CARD15 +*“ steht dabei für das Vorhandensein mindestens einer Variante. „*CARD15 -*“ steht für das wildtyp-Allel. Es sind absolute Zahlen angegeben.

Die in der Tabelle 16 aufgeführten Allelfrequenzen wurden in 2 x 2 Kontingenztafeln verglichen. Dabei konnte weder in den Einzelpopulationen (Deutschland  $p = 0,17$ , Ungarn  $p = 0,53$ , Niederlande  $p = 0,22$ ) noch in der gepoolten Analyse aller drei Population ( $p = 0,51$ ) ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden.

Es ist daher nicht von Gen-Gen-Interaktionen der *ATG16L1*-Variante mit einem der genannten Risikoallele im *CARD15* auszugehen.

### 3.2.3 Allelfrequenzverteilung der *Myosin IXb*-Varianten bei CED-Patienten und Kontrollen

Analog zu 3.2.1 wurden auch die *MYO9B*-Genotypen mittels Schmelzkurvenanalyse untersucht (*rs1545620* in Exon 20 [p.S1011A], *rs1457092* in Intron 20, *rs2305764* in Intron 28 und *rs2279002* in Intron 32). Die Verteilung der Allele auf CED-Erkrankte und gesunde Kontrollen ist im Einzelnen in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Dabei konnte die gepoolte Analyse unter Einschluss aller CED-Erkrankten aus den drei europäischen Populationen im Vergleich zum gepoolten Kontrollkollektiv keine signifikante Assoziation zwischen den untersuchten *MYO9B*-Varianten und einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung nachweisen. Auch die Untersuchung der einzelnen Kollektive erbrachte im Vergleich mit der ethnisch entsprechenden Kontrollgruppe für keine der untersuchten Varianten eine statistisch signifikante Assoziation mit einer CED.

Bei getrennter Betrachtung der beiden Krankheitsentitäten MC und CU, konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang für *MYO9B*-Varianten und die Erkrankungen in der deutschen und ungarischen Population nachgewiesen werden.

Es konnte jedoch in der niederländischen Population, in der nur MC-Patienten untersucht wurden, für die untersuchte Variante in Intron 28 eine signifikante Assoziation festgestellt werden ( $p = 0,004$ , siehe Tabelle 15).

Die Genotypenverteilungen und Signifikanzergebnisse gegenüber den Kontrollen sind im Einzelnen in der Tabelle 13 - 16 dargestellt.

**Tabelle 13:** Intron 32 - *rs2279002*

		CC	CT	TT	MAF (%)	OR	95% KI	P-Wert
<b>Gesamt-</b> <b>kollektiv</b>	<b>CED</b>	380	296	85	30,6	0,95	[0,813-1,120]	0,56
	<b>MC</b>	251	208	58	31,3	0,92	[0,774-1,100]	0,37
	<b>CU</b>	129	88	27	29,1	1,026	[0,817-1,288]	0,83
	<b>Ktrl.</b>	326	291	53	29,6			
<b>Deutsch-</b> <b>land</b>	<b>CED</b>	184	142	37	29,8	0,92	[0,721-1,180}	0,52
	<b>MC</b>	110	94	21	30,2	0,90	[0,685-1,188]	0,46
	<b>CU</b>	74	48	16	29,0	0,96	[0,694-1,319]	0,79
	<b>Ktrl.</b>	129	126	12	28,1			
<b>Ungarn</b>	<b>CED</b>	123	92	32	31,6	0,92	[0,693-1,233]	0,59
	<b>MC</b>	68	52	21	33,3	1,17	[0,840-1,626]	0,35
	<b>CU</b>	55	40	11	29,2	1,03	[0,715-1,488]	0,87
	<b>Ktrl.</b>	95	82	17	29,9			
<b>Nieder-</b> <b>lande</b>	<b>MC</b>	73	62	16	31,1	1,01	[0,734-1,390]	0,95
	<b>Ktrl.</b>	102	83	24	31,3			

**Tabelle 13:** *rs2279002* im Intron 32 des *MYO9B*; analog zu Tabelle 11.

**Tabelle 14:** Intron 20 - *rs1457092*

		GG	GT	TT	MAF (%)	OR	95% KI	P-Wert
<b>Gesamt-</b> <b>kollektiv</b>	<b>CED</b>	304	356	110	37,4	0,90	[0,774-1,047]	0,17
	<b>MC</b>	208	241	75	37,3	0,90	[0,765-1,068]	0,24
	<b>CU</b>	96	115	35	37,6	0,89	[0,721-1,105]	0,30
	<b>Ktrl.</b>	290	□□□	83	35,0			
<b>Deutsch-</b> <b>land</b>	<b>CED</b>	145	170	47	36,5	0,89	[0,707-1,120]	0,32
	<b>MC</b>	88	108	28	36,6	0,88	[0,683-1,146]	0,35
	<b>CU</b>	57	62	19	36,2	0,90	[0,666-1,214]	0,49
	<b>Ktrl.</b>	114	148	22	33,8			
<b>Ungarn</b>	<b>CED</b>	91	121	42	40,4	0,90	[0,690-1,185]	0,47
	<b>MC</b>	52	68	26	41,1	1,14	[0,836-1,556]	0,42
	<b>CU</b>	39	53	16	39,4	1,06	[0,754-1,493]	0,71
	<b>Ktrl.</b>	73	96	26	37,9			

Nieder- lande	MC	68	65	21	34,7	1,00	[0,765-1,421]	0,81
	Ktrl.	103	72	35	33,8			

**Tabelle 14:** *rs1457092* im Intron 20 des *MYO9B*; analog zu Tabelle 11.

**Tabelle 15:** Intron 28 - *rs2305764*

		CC	CT	TT	MAF (%)	OR	95% KI	P-Wert
Gesamt- kollektiv	CED	303	390	142	40,4	0,87	[0,752-1,007]	0,06
	MC	207	266	100	40,7	0,86	[0,732-1,009]	0,06
	CU	96	124	42	39,7	0,90	[0,729-1,099]	0,29
	Ktrl.	282	317	101	37,1			
Deutsch- land	CED	141	213	65	40,9	0,87	[0,700-1,083]	0,21
	MC	89	137	42	41,2	0,86	[0,676-1,094]	0,22
	CU	52	76	23	40,4	0,89	[0,670-1,184]	0,42
	Ktrl.	100	158	29	37,6			
Ungarn	CED	106	108	46	38,5	1,17	[0,896-1,531}	0,25
	MC	62	60	27	38,3	1,18	[0,868-1,608]	0,29
	CU	44	48	19	38,7	1,16	[0,827-1,621]	0,39
	Ktrl.	64	96	34	42,3			
Nieder- lande	MC	56	69	31	42,0	0,64	[0,475-0,868]	<b>0,0040</b>
	Ktrl.	118	63	38	31,7			

**Tabelle 15:** *rs2305764* im Intron 28 des *MYO9B*; analog zu Tabelle 11.

**Tabelle 16:** Exon 20 - *rs1545620*

		AA	AC	CC	MAF (%)	OR	95% KI	P-Wert
Gesamt- kollektiv	CED	266	371	136	41,6	1,00	[0,866-1,173]	0,92
	MC	179	253	91	41,6	1,00	[0,853-1,191]	0,92
	CU	87	118	45	41,6	1,00	[0,817-1,244]	0,94
	Ktrl.	201	321	99	41,7			
Deutsch- land	CED	117	184	68	43,4	0,83	[0,651-1,054]	0,13
	MC	69	119	39	43,4	1,21	[0,925-1,577]	0,17
	CU	48	65	29	43,3	1,20	[0,890-1,633]	0,24
	Ktrl.	75	118	26	38,8			
Ungarn	CED	91	121	42	40,4	1,04	[0,794-1,363]	0,77
	MC	52	68	26	41,1	0,99	[0,727-1,351]	0,95
	CU	39	53	16	39,3	0,92	[0,656-1,295]	0,70
	Ktrl.	64	95	31	41,3			

<b>Nieder- lande</b>	<b>MC</b>	58	66	26	39.3	0,78	[0,582-1,058]	0,13
	<b>Ktrl.</b>	62	108	42	45.2			

**Tabelle 16:** *rs1545620* im Exon 20 des *MYO9B*; analog zu Tabelle 11.

Da im Rahmen dieser Arbeit in den größten Populationen keine signifikante Assoziation zwischen den untersuchten *MYO9B*-Varianten mit der CED gezeigt werden konnte, wurde auf eine Stratifikation gegenüber *CARD15* verzichtet.

### 3.3 Genotyp-Phänotyp Korrelationen

#### 3.3.1 Effekt der *ATG16L1* c.898A>G-Variante auf den klinischen Verlauf von MC und CU

Es wurde anhand der detaillierten klinischen Parameter eine Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalyse durchgeführt. Es wurde untersucht, ob das Vorhandensein des c.898G-Allels im *ATG16L1* in heterozygoter oder homozygoter Form einen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der CED zeigt.

In der ungarischen MC-Gruppe stellte sich ein vermindertes Auftreten von stenosierenden Komplikationen heraus ( $p = 0,02$ ). Dieses Ergebnis konnte jedoch weder in der deutschen noch in der niederländischen Kohorte bestätigt werden. Im Übrigen konnte keine weitere signifikante Assoziation des *rs2241880* mit dem klinischen Verlauf bei MC festgestellt werden.

Ebenso wurden die CU-Patientengruppen darauf untersucht, ob c.898G einen Risikofaktor für einen bestimmten klinischen Parameter bzw. Krankheitsverlauf darstellt. Es fand sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der c.898A>G-Variante und einem bestimmten klinischen Charakteristikum in den untersuchten Kohorten.

#### 3.3.2 Effekt der untersuchten *MYO9B*-Varianten auf den klinischen Verlauf der CED

Obwohl für alle vier untersuchten Veränderungen global weder mit der Inzidenz eines Morbus Crohn noch einer Colitis ulcerosa eine Assoziation gezeigt werden konnte, wäre

ein Assoziation mit bestimmten klinischen Charakteristika der jeweiligen Erkrankung möglich. Daher wurden alle Loci daraufhin untersucht, ob das Vorhandensein einer Variante einen bestimmten klinischen Aspekt begünstigt oder benachteiligt. Im Einzelnen wurden bei MC Patienten Geschlecht, Diagnosealter, Entzündungslokalisation (nur terminales Ileum, nur Colon, Ileocolon und oberer Gastrointestinaltrakt), Entzündungsverhalten (fistulierend, stenosierend und nicht fistulierend oder stenosierend) und extraintestinale Manifestationen untersucht. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurde nach einem Zusammenhang mit dem Geschlecht, Diagnosealter, Entzündungslokalisation Proktitis, Linksseitencolitis, Pancolitis und Pancolitis mit Backwash-Ileitis) und extraintestinalen Manifestationen gesucht. Dabei konnte zwischen den jeweiligen Mutationen im Exon 20 (*rs1545620*), Intron 20 (*rs1457092*), Intron 28 (*rs2305764*) und Intron 32 (*rs2279002*) des *MYO9B*-Gens keine Assoziationen mit einem der genannten klinischen Parameter festgestellt werden.

Darüber hinaus wurde bei Patienten mit einem MC auch eine Analyse hinsichtlich einer Veränderung der intestinalen und gastroduodenalen Permeabilität durchgeführt. Im Folgenden soll hierauf eingegangen werden.

### **3.3.3 Effekt der *MYO9B*-Varianten auf die intestinale Permeabilität bei MC**

Die gastroduodenale und intestinale Permeabilität wurde bei 128 deutschen MC-Patienten anhand des oben beschriebenen Drei-Zucker-Tests gemessen. In die endgültige Auswertung wurden abhängig von dem Erfolg der Genotypisierung für die entsprechende Variante zwischen 101 und 128 Patienten eingeschlossen. Obwohl lediglich in der niederländischen Population eine signifikante Assoziation mit der Variante in Intron 28 nachgewiesen werden konnte, jedoch keine Assoziation mit den anderen Varianten und in den anderen beiden Populationen (insbesondere auch nicht in der deutschen Population), stellten wir interessanterweise dennoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Permeabilität und 3 der 4 untersuchten Varianten fest. Dabei zeigte sich, eine signifikante Assoziation der Varianten in Exon 20, Intron 20 und Intron 28 mit einer gesteigerten Permeabilität der Darmmucosa bei Morbus Crohn Patienten. Patienten die eine dieser Varianten besaßen hatten signifikant häufiger eine gesteigerte

Permeabilität. Für Intron 32 konnte bei einem p-Wert von 0,06 keine Signifikanz, jedoch ein Trend gezeigt werden. Im Einzelnen sind diese Ergebnisse in der folgenden Tabelle dargestellt.

Locus	Allel	Permeabilität				P-Wert
		normal		erhöht		
Exon 20 (rs1545620)	A (wt)	73	65%	40	35%	0,018*
	C (var)	41	44%	52	55%	
Intron 20 (rs1457092)	G (wt)	80	65%	43	34%	0,01*
	T (var)	36	46%	41	53%	
Intron 28 (rs2305764)	C (wt)	90	60%	59	39%	0,029*
	T (var)	50	46%	57	53%	
Intron 32 (rs2279002)	C (wt)	87	61%	55	38%	0,06
	T (var)	29	48%	31	51%	

**Tabelle 17:** Permeabilitätsanalyse bei Morbus Crohn-Patienten in Abhängigkeit von der jeweiligen *MYO9B*-Variante. Es sind absolute Patientenzahlen und der prozentuale Anteil nebeneinander angegeben.

### 3.3.4 Effekt des *ATG16L1*-Status auf die intestinale Permeabilität bei MC

Analog zu 3.7 wurde auch der *ATGL1*-Status der MC-Patienten im Zusammenhang mit der gastroduodenalen und intestinalen Permeabilität untersucht. Dabei konnten 105 MC Patienten mit einer erfolgreichen *ATG16L1*-Genotypisierung in die Auswertung eingeschlossen werden. Eine gesteigerte gastroduodenale Permeabilität konnte bei 39 der untersuchten 105 Patienten (37,1%) festgestellt werden. Bei 43,9% (46/105 Patienten) ließ sich eine erhöhte intestinale Permeabilität beobachten. Die statistische Analyse der Patienten mit gesteigerter Permeabilität erbrachte jedoch keinen signifikanten Zusammenhang mit c.898A>G.



## 4 Diskussion

### 4.1 ATG16L1

#### 4.1.1 ATG16L1 und Morbus Crohn

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Dezember 2007 in dem offiziellen Journal der European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) international veröffentlicht [84]. Kurz vor der Entstehung dieser Arbeit wurde von Hampe *et al.* in einer genomweiten Assoziationsstudie eine Assoziation von c898A>G im *ATG16L1* zum Morbus Crohn beschrieben. In dieser Arbeit wurden 20.000 nicht synonyme SNP's bei 735 MC-Patienten untersucht [73]. Etwa zeitgleich berichtete Rioux *et al.* in einer weiteren genomweiten Assoziationsstudie die Assoziation von derselben *ATG16L1*-Variante mit Morbus Crohn [72]. Aufgrund der Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse in genomweiten Studien sollten solche Ergebnisse in unabhängigen Kohorten und durch unabhängige Methoden bestätigt werden. Diese Studie ist deshalb als eine Kandidatengenstudie designt, da Kandidatengenstudien sich zur Bestätigung möglicher Genotyp-Phänotyp-Assoziationen, die sich in genomweiten Assoziationsstudien herauskristallisieren, eignen.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Ergebnisse der ersten international veröffentlichten Arbeit einer Kandidatengenstudie zur Assoziation der *ATG16L1* c.898A>G-Variante (*rs2241880*) mit Morbus Crohn an drei unabhängigen europäischen Kohorten [84]. Die Pionierarbeit hierzu wurde von den beiden erwähnten genomweiten Assoziationsanalysen geleistet, in der eine deutsche, eine britische sowie eine nordamerikanische Kohorte untersucht wurden [72, 73]. Anschließend wurden zwei Kandidatengenstudien veröffentlicht, in der die Assoziation von c.898G>A im *ATG16L1* in britischen Kohorten bestätigt werden konnte [85, 86]. Die vorliegende Arbeit stellt die erste Kandidatengenanalyse der beschriebenen Assoziation in einer deutschen, einer ungarischen und einer niederländischen Kohorte dar. Dabei fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Morbus Crohn und c.898G in den untersuchten Populationen aus Deutschland und den Niederlanden [84]. In der ungarischen Gruppe konnte allerdings nur ein

Trend gezeigt werden. Damit konnten die Ergebnisse von Hampe *et al.* und Rioux *et al.* aus den genomweiten Assoziationsstudien verifiziert werden [72, 73].

Ferner konnten diese Ergebnisse in zahlreichen weiteren Kandidatengenstudien in verschiedenen Populationen repliziert werden:

Etwa zeitgleich zu dieser Arbeit wurden auch die Arbeit an einer neuseeländischen Kohorte veröffentlicht, die die Frequenzverteilung von *rs2241880* bei 496 MC Patienten, 466 CU Patienten und 591 gesunden Kontrollen untersuchte. Die Autoren um Roberts konnten hier zeigen, dass die untersuchte neuseeländische Population mit der Variante *rs2241880* eher an einem MC litten als solche ohne diese genetische Variation [58]. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch die kürzlich berichtete Assoziation des *rs11209026* im *IL23R* untersucht [51]. Hier konnten die Autoren zum einen bestätigen, dass die *IL23R*-Variante signifikant negativ mit dem MC und der CU in der Abwesenheit der drei häufigen *CARD15*-Varianten korreliert. Zudem konnte keine Interaktionen zwischen *rs2241880* im *ATG16L1* und dem *IL23R*-Locus gefunden werden [58].

Wenig später konnte in einer niederländischen Arbeit, in der 311 MC Patienten, 207 CU-Patienten und 893 Kontrollen untersucht wurden, die Assoziation der *ATG16L1*-Varianten c.898G>A mit Morbus Crohn bestätigt werden ( $p = 0,0017$ ) [59]. Außerdem konnte die Assoziation von der *IL23R*-Variante (*rs11209026*) ähnlich wie in der neuseeländischen Arbeit bestätigt werden. Auch in dieser Arbeit konnte keine statistische Interaktion zwischen der *ATG16L1*-Variante und der *IL23R*-Variante gefunden werden [59].

Es kann festgehalten werden, dass die Assoziation der hier untersuchten *ATG16L1*-Alteration mit Morbus Crohn vielfach in Replikationsstudien bestätigt werden konnte [58-60, 87].

Lediglich in japanischen Studien konnte keine Assoziation der *rs2241880*-Variante im *ATG16L1* und MC nachgewiesen werden. Die Autoren um Yamazaki konnten weder diese noch die erwähnte Assoziation von MC mit dem *IL23R*-Locus in einer japanischen Population von 484 MC Patienten und 439 Kontrollen zeigen [88]. Dies spiegelt wahrscheinlich den Unterschied des genetischen Hintergrunds der CED in japanischen bzw. asiatischen und westlichen Populationen wider. Diese ethnischen Unterschiede zeigten sich zuvor auch hinsichtlich der Varianten des *CARD15*-Genes. Auch hier wurde interes-

santerweise sowohl in chinesischen, als auch in japanischen Kohorten keine Häufung von *CARD15*-Varianten bei MC gefunden [46-48]. Die bisherigen Daten belegen, dass zwischen den europäischen und den asiatischen Populationen hinsichtlich ihrer genetisch bedingten Suszeptibilität an einer CED zu erkranken eine große Divergenz besteht. Auch umfassende Metaanalysen bestätigten die Assoziation der hier untersuchten *ATG16L1*-Varianten mit der CED bei Kaukasiern, jedoch nicht bei Asiaten [89].

#### **4.1.2 *ATG16L1* und Colitis Ulcerosa**

In einer britischen Studie wurde eine schwache, jedoch signifikante Assoziation der *c.898G*-Variante im *ATG16L1* zur CU gezeigt (877 CU-Patienten, 1.235 Kontrollen,  $p=0,026$ ) [85]. Darüber hinaus wurde in einer niederländischen Studie ein Trend hin zu einer Assoziation mit der CU beschrieben. Die kleine Untersuchungsgruppe von nur 207 CU-Patienten wurde von den Autoren als vermeintlicher Grund dafür diskutiert [59]. In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Assoziation der *c.898A>G*-Variante mit der CU gezeigt werden. Auch hier muss die relativ geringe Anzahl an CU-Patienten mit 296 Patienten, ebenso wie in der niederländischen Arbeit, als Einschränkung gelten. Es konnte jedoch in dieser Arbeit abweichend von der niederländischen Untersuchung kein Trend beobachtet werden. Auch durch größer angelegte Studien konnte bisher noch nicht sicher geklärt werden, ob die CU durch Varianten im *ATG16L1* beeinflusst wird. So konnte in einer Arbeit mit 1656 MC und 1075 CU Patienten aus den Niederlanden und Belgien zwar die Assoziation mit MC bestätigt werden, jedoch trotz größeren Patienten- und Kontrollkollektivs keine signifikante Assoziation mit der CU gezeigt werden [90].

Die umfassendste Metaanalyse zu diesem Thema jedoch, die 25 Arbeiten seit 2007 in ihre Analyse einschloss, zeigt basierend auf den Daten von insgesamt 14095 MC-Patienten (15849 Kontrollen) und 7531 CU-Patienten (13852 Kontrollen) eine signifikante Assoziation der *ATG-16L1*-Variante, sowohl mit dem MC, als auch mit der CU [91]. Deshalb muss auch das Ergebnis in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Assoziation mit der CU in Frage gestellt werden. Der Grund hierfür muss bei der aktuellen Datenlage die geringe Anzahl der in dieser Studie eingeschlossenen CU-Patienten und Kontrollen genannt werden. Die erwähnte Metaanalyse und die zahlreichen Kandidatengenstudien zei-

gen jedoch auch, dass das Risiko für einen MC durch die *ATG16L1* stärker beeinflusst wird, als das Risiko für die CU, wodurch die Detektion einer Signifikanz entsprechen erschwert ist.

#### **4.1.3 *ATG16L1* (rs2241880) – pathogenetische Implikationen eines unabhängigen Risikofaktors für die CED**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *ATG16L1* ein vom *CARD 15*-Gen unabhängiger Risikofaktor für den MC darstellt (siehe Tabelle 13). Dieses Ergebnis konnte von zahlreichen Arbeiten bestätigt werden. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass der Effekt der *ATG16L1*-Variante nicht nur von *CARD15*-, sondern auch von der *IL23R*-Variante unabhängig ist [61, 85, 86, 92]. *ATG16L1* hat sich daher in den letzten Jahren als eine von den bisher bekannten Varianten unabhängige genetische Alteration etabliert, die mit der CED und im Besonderen mit dem MC assoziiert ist.

Es folgten molekularbiologische Arbeiten, die die Funktionsweise des *ATG16L1* und seine pathogenetische Bedeutung erleuchteten. Es ist bekannt, dass zu den Virulenzfaktoren von Salmonellen die Invasion sowohl in epitheliale, als auch in phagozytische Zellen gehört [93]. Die Bakterien besitzen darüber hinaus auch die Fähigkeit intrazellulär zu überleben [93]. Kuballa *et al.* konnte zeigen, dass humane epitheliale Zellen mit der *ATG16L1*-Variante (rs2241880), wie sie bei MC beobachtet wird, eine signifikant niedrigere Effektivität ihrer Fähigkeit zur Autophagozytose gegenüber Salmonellen besaßen als Zellen, die den Wildtyp exprimierten. Dabei konnten in Zellen, die das *ATG16L1*-Protein mit dem Adenin-Allel exprimierten weniger Salmonellen innerhalb ihrer Autophagosome gefunden werden, als in Zellen mit dem Wildtyp-Allel (Guanin) [94].

Die Autophagozytose ist ein wichtiger Prozess, der virulente Eindringlinge lysiert und als Antigene dem Immunsystem präsentiert [75]. Ob der Erfolg der Salmonellen intrazellulär zu überleben abhängig von der vorhandenen *ATG16L1*-Variante ist und in wie fern und ob die Antigenpräsentation auf MHC II durch die *ATG16L1*-Variante beeinflusst wird, wird durch die Arbeit von Kuballa *et al.* nicht beantwortet. Da jedoch die CED nicht als eine direkte Infektionserkrankung gilt, müssen diese Fragen dringend beantwortet werden.

Dennoch stellt die Arbeit von Kuballa *et al.* einen ersten wichtigen Baustein in dem Verständnis der ATG16L1-Proteinvarianten dar.

Auch tierexperimentelle Verfahren konnten weitere Hinweise auf die pathogenetische Bedeutung der beschriebenen ATG16L1-Variante liefern. Cadwell *et al.* generierten hierfür Mäuse, die eine ATG16L1-Defizienz hatten und verglichen die intestinalen Zellen der Mäuse mit bioptisch entnommenen epithelialen intestinalen Zellen von MC-Patienten, die das Risikoallel im *ATG16L1* trugen. Sie konnten zeigen, dass Paneth-Zellen ATG16L1-defizienter Tiere eine gestörte Exozytose aufwiesen. Paneth-Zellen sind merokrine Drüsenzellen, die stark eosinophile Granula enthalten und im Epithel des Dünndarms, des Magens und des Rektums lokalisiert sind. Sie sekretieren Lysozyme, Peptidasen, Laktoferrine und im Besonderen auch Defensine, welche essentiell für die Abwehr gegen Bakterien sowie Pilze sind [95]. Cadwell *et al.* konnten darüber hinausgehend auch zeigen, dass die abnormale Funktionsweise der Exozytose in murinen Zellen auf ähnliche Weise auch in humanen Zellen beobachtet werden kann [96].

Diese Arbeiten zeigen, dass der Pathogenese der CED ein komplexes biologisches Gleichgewicht zugrunde liegt, in die wirtseigene Faktoren genauso einfließen wie exogene Faktoren. Die Bestimmung dieser Mechanismen kann möglicherweise in Zukunft gezielte immunmodulatorische Therapien für die CED in Aussicht stellen.

## 4.2 *Myosin IXb*

### 4.2.1 *Myosin IXb* und Morbus Crohn

Monssur *et al.* berichteten eine Assoziation von *MYO9B*-Varianten mit der Zöliakie in einer niederländischen Population von 216 Erkrankten und 216 Kontrollen [8, 97]. Die Zöliakie ist eine gluteninduzierte Enteropathie, bei der eine lebenslange Unverträglichkeit gegenüber Gluten vorliegt. Gluten ist in vielen Getreidesorten enthalten und stellt das Klebereiweißmolekül dar. Beim Vorliegen einer nicht erkannten Zöliakie entsteht bei den Patienten durch die gewöhnliche Ernährung mit glutenhaltigen Getreideprodukten eine chronische Entzündung der Dünndarmschleimhaut, die nach Jahren zur Atrophie derselben führt. Unter glutenfreier Diät sind die Patienten symptomfrei.

Das *Myosin IXb*-Gen ist auf Chromosom 19q13 lokalisiert. Myosine sind Motorproteine - bewegliche Bestandteile des Cytoskeletts. Myosine der Klasse IX nehmen unter den Myosinen eine Sonderstellung ein, da sie eine Rho-GTPase Domäne besitzen und durch diese aktives Rho-GTP in inaktives Rho-GDP umwandeln können [98]. Rho-Proteine sind in der Remodellierung des Cytoskeletts und der Regulierung von tight-junctions involviert. Es ist bekannt, dass die Aktivierung der Rho-GTP die parazelluläre Permeabilität von Epithelzellen erhöht [99]. Daher ist es denkbar, dass Myosin IXb auf diesem Regulationsweg die Rho-Proteine und damit die intestinale Permeabilität beeinflusst.

Monsuur *et al.* schlugen aufgrund der Assoziation von Myosin IXb mit der Zöliakie eine primäre intestinale Barrierestörung bei Zöliakiepatienten vor, die den Kontakt von Gluten aus dem Intestinum mit Zellen des Immunsystems und die konsekutive Bildung von Autoantikörpern begünstigen würde [8]. Sie konnten mit hoher Signifikanz eine Assoziation der auch in dieser Arbeit untersuchten Varianten *rs2305764* im *Intron 28* des *MYO9B* mit der Zöliakie zeigen.

Bereits frühere Arbeiten konnten durch Mikrosatellitenanalysen den Chromosomenlocus 19q13 (IBD 6) mit der CED assoziieren (siehe Tabelle 5) [34, 35]. Aufgrund dieser Assoziation und der möglichen Rolle des dort befindlichen Genes in der Regulation der intestinalen Permeabilität und der möglichen Entzündungstriggerung hierdurch wurden Arbeiten angetrieben, die eine Assoziation von *MYO9B*-Varianten mit der CED überprüften.

Bodergraven und Mitarbeiter untersuchten 8 Varianten im *MYO9B*, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst dargestellt sind.

Genabschnitt	rs ID		CED MAF	Ktrl.MAF	P-Werte	P-Wert gepoolt
<b>Exon 20</b>	<b>rs1545620</b>	NL	0,408	0,358	<b>0,028</b>	0,0000019
		GB	0,441	0,402	<b>0,016</b>	
		KANN	0,462	0,417	<b>0,034</b>	
<b>Intron 28</b>	<b>rs2305764</b>	NL	0,426	0,381	<b>0,0075</b>	0,00014
		GB	0,44	0,408	0,1	
		KANN	0,417	0,391	0,21	
<b>Intron 32</b>	<b>rs2279002</b>	NL	0,335	0,292	<b>0,0065</b>	0,00042
		GB	0,347	0,316	<b>0,0074</b>	
		KANN	0,305	0,299	0,75	
<b>Intron 20</b>	<b>rs1457092</b> rs962917	NL	0,382	0,33	<b>0,0013</b>	0,0000021
		GB	0,408	0,369	<b>0,0013</b>	
		KANN	0,404	0,369	0,9	
Intron 14	rs7259292	NL	0,027	0,028	0,76	Na
		GB	0,033	0,034	0,74	
		KAN	0,6	0,059	0,91	
Intron 14	rs2305767	NL	0,383	0,441	<b>0,0006</b>	0,002
		GB	0,401	0,414	0,31	
		KANN	0,396	0,421	0,22	
Intron 24	rs8107108	NL	0,078	0,076	0,83	Na
		GB	0,066	0,077	0,082	
		KANN	na	na	na	
Intron 24	rs2305766	NL	0,374	0,332	0,0093	Na
		GB	na	na	na	
		KANN	0,399	0,372	0,18	

**Tabelle 18:** In der Arbeit von Bodergraven *et al.* 2006 untersuchte *MYO9B*-Variante [79]. NL: Niederlande, GB: Großbritannien, KAN: Kanada, MAF: Minor Allele Frequency. Die dick gedruckten Varianten wurden auch in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die ersten vier Varianten, die in Tabelle 18 dick gedruckt dargestellt sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit in einer Kohorte von 910 CED-Patienten (MC=614, CU=296) und 707 gesunden Kontrollpersonen aus Deutschland, Ungarn und den Niederlanden untersucht.

Bodergraven *et al.* konnten in einer Kohorte von 1197 MC-Patienten, 1520 CU-Patienten und 4400 Kontrollen eine hoch signifikante Assoziation für alle auch in dieser Arbeit untersuchten Varianten und zusätzlich weiterer Varianten in Intron 14 und Intron 24 des *MYO9B* zeigen [79]. Beide Varianten in Intron 14 (*rs7259292* und *rs2305767*) wurden vormals in der Arbeit von Monsuur *et al.* mit der Zöliakie untersucht, wobei lediglich für *rs2305767* eine hochsignifikante Assoziation mit der Zöliakie berichtet wurde. Bodergraven *et al.* konnten in der britischen oder der kanadischen Population keine der beiden Varianten in Intron 14 mit der CED assoziieren. Sie konnten jedoch eine Signifikanz in der niederländischen Population für die CED bestätigen, was bereits in der Arbeit von Monsuur *et al.* in der niederländischen Population für die Zöliakie gezeigt wurde. Daher kann hier, wenn populationsgenetische Unterschiede der niederländischen Population mit der kanadischen oder der britischen Population angenommen werden, ein pathogenetischer Zusammenhang der CED und der Zöliakie hinsichtlich dieser *MYO9B*-Varianten nicht ausgeschlossen werden. Unterstützt wird die Hypothese dieses Zusammenhangs durch die hoch signifikante Assoziation der Varianten in Intron 20 (*rs1457092*) und Intron 28 (*rs2305764*) in der niederländischen und der britischen Population [79]. Beide Varianten sind auch bei Monsuur *et al.* in ihrer Population für die Zöliakie als Risikoallel nachgewiesen worden [8]. Die fehlende Assoziation mit der kanadischen Population bei Bodergraven *et al.* spiegelt vermutlich erneut eine populationsgenetische Divergenz wider. Keine Variante im *MYO9B*-Gen bis auf die Variante *rs1545620* in Exon 20 wies bei Bodergraven *et al.* eine Assoziation mit der CED in der untersuchten kanadischen Population auf, während alle vier der auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Varianten (einschließlich *rs1545620* in Exon 20) in der niederländischen Population assoziiert waren und drei von vier in der britischen Population assoziiert waren.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse lediglich für die Variante *rs2305764* (Intron 28) in der niederländischen MC-Population nachgewiesen werden ( $p=0,004$ ). Im Übrigen konnten die, bereits von anderen Gruppen veröffentlichten Ergebnisse, im Rahmen dieser Studie für die untersuchten *MYO9B*-Varianten nicht reproduziert werden. Ein Grund dafür kann in der kleineren Populationsgröße der aktuellen Arbeit gesehen werden. So ist für die Variante in Intron 20 auch in der aktuellen Arbeit die minor allele frequency (MAF) in den gesunden Kontrollgruppen durchweg niedriger als bei MC- und CU-Erkrankten. Dieser Unterschied reichte jedoch nicht für eine statistische Signifikanz aus.



Der Vergleich der MAF für die weiteren Varianten mit der niederländischen Kohorte von Bodergraven *et al.* zeigt lediglich in Exon 20 (Kontrollen in dieser Arbeit MAF=45,2%, bei Bodergraven *et al.* 35,8%) einen erheblichen Unterschied, sonst sind die MAF jedoch in beiden niederländischen Populationen vergleichbar. Auch dies kann damit erklärt werden, dass zum einen geringe Abweichungen der Allelfrequenz erst in einer großen Kohorte statistisch signifikant werden und außerdem, dass in kleineren Populationen die zufällige Allelverteilung leichter zu, im Verhältnis zur Gesamtpopulation unterschiedlichen MAFs führen. Dennoch kann in Zusammenschau mit der Arbeit von Bodergraven *et al.* und Monsuur *et al.* festgehalten werden, dass MYO9B Varianten vor allem in den niederländischen Populationen wahrscheinlich einen Zusammenhang mit chronisch entzündlich verlaufenden Darmerkrankungen haben.

Eine Rolle der Permeabilität der Darmmucosa als Faktor in der Pathogenese der CED scheint damit, über die Regulation durch das *MYO9B*-Gen wahrscheinlich.

#### **4.2.2 Myosin IXb und Colitis Ulcerosa**

In der Studie von Bodergraven *et al.* ist ein hoch signifikanter Zusammenhang der CU mit allen vier auch in dieser Arbeit untersuchten Varianten des Myosin IXb gezeigt worden. Diese 4 Varianten waren in der britischen Population mit der CU durchgehend signifikant assoziiert, in der niederländischen für alle außer der Variante in Intron 32, während für die kanadische Population keine der Varianten außer *rs1545620* in Exon 20 eine Assoziation gezeigt werden konnte (Die Variante in Intron 20 (*rs1457092*) wurde jedoch in der kanadischen Population nicht untersucht). Diese Tatsache diskutierten die Autoren mit der vordringlich südeuropäischen (italienischen) Abstammung ihrer Patienten. Dies war auch im Hinblick darauf, dass die kanadische die größte Kohorte (n=650) war, einleuchtend und legt daher eine entscheidende Rolle der Abstammung nahe, da in der niederländischen (n=290) und britischen (n=580) Gruppe bei geringerer Fallzahl eine Assoziation gezeigt werden konnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in der Arbeit von Bodergraven *et al.* am signifikantesten assoziierten Varianten *rs1545620*, *rs1457092*, *rs2305764* und *rs2279002* im *Myosin IXb* untersucht. Es konnte jedoch keine signifikante Assoziation mit der CU festgestellt werden. Dabei ist jedoch einschränkend

für die aktuelle Studie anzumerken, dass keine CU-Patienten aus den Niederlanden untersucht wurden, sondern lediglich aus Deutschland und Ungarn.

#### **4.2.3 Myosin IXb – Aktuelle Datenlage in der Literatur**

Von den in dieser Arbeit untersuchten 549 MC-Patienten, stammen 244 aus Deutschland, 149 aus Ungarn und 156 aus den Niederlanden. Außer in der britischen Kohorte von Bodergraven *et al.* mit n=735 MC-Patienten, die deutlich größer war, sind die hier zitierten Kohorten alle ähnlich groß, während jedoch das Kontrollkollektiv in der aktuellen Studie deutlich geringer war (hier n=700, bei Bodergraven *et al.* n=4440). Daher ist neben der geringeren Patienten- bzw. Kontrollgruppengrößen, auch eine mögliche genetische Varianz vor allem für die hier untersuchte deutsche und ungarische Population durchaus als Grund dafür zu erwägen, dass die Ergebnisse zur Assoziation verschiedener Varianten aus Voruntersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnten.

Nichtsdestotrotz blieb die Datenlage zur Assoziation von *MYO9B*-Varianten und CED auch in weiteren Untersuchungen widersprüchlich. Es folgten Arbeiten mit uneinheitlichen Ergebnissen hinsichtlich der Assoziation von *MYO9B*-Varianten und der CED. Eine norwegische Studie, die 149 MC-, 308 CU-Patienten sowie 562 gesunde Kontrollen u.a. für zwei auch in der aktuellen Arbeit analysierten Varianten im Intron 20 (*rs1457092*) und Intron 28 (*rs2305764*) untersuchte, konnte weder für MC noch für die CU eine Assoziation feststellen (Intron 28 p=0,62, Intron 20 p=0,61) [81]. Gegenätzlich dazu wurde aus einer italienischen Kohorte mit 549 Crohn-Patienten, 658 CU-Patienten und 674 Kontrollen eine Assoziation nicht nur mit der Varianten im Intron 28 (*rs2305764*) berichtet, sondern auch mit zwei weiteren Varianten im *MYO9B* (wie auch bei Bodergraven *et al.* in Exon 20 (*rs1545620*)) berichtet [80]. Diese Arbeit stellt sich gegen die Argumentation von Bodergraven *et al.*, die die geringere Signifikanz der *MYO9B*-Varianten in der kanadischen Population mit der vordringlich südeuropäischen Abstammung erklärten [79]. Auch eine spanische Arbeit mit 627 MC-Patienten, 677 CU-Patienten und 990 Kontrollen zeigte, wie in der erwähnten italienischen Arbeit, eine signifikante Assoziation von *MYO9B*-Varianten (u.a. *rs2305764* in Intron 28) mit der CU [100]. Interessanterweise konnte in

der spanischen Arbeit jedoch keine Assoziation mit dem MC gezeigt werden (MC (n=262), CU (n=227), Kontrollen (n=364)), was die Schwierigkeit des Signifikanznachweises für die *MYO9B*-Varianten mit der CED unterstreicht [100].

Schließlich wurde in einer weiteren Arbeit aus Großbritannien, in der 652 MC-Patienten, 650 CU-Patienten und 1190 Kontrollen eingeschlossen waren, eine Assoziation von *Myosin IXb*-Varianten mit der CED gezeigt. In dieser britischen Studie wurde die höchste Signifikanz für eine Variante im Intron 13 (*rs2305767*) berichtet, die sich jedoch auf dem gleichen Haplotypenblock befindet wie die bei Bodergraven *et al.* mit der höchsten Signifikanz berichtete Variante im Exon 20 (*rs1545620*) [101].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Datenlage derzeit für die Assoziation von *MYO9B*-Varianten mit der CED spricht, es jedoch einer systematischen Metaanalyse bedarf, um genaue Aussagen insbesondere auch über die regionalen Unterschiede treffen zu können.

### **4.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es Genotyp-Phänotyp-Korrelationen von assoziierten Varianten durchzuführen und zu klären, ob das c.898G-Allel im *ATG16L1* und die untersuchten vier Varianten im *MYO9B* in heterozygoter oder homozygoter Form einen Zusammenhang zum klinischen Verlauf der CED zeigen.

#### **4.3.1 *ATG16L1***

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *ATG16L1* p.T300A-Variante mit MC assoziiert ist. Daraufhin wurde untersucht, ob diese Variante auch einen Zusammenhang zu einem bestimmten Krankheitsverhalten aufweist. In den untersuchten Kohorten aus Deutschland, Ungarn und den Niederlanden konnte dabei keine Assoziation mit Alter, Geschlecht, familiärer Häufung, Rauchgewohnheiten, Entzündungslokalisation, Komplikationen und der Inzidenz von chirurgischen Interventionen nachgewiesen wer-

den. Dieses Ergebnis steht dabei in Übereinstimmung mit weiteren Arbeiten, die ebenfalls keine strenge Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachweisen konnten [58, 59, 92].

Im Unterschied hierzu fanden Glas *et al.* zunächst eine schwache Korrelation der *ATG16L1*-Variante mit einer ilealen Manifestation des MC, wie auch eine geringfügig höhere Inzidenz von chirurgischen Interventionen aufgrund des MC. Nach einer Bonferroni-Korrektur jedoch, verlor dieses Ergebnis in der Kohorte von Glas *et al.* ihre statistische Signifikanz. Darüber hinaus berichteten Prescott *et al.* über eine vornehmlich ileale Manifestation des MC bei Vorhandensein der *rs2241880*-Variante im *ATG16L1* [85, 102]. Daher kann hinsichtlich der Genotyp-Phänotyp-Korrelation von *ATG16L1* und der CED aufgrund der derzeitigen Datenlage keine abschließende Beurteilung erfolgen.

Der Effekt des *CARD15*-Status auf den klinischen Verlauf von MC war nicht der Fokus dieser Studie. Nichtsdestotrotz kristallisierte sich in den untersuchten drei Populationen heraus, dass die *c.3020insC*-Variante ein Risikofaktor für stenosierende Komplikationen darstellte. Patienten, die diese Variante hatten, mussten sich häufiger chirurgischen Interventionen aufgrund der stenosierenden Erkrankung unterziehen, als solche ohne diese Variante. Dieses Ergebnis spiegelt daher die größere Inzidenz von stenosierenden Komplikationen und nachfolgenden Operationen bei MC-Patienten wider, die für die *CARD15*-Varianten bereits vielfach nachgewiesen werden konnte [103-105].

#### **4.3.2 Myosin IXb**

Obwohl kein signifikanter Zusammenhang der untersuchten *MYO9B*-Varianten mit der Inzidenz einer CED gezeigt werden konnte, konnte jedoch interessanterweise nachgewiesen werden, dass drei der vier untersuchten Alterationen mit einer gesteigerten gastroduodenalen und intestinalen Permeabilität assoziiert sind. Diese Assoziation kann darin begründet sein, dass *Myosin IXb*-Varianten unabhängig von der Manifestation einer CED die Permeabilität im GIT beeinflussen können. Daher ist es – auch wenn Myosin IXb-Varianten tatsächlich mit der CED assoziiert sind – vorstellbar, dass die Permeabilitätsänderung stärker zutage treten kann, als das genetische Risiko an einer CED zu erkranken (siehe 4.6.) Da jedoch bereits Assoziationen von *MYO9B*-Varianten mit der CED gezeigt werden konnten [79, 80, 100], war diese Analyse, unabhängig ob eine Assoziati-

on der Variante mit dem Auftreten einer CED tatsächlich in unserer Kohorte festgestellt werden konnte oder nicht, gerechtfertigt. Latiano *et al.* konnten zudem eine erhöhte Permeabilität bei CED Patienten nachweisen, falls diese gleichzeitig ein *CARD15*-Risikoallel trugen [80]. Es gibt jedoch auch davon unabhängige Berichte, dass *CARD15*-Varianten an sich mit einer erhöhten intestinalen Permeabilität assoziiert sind [106]. Daher bleibt zu klären, ob hier in einer Untergruppe von Patienten mit beiden Mutationen eine erhöhte Permeabilität nachweisbar ist oder ob bereits das Vorliegen einer Variante in einem der beiden Gene das gesamte Risiko erklären kann. In der Literatur finden sich – nach bestem Wissen – zurzeit keine anderen Daten zu Permeabilitätsänderungen in Abhängigkeit von *MYO9B*-Varianten außer der erwähnten Arbeit von Latiano *et al.* und der hiesigen Arbeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gefundene Assoziation der erhöhten intestinalen Permeabilität bei Varianten des *Myosin IXb* nicht mit dem *CARD15*-Status stratifiziert. Daher kann hierüber keine endgültige Antwort gegeben werden.

Die erwähnten übrigen phänotypischen Merkmale (Alter, Geschlecht, familiäre Häufung, Rauchgewohnheiten, Entzündungslokalisation, Komplikationen und die Inzidenz von chirurgischen Interventionen) wiesen keine Assoziation mit den untersuchten *MYO9B*-Varianten auf. Auch Bodergraven *et al.* konnten, trotz Nachweis einer Assoziation des Genes mit der Inzidenz der Erkrankung keinen Zusammenhang mit einem bestimmten Phänotypen herstellen [79]. Auch in dieser Arbeit fehlt jedoch die Analyse der gastroduodenalen und intestinalen Permeabilität.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden fünf genetische Veränderungen an 910 CED-Patienten und 707 Kontrollen mittels Schmelzkurvenanalyse untersucht. Dabei wurde eine Variante im *ATG16L1*-Gen (c.898G>A; p.T300A; *rs2241880*), die in zwei genomweiten Studien als Risikofaktor beschrieben worden ist, und vier Varianten im *MYO9B* (*rs1545620* in Exon 20 [p.S1011A], *rs1457092* in Intron 20, *rs2305764* in Intron 28 und *rs2279002* in Intron 32), für die eine signifikante Assoziation mit der Zöliakie berichtet wurde, untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die signifikante Assoziation der *ATG16L1*-Variante mit dem MC für die deutsche Population bestätigt, und für die ungarische, sowie niederländische erstmals nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *ATG16L1* einen unabhängigen Suszeptibilitätsfaktor für den MC darstellt und keine Gen-Gen-Interaktionen mit bereits etablierten *CARD15*-Varianten bestehen. *CARD15* ist ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Das aktuelle pathogenetische Modell der Entstehung der CED geht von einer unangemessen heftigen Reaktion des angeborenen Immunsystems auf intraluminale Antigene im Gastrointestinaltrakt aus. *ATG16L1* ist ein wichtiger Bestandteil des Autophagosoms, das intrazelluläre Zellbestandteile und Krankheitserreger zersetzt. Die Fragmente werden durch Exozytose an Immunzellen präsentiert. Eine beeinträchtigte Autophagozytose kann daher das Gleichgewicht zwischen Immuntoleranz und Inflammation beeinflussen und damit das derzeit gültige Verständnis über die Entstehung der CED unterstützen.

Unter den untersuchten vier *MYO9B*-Varianten konnte lediglich in der niederländischen Population eine Assoziation von *rs2305764* in Intron 28 gezeigt werden. Da *MYO9B* als Bestandteil des Zytoskeletts Zell-Zell-Verbindungen beeinflussen kann, wurden Permeabilitätsuntersuchungen von Erkrankten und gesunden Kontrollen ausgewertet. Dabei konnte gezeigt werden, dass drei genetische Veränderungen im *MYO9B* mit einer gesteigerten gastroduodenalen und intestinalen Permeabilität einhergehen. Eine gesteigerte intestinale Permeabilität könnte als Ursache für einen vermehrten Kontakt der intestinalen Immunzellen mit intraluminalen Antigenen ein weiterer Baustein für die inflammatorische Komponente in der Entstehung der CED bedeuten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Guindi M, Riddell RH. Indeterminate colitis. *J Clin Pathol* 2004;57(12):1233-44.
2. Piront P, Louis E, Latour P, et al. Epidemiology of inflammatory bowel diseases in the elderly in the province of Liege. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26(2):157-61.
3. Rose JD, Roberts GM, Williams G, et al. Cardiff Crohn's disease jubilee: the incidence over 50 years. *Gut* 1988;29(3):346-51.
4. Farrokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36(1):2-15.
5. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, et al. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000;35(3):154-67.
6. Gismera CS, Aladren BS. Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World J Gastroenterol* 2008;14(36):5491-8.
7. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, et al. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18(6):601-6.
8. Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, et al. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet* 2005;37(12):1341-4.
9. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106(8):123-33.
10. Danese S, Semeraro S, Papa A, et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005;11(46):7227-36.
11. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 Suppl A:5-36.
12. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6(1):8-15.
13. Zhang H, Massey D, Tremelling M, et al. Genetics of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis. *Br Med Bull* 2008;87:17-30.

14. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126(2):414-24.
15. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122(1):44-54.
16. Kelsall BL. Innate and adaptive mechanisms to control [corrected] pathological intestinal inflammation. *J Pathol* 2008;214(2):242-59.
17. Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 2004;4(12):953-64.
18. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324(2):84-8.
19. Ekblom A. Twin studies in IBD and other disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46 Suppl 1:E9.
20. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(7):968-76.
21. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, et al. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35(10):1075-81.
22. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003;124(7):1767-73.
23. 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.
24. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot 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.
25. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):603-6.
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. Mirza MM, Fisher SA, King K, et al. Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2003;72(4):1018-22.



28. Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14(2):199-202.
29. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998;63(1):95-100.
30. 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.
31. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, et al. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000;1(3):185-90.
32. Ruuls SR, Sedgwick JD. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum Genet* 1999;65(2):294-301.
33. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* 2000;66(6):1857-62.
34. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000;66(6):1863-70.
35. van Heel DA, Dechairo BM, Dawson G, et al. The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with CARD15 and IBD5 disease-associated variants. *Hum Mol Genet* 2003;12(20):2569-75.
36. Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, et al. Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2000;9(9):1425-32.
37. Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 2009;41(2):216-20.
38. Hampe J, Frenzel H, Mirza MM, et al. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(1):321-6.
39. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al. Evidence for an inflammatory bowel disease locus on chromosome 3p26: linkage, transmission/disequilibrium and partitioning of linkage. *Hum Mol Genet* 2002;11(21):2599-606.

40. Hampe J, Lynch NJ, Daniels S, et al. Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48(2):191-7.
41. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003;4(7):702-7.
42. 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.
43. Maeda S, Hsu LC, Liu H, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 2005;307(5710):734-8.
44. Kelsall B. Getting to the guts of NOD2. *Nat Med* 2005;11(4):383-4.
45. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003;124(1):140-6.
46. 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.
47. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(12):1465-70.
48. 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.
49. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357(9272):1925-8.
50. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359(9318):1661-5.
51. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314(5804):1461-3.
52. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003;278(3):1910-4.
53. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42(5):963-70.

54. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001;194(4):519-27.
55. Hue S, Ahern P, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006;203(11):2473-83.
56. Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *J Intern Med* 2008;263(6):584-90.
57. Izcue A, Hue S, Buonocore S, et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 2008;28(4):559-70.
58. Roberts RL, Geary RB, Hollis-Moffatt JE, et al. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007;102(12):2754-61.
59. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, et al. ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am J Gastroenterol* 2008;103(3):621-7.
60. Lakatos PL, Szamosi T, Szilvasi A, et al. ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig Liver Dis* 2008;40(11):867-73.
61. Newman WG, Zhang Q, Liu X, et al. Genetic variants in IL-23R and ATG16L1 independently predispose to increased susceptibility to Crohn's disease in a Canadian population. *J Clin Gastroenterol* 2009;43(5):444-7.
62. Buning C, Schmidt HH, Molnar T, et al. Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers a protective effect not only against Crohn's disease but also ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26(7):1025-33.
63. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, et al. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One* 2007;2(9):e819.
64. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004;53(7):987-92.
65. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, et al. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology* 2004;127(1):365-6.
66. Stoll M, Corneliusen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004;36(5):476-80.

67. 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.
68. 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.
69. Buning C, Geerdts L, Fiedler T, et al. DLG5 variants in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101(4):786-92.
70. 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.
71. Browning BL, Annese 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.
72. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39(5):596-604.
73. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of non-synonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39(2):207-11.
74. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol* 2008;43(1):1-17.
75. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 9):1679-88.
76. Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, et al. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986;105(6):883-5.
77. Meddings J. What role does intestinal permeability have in IBD pathogenesis? *Inflamm Bowel Dis* 2008;14 Suppl 2:S138-9.
78. Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(3):401-7.
79. van Bodegraven AA, Curley CR, Hunt KA, et al. Genetic variation in myosin IXB is associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006;131(6):1768-74.

80. Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, et al. The association of MYO9B gene in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27(3):241-8.
81. Amundsen SS, Vatn M, Wijmenga C, et al. Association analysis of MYO9B gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Norwegian cohort. *Tissue Antigens* 2006;68(3):249-52.
82. Rosenstiel P, Sina C, Franke A, et al. Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 2009;21(6):334-45.
83. Petersen M, Bondensgaard K, Wengel J, et al. Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids. *J Am Chem Soc* 2002;124(21):5974-82.
84. Buning C, Durmus T, Molnar T, et al. A study in three European IBD cohorts confirms that the ATG16L1 c.898A > G (p.Thr300Ala) variant is a susceptibility factor for Crohn's disease. *Journal of Crohns & Colitis* 2007;1(2):70-6.
85. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007;132(5):1665-71.
86. Cummings JR, Cooney R, Pathan S, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(8):941-6.
87. Glas J, Konrad A, Schmechel S, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol* 2008;103(3):682-91.
88. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, et al. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet* 2007;52(7):575-83.
89. Zhang HF, Qiu LX, Chen Y, et al. ATG16L1 T300A polymorphism and Crohn's disease susceptibility: evidence from 13,022 cases and 17,532 controls. *Hum Genet* 2009;125(5-6):627-31.
90. Weersma RK, Stokkers PC, Cleyne I, et al. Confirmation of multiple Crohn's disease susceptibility loci in a large Dutch-Belgian cohort. *Am J Gastroenterol* 2009;104(3):630-8.
91. Cheng JF, Ning YJ, Zhang W, et al. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: a meta-analysis. *World J Gastroenterol*;16(10):1258-66.

92. Okazaki T, Wang MH, Rawsthorne P, et al. Contributions of IBD5, IL23R, ATG16L1, and NOD2 to Crohn's disease risk in a population-based case-control study: evidence of gene-gene interactions. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(11):1528-41.
93. Valdez Y, Ferreira RB, Finlay BB. Molecular mechanisms of Salmonella virulence and host resistance. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;337:93-127.
94. Kuballa P, Huett A, Rioux JD, et al. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* 2008;3(10):e3391.
95. Koslowski MJ, Beisner J, Stange EF, et al. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int J Med Microbiol*;300(1):34-40.
96. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008;456(7219):259-63.
97. Wolters VM, Verbeek WH, Zhernakova A, et al. The MYO9B gene is a strong risk factor for developing refractory celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5(12):1399-405, 405 e1-2.
98. Post PL, Tyska MJ, O'Connell CB, et al. Myosin-IXb is a single-headed and processive motor. *J Biol Chem* 2002;277(14):11679-83.
99. Bruewer M, Hopkins AM, Hobert ME, et al. RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287(2):C327-35.
100. Nunez C, Oliver J, Mendoza JL, et al. MYO9B polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56(9):1321-2.
101. Cooney R, Cummings JR, Pathan S, et al. Association between genetic variants in myosin IXB and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(7):1014-21.
102. Chapman JM, Onnie CM, Prescott NJ, et al. Searching for genotype-phenotype structure: using hierarchical log-linear models in Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2009;84(2):178-87.
103. Buning C, Molnar T, Nagy F, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: is Hungary different? *World J Gastroenterol* 2005;11(3):407-11.
104. Buning C, Genschel J, Buhner 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.

105. Oostenbrug LE, Nolte IM, Oosterom E, et al. CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis* 2006;38(11):834-45.
106. Buhner S, Buning C, Genschel J, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;55(3):342-7.

## 7 Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei meinem Betreuer im Labor und meinem „Doktorvater“ Prof. Dr. Heiko Witt; von dem ich während der gesamten wissenschaftlichen Arbeit einschließlich der Dissertation viel gelernt habe. Vielen Dank für die unkomplizierte Art und die ermutigenden Worte auch aus der Ferne aus München.

Besonders bedanke ich mich an dieser Stelle auch bei Frau Prof. Dr. Renate Bergmann und Herrn Prof. Dr. Karl E. Bergmann, die im Studium meine Mentoren waren und durch die ich nicht nur Prof. Witt kennengelernt habe, sondern auch Dr. Volkhard Lindner, PhD in Maine, USA. Dr. Lindner hat in mir die Begeisterung für die Forschung und das Labor geweckt, was mich angetrieben hat auch in Berlin wieder ins Labor zu gehen und zu forschen. Mein herzlicher Dank gilt daher auch Dr. Lindner und seiner Familie.

Bei Dr. Carsten Büning, Herrn Braun und Frau Schulzki bedanke ich mich für die gute und angenehme Zusammenarbeit im Labor und der Klinik.

Meinem Kommilitonen und Kollegen Georg Weikert danke ich für unsere enge Freundschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, wobei hierbei viele Worte meinem Dank nicht gerecht werden können.



## 8 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Tahir Durmus, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Assoziationsstudien von Varianten des *ATG16L1*- und *Myosin IXb*-Gens bei Patienten mit chronisch-entzündlichen 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.“

Datum

Unterschrift

## **9 Lebenslauf**

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

## Publikationen

---

### Zum Dissertationsthema:

#### **Originalarbeit:**

Buning C, **Durmus T**, Molnar T, de Jong DJ, Drenth JPH, Fiedler T, et al. A study in three European IBD cohorts confirms that the ATG16L1 c.898A > G (p.Thr300Ala) variant is a susceptibility factor for Crohn's disease. *Journal of Crohns & Colitis* 2007; 1(2):70-6.

#### **Abstract:**

Warner K, Buning C, **Durmus T**, Molnar T, De Jong DJ, Drenth JPH, et al. Myosin IXB Gene Variants Are Associated with Crohn's Disease: Evidence for a Primary Epithelial Barrier Defect. *Gastroenterology* 2009; 136(5):A208-A.

### Weitere Originalarbeiten:

**Durmus T**, LeClair RJ, Park KS, Terzic A, Yoon JK, Lindner V. Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 (Cthrc1). *Gene Expr Patterns* 2006; 6(8):935-40.

LeClair RJ, **Durmus T**, Wang Q, Pyagay P, Terzic A, Lindner V. Cthrc1 is a novel inhibitor of transforming growth factor-beta signaling and neointimal lesion formation. *Circ Res* 2007; 100(6):826-33.

Fest S, Huebener N, Bleeke M, **Durmus T**, Stermann A, Woehler A, et al. Survivin minigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma. *Int J Cancer* 2009; 125(1):104-14.

Huebener N, Fest S, Hilt K, Schramm A, Eggert A, **Durmus T**, et al. Xenogeneic immunization with human tyrosine hydroxylase DNA vaccines suppresses growth of established neuroblastoma. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(8):2392-401.

Wagner M, Butler C, Rief M, Beling M, **Durmus T**, Huppertz A, et al. Comparison of non-gated vs. electrocardiogram-gated 64-detector-row computed tomography for integrated electroanatomic mapping in patients undergoing pulmonary vein isolation. *Europace* 2010; 12(8):1090-7.

Tahir Durmus, Berlin 05.08.2010