

Aus dem
Charité Centrum 13 für Innere Medizin mit Kardiologie, Gastroenterologie
und Nephrologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie und
Endokrinologie, Campus Mitte
Direktor: Professor Dr. med. Martin Zeitz

Habilitationsschrift

Einfluss genetischer Varianten auf Entstehung und Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Carsten Büning
geboren am 13. September 1973 in Berlin

Eingereicht: 11/2009

Dekanin: Frau Professor Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Markus Lerch

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
1 Einleitung	5
1.1 Neue Aspekte der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Neue Therapiekonzepte	6
1.2 Aktuelle Hypothese zur Pathophysiologie: Genetik liefert wegweisende Erkenntnisse	8
1.2.1 Einfluss der Bakterienflora	8
1.2.2 Welche Rolle spielt die epitheliale Barrierestörung?	9
1.2.3 Rolle des angeborenen und des adaptiven Immunsystems	10
1.3 Genetik im Fokus	11
1.3.1 Evidenz für einen genetischen Einfluss	11
1.3.2 Verschiedene Ansätze zur Identifikation von Risikogenen	12
1.4 Herleitung von Aufgabenstellungen	16
2 Originalarbeiten	18
2.1 Mutationen im NOD2/CARD15-Gen beim M. Crohn sind mit Ileozökalresektionen assoziiert und sind ein Risikofaktor für Reoperationen	18
2.2 NOD2/CARD15 Polymorphismen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Gibt es in Ungarn Unterschiede?	25
2.3 Der genetische Hintergrund der erhöhten intestinalen Permeabilität in Familien mit M. Crohn: Spielt die NOD2-Mutation 3020insC eine Rolle?	31
2.4 DLG5-Varianten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	38
2.5 Heterozygotie für die IL23R-Variante p.Arg381Gln stellt einen schützenden Effekt gegenüber M. Crohn und Colitis ulcerosa dar	46
2.6 Eine Studie in drei Europäischen Kohorten bestätigt: ATG16L1 p.Thr300Ala ist ein Suszeptibilitätsfaktor für den M. Crohn	56
3 Diskussion	64
3.1 Aufgaben der molekulargenetischen Diagnostik aus klinischer Sicht	64

3.2	Der Einfluss des NOD2-Gen auf den M. Crohn	64
3.2.1	Biologische Funktion NOD2	64
3.2.2	Regionale Unterschiede der <i>NOD2</i> -Mutation	66
3.2.3	Einfluss auf den Phänotyp	67
3.2.4	Welchen Einfluss haben <i>NOD2</i> -Mutationen auf eine epitheliale Barriestörung?	72
3.2.5	Welche weiteren Gene führen zur Störung der epithelialen Barriere bei M. Crohn?	73
3.2.6	Spielt ein epithelialer Barrieredefekt eine Rolle bei der Colitis ulcerosa?	75
3.3	Autophagie und TH17-Zellen: neue Aspekte in der Pathophysiologie	76
3.3.1	IL23R	76
3.3.2	ATG16L1	77
3.4	Weitere Kandidatengenanalysen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	79
3.4.1	Ist die erhöhte Inzidenz der Laktoseintoleranz beim M. Crohn genetisch mitbedingt?	79
3.4.2	Kandidatengensuche durch Daten der Kopplungsanalysen	81
3.6	Pharmakogenetik: Versuch einer Optimierung der medikamentösen Therapie durch Genotypisierung	83
3.6.1	MDR1	83
3.6.2	Weitere pharmakogenetische Studien	84
4	Ausblick	86
5	Zusammenfassung	87
6	Literatur	89
7	Danksagung	113

Abkürzungen

APC: engl. antigen presenting cell
ATG16L1: engl. autophagy-related 16-like 1 gene
AVIL: Advillin
CARD: engl. caspase activation recruitment domain
Casp9: Caspase 9
CED: chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Cfu: engl. colony forming units
CU: Colitis ulcerosa
DLG5: engl. *Drosophila* Disc large Homolog 5
DMBT1: deleted in malignant brain tumors 1
ERK: engl. extracellular signal-regulated kinase
Faslg: Fas ligand
GLI1: engl. glioma-associated oncogene homolog 1
HD2-Gen: engl.: Human Defensin Gen 2
IBD: engl. Inflammatory Bowel disease
IFN- γ : Interferon- γ
IL: Interleukin
ITLN1: Intelectin 1
JAM: engl. junctional adhesion molecule
JNK: engl. cJun-N-terminal kinase
LPS: Lipopolysaccharid
LRRK2: engl. leucin-rich repeat kinase
MAPK: engl. mitogen activated protein kinase
MDR: engl. multi drug resistance
MUC2: engl. Mucin
NEMO: engl. nuclear factor-kappa-B essential modulator
NF- κ B: engl. nuclear factor-kappa-B
NOD: engl. nucleotide-binding oligomerization domain
NRMP2: engl. natural resistance associated macrophage protein 2
PRR: engl. pattern recognition receptor
PTGER4: engl. prostaglandin receptor EP4
SNPs: engl. single nucleotide polymorphisms
STAT6: engl. signal transducer and activator of transcription 6
TNF: Tumor Nekrose Faktor
VDR: engl. vitamin D receptor
XBP1: engl. X box binding protein 1

1 Einleitung

1.1 Neue Aspekte der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

M. Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind die wichtigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Seit den Erstbeschreibungen des M. Crohn als „Regionale Ileitis: eine pathologische und klinische Entität“ im Jahre 1932 durch Burril B. Crohn sowie der Colitis ulcerosa im Jahre 1859 durch Samuel Wilks haben sich bedeutende Veränderungen hinsichtlich Epidemiologie, Therapie und Pathophysiologie ergeben. Einige dieser aktuellen Entwicklungen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.1.1 Epidemiologie

M. Crohn und Colitis ulcerosa wiesen zu Beginn des 20. Jahrhunderts in den Industrienationen eine stetig steigende Inzidenz auf. Derzeit wird in Deutschland jedoch eine Stabilisierung der Inzidenz beobachtet. Eine aktuelle populationsbasierte Untersuchung der Region Oberfalz in Deutschland ergab Inzidenzraten von 6,6/100.000 für den M. Crohn und 3,9/100.000 für die Colitis ulcerosa und somit vergleichbar zur Voruntersuchung vor 15 Jahren (1). Die Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen liegt beim M. Crohn in Deutschland bei ca. 1,25/1000 bis 2/1000 Einwohner, bei der Colitis ulcerosa bei 2,1/1000 Einwohner. In Deutschland leiden derzeit geschätzt weit über 300.000 Menschen an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, ca. 170.000 davon an Colitis ulcerosa.

Weltweit ist das Auftreten weiterhin starken geografischen Schwankungen unterworfen. Am häufigsten treten diese Krankheiten in Ländern Nordeuropas, Großbritannien und den USA auf. Inzidenzraten aus Olmsted County, Minnesota, wurden aktuell für M. Crohn mit 8,8/100.000 und für Colitis ulcerosa mit 7,9/100.000 beobachtet (2). Im Verlauf der letzten 30 Jahre sind somit in dieser Region ähnlich wie in Deutschland die Inzidenzen für beide Erkrankungen stabil. Interessanterweise werden aus Ländern mit seltenerem Auftreten (Asien, Südamerika) steigende Inzidenzen berichtet (3). Auch Migration aus einer Region mit geringer Häufigkeit führt zu einer Adaption der Prävalenzen, wie dies am Beispiel der Bangladeschis in London nachgewiesen wurde (4). Unterschiedliche Ergebnisse gibt es weiterhin hinsichtlich der Frage, ob in einer städtischen Bevölkerung im Vergleich zur ländlichen Bevölkerung mehr Patienten an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung erkranken (5,6). Höhere sozioökonomische Schichten scheinen im Vergleich zu Bevölkerungskreisen mit niedrigem Sozialstatus (6, 7) zu dominieren.

Beim M. Crohn gibt es entgegen früheren Untersuchungen mit zwei Häufigkeitsgipfeln - zwischen dem 15.-25. Lebensjahr und dann erneut zwischen dem 50.-70. Lebensjahr (8) - eine Reihe aktuellerer Studien mit lediglich einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 15. bis 30.

Lebensjahr (9-11). Interessante Daten gibt es bei männlichen Patienten mit Colitis ulcerosa: nach einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. bis 29. Lebensjahr – ca. 5 Jahre später als beim M. Crohn - tritt hier ein Plateauereffekt ein, der erst mit dem 70. Lebensjahr signifikant abfällt (9-11). Dieser Plateauereffekt könnte auf die häufige Beendigung des Rauchens bei Männern im fortgeschrittenen Alter zurückzuführen sein.

Trotz der Unterschiede hinsichtlich Alter und Region sind Männer und Frauen von der Colitis ulcerosa gleich häufig betroffen, beim M. Crohn erkranken Frauen nach neueren europäischen Studien im Verhältnis ~ 1:(1,1-1,4) etwas häufiger (8, 10, 12).

Steigende Häufigkeiten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind ein Indiz dafür, dass Umwelt- und Ernährungsfaktoren eine Rolle spielen müssen. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist das Zigarettenrauchen der Faktor mit dem höchsten Einfluss. Das Risiko, an einer Colitis ulcerosa zu erkranken, beträgt für Raucher nur ca. 40% des Risikos für Nichtraucher. Hingegen ist das Risiko, an einem M. Crohn zu erkranken, bei Rauchern doppelt so groß wie bei Nichtrauchern. Zudem beeinflusst Rauchen bei Patienten mit M. Crohn den Krankheitsverlauf negativ hinsichtlich des Ansprechens auf Medikamente oder der Rezidivhäufigkeit (13-15). Die Ursachen dieser Beobachtungen bleiben weiterhin unklar, implizieren aber den therapeutischen Nutzen einer Nikotinapplikation bei Colitis ulcerosa. Eine aktuelle Meta-Analyse allerdings zeigt zwar eine Überlegenheit der transdermalen Applikation von Nikotin gegenüber Placebo, allerdings konnte kein Benefit gegenüber der Standardtherapie nachgewiesen werden. Zudem ist die Verträglichkeit der Nikotintherapie deutlich schlechter (16).

Trotz neuerer Untersuchungen ist es schwierig, Aussagen hinsichtlich weiterer Ernährungsfaktoren neben dem Rauchen mit einem replizierbaren Einfluss auf Entstehung und Verlauf zu identifizieren. Nach einer kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse schützt mütterliches Stillen das Kind sowohl vor der Entwicklung von M. Crohn als auch vor Colitis ulcerosa (17). Weitere postulierte Einflussfaktoren sind bislang nicht bekannt, Ergebnisse einzelner Studien konnten nicht reproduziert werden.

Neue Erhebungen bestätigen erneut die negative Assoziation zwischen einer Appendektomie und Colitis ulcerosa (18), jedoch nicht zum M. Crohn (19). Möglicherweise prädisponiert eine stattgehabte Appendizitis zu einer T-Helferzellantwort vom Typ 1 eher als zu einer Typ-2-Antwort (20). Allerdings ist die schemenhafte Darstellung – M. Crohn als reine T_H1-Erkrankung, Colitis ulcerosa als T_H2-Erkrankung - klar widerlegt.

1.1.2 Neue Therapiekonzepte

Die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen hat sich durch die Einführung monoklonaler Antikörper gegen Entzündungsmediatoren – im Vordergrund steht hier derzeit die Hemmung von TNF α - für Patienten mit schweren Verläufen entscheidend verbessert

(Übersicht in 21). Nachdem die Therapie über Jahre hinweg in erster Linie symptomorientiert erfolgte, wird derzeit kontrovers diskutiert, inwieweit eine frühere aggressive Therapie mit Immunsuppressiva oder Biologika langfristig den Verlauf der Erkrankungen verbessern kann. In diesem Zusammenhang könnte eine Abheilung der Mukosa ein weiteres Therapieziel darstellen. Im Hinblick auf den M. Crohn, wo weder Glucocorticoide (22) noch Mesalazin (23) zu einer mukosalen Heilung führen, konnte dies sowohl für Immunsuppressiva wie Azathioprin (23) als auch für Infliximab (24) gezeigt werden.

Bei der rheumatoiden Früharthritis kann die Therapie mit sogenannten „disease-modifying-drugs“ (DMDR), wie z.B. Methotrexat oder Infliximab, bei frühzeitigem Einsatz eine Progression der Gelenkdestruktionen signifikant vermindern (25). Auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen erste Langzeitstudien, dass eine mukosale Heilung das Risiko von Operationen und Krankenhausaufenthalten vermindert (26). Für die TNF α -Antagonisten Infliximab (27) und Adalimumab (28) konnte zudem gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Gabe das Auftreten von Komplikationen – Operationen und Krankenhausaufenthalte – vermindert. Zudem zeigen Daten einer Reihe kleinerer Studien, dass Patienten insbesondere dann von einer Biologika-Therapie profitierten, wenn die Therapie frühzeitig, z.B. im ersten Krankheitsjahr, angewendet wurde (29, 30).

Ein Argument gegen den frühen Einsatz ist unter anderem der Wirkverlust dieser Substanzen, welcher für Infliximab in klinischen Studien beim M. Crohn in bis ca. 13% der Patienten in einem Behandlungsjahr beobachtet wird (31). Zudem besteht bei zu frühem Einsatz die Gefahr der Übertherapie. Wichtige Argumente gegen eine frühe aggressive Therapie sind die weiterhin unklaren Langzeitnebenwirkungen der Biologika. Während Register von keiner erhöhten Inzidenz von Nebenwirkungen unter der Therapie mit Infliximab ausgehen (32), scheint die Kombination von mehr als zwei Immunsuppressiva das Risiko opportunistischer Infektionen zu erhöhen (33). Hepatosplenische T-Zell-Lymphome mit fast immer letalem Ausgang sind eine seltene Nebenwirkung, die allerdings in erster Linie bei Kombinationstherapien mit Immunsuppressiva beobachtet wurden, so dass der Kausalzusammenhang der Biologika derzeit nicht erwiesen ist (34). Eine aktuelle Studie beschreibt ein generell erhöhtes Mortalitäts- und Krebsrisiko unter der Therapie mit TNF α -Antagonisten (35).

Trotz diesen intensiven Diskussionen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt in den Leitlinien aller Fachgesellschaften eine aggressive Strategie nicht implementiert (36, 37). Es wäre in diesem Zusammenhang von großem klinischem Nutzen, Marker zu identifizieren, welche das Ansprechen der spezifischen Therapie und das Auftreten von Nebenwirkungen vorhersagen. Daten der im Original noch nicht publizierten SONIC-Studie zeigen, dass Patienten mit sowohl ausgeprägter endoskopischer Entzündung als auch erhöhten CRP-Werten von einer aggressiven Therapie unter Einsatz eines TNF α -Antagonisten profitieren (38). Zudem

könnten genetische Varianten genutzt werden, Patienten mit einem aggressiven Erkrankungsverlauf zu identifizieren. Erste Untersuchungen konnten allerdings zeigen, dass Mutationen im *NOD2*-Gen das Ansprechen auf Infliximab nicht beeinflussen (39).

1.2 Aktuelle Hypothese zur Pathophysiologie: Genetik liefert wegweisende Erkenntnisse

Die aktuelle und faszinierende Hypothese der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen geht von einer gestörten Immunantwort gegenüber der bakteriellen Flora bei genetischer Prädisposition aus. Mitursächlich wird zudem eine intestinale Barrierestörung angesehen, welches zur verstärkten Aufnahme von Antigenen führt. Im vorherigen Abschnitt wurde bereits auf wichtige Umwelt- und Ernährungsfaktoren eingegangen. Folgend sollen nun die weiteren Aspekte näher betrachtet werden.

1.2.1 Einfluss der Bakterienflora

Normalerweise stellt das Epithel des Gastrointestinaltrakts eine intakte Barriere zur Außenwelt dar. Das Zusammenspiel der kommensalen Bakterienflora, das intestinale Epithel sowie das Immunsystem innerhalb der Mukosa, sind ein dynamischer Prozess, der im Normalfall eine Homöostase erwirkt. Die Zellen der Darmmukosa sind normalerweise gegenüber der chronischen Konfrontation mit mikrobiellen Bestandteilen tolerant, eine chronische Entzündungsreaktion bleibt aus. Die luminale Bakterienflora ist zudem wichtig für die Ausbildung eines intakten intestinalen Immunabwehrsystems: Keimfrei aufgezogene Mäuse zeigen Kryptenhyperplasien und einen Mangel in der Ausbildung von Lymphfollikeln. Konfrontation mit Bakterien führt dann zu einer Erhöhung von Lymphozyten in der Lamina propria und zur erhöhten IgA-Sekretion (40).

Für eine wichtige Rolle der Bakterienflora in Entstehung und Verlauf spricht eine Reihe von Beobachtungen. In wegweisenden Arbeiten von Alexander Swidsinski aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CED-Patienten im Vergleich zu Kontrollen deutlich höhere Konzentrationen an Bakterien in der Darmmukosa aufweisen. Je ausgeprägter die Entzündung klinisch vorlag, desto höhere Bakterienkonzentrationen konnten sowohl in entzündeter als auch in nicht-entzündeter Schleimhaut gefunden werden. Bei Bakterienkonzentrationen $>10,000$ cfu/ μ L organisierten sich die Bakterien in einem Biofilm an der Mukosa. Bei Konzentrationen $>50,000$ cfu/ μ L konnten in Enterozyten eingeschlossene Bakterien nachgewiesen werden. Alle Bakterien waren fäkalen Ursprungs (41). Als Folge kann es zu einer erhöhten bakteriellen Translokation kommen. Dies wurde für den M. Crohn bereits in mehreren Studien nachgewiesen (42-44). Passend hierzu auch die

Effektivität antibiotischer Therapien, insbesondere in der Behandlung des M. Crohn (Übersicht 21).

Weitere Unterstützungen erhält die Hypothese durch Ergebnisse genetischer Studien, die zwei Gene – *NOD2* und *ATG16L1* - identifiziert haben, die in der antimikrobiellen Abwehr eine Rolle spielen (45, 46). *NOD2* erkennt als intrazellulärer Rezeptor in Monozyten Bestandteile der Zellwand gramnegativer und grampositiver Bakterien. *ATG16L1* ist wichtig für den Prozess der Autophagie zur Elimination intrazellulärer Bakterien. Dies geschieht über einen intrazellulären Transport dieser Organismen zu Lysosomen, wo diese Bestandteile dann degradiert werden. Insbesondere die Elimination von Mykobakterien erfolgt über Autophagie (47). Eine Vielzahl von Studien hat die Rolle von *Mycobacterium avium paratuberculosis* in der Pathogenese des M. Crohn untersucht, da dieser Keim beim Rind eine ähnliche Erkrankung – Johne´sche Erkrankung - hervorruft. Die derzeitige Datenlage ist jedoch nicht eindeutig (Übersicht in 48). Hypothetisch könnte somit *M. avium paratuberculosis* zumindest bei den M. Crohn-Patienten eine Rolle spielen, die Mutationen in einem Autophagie-Gen aufweisen, wo somit die Elimination von Bakterien gestört ist. Zusammenfassend ist derzeit jedoch unklar, ob die veränderte mukosale Bakterienflora ein primär oder sekundär bedingtes Phänomen in der Pathogenese darstellt.

1.2.2 Welche Rolle spielt die epitheliale Barrierestörung?

Über welche Mechanismen könnte es zu einer erhöhten Aufnahme von Antigenen – vorzugsweise Bakterien und andere Nahrungsbestandteile – kommen? Ein möglicher Ansatzpunkt ist eine Störung der intestinalen Barrierefunktion, die ein wichtiges Charakteristikum des M. Crohn ist. Ergebnisse diverser Studien belegen eine Erhöhung der gastrointestinalen Permeabilität (49-57). Eine solche Erhöhung der intestinalen Permeabilität kann nicht nur dem Beginn des M. Crohn über Jahre vorhergehen (58), sondern stellt zudem ein Risikofaktor für ein Rezidiv dar (52). Weitere Zusammenhänge konnten zur Krankheitsaktivität (59, 60) und Therapieansprechen beschrieben werden (61, 62).

Um Hinweise zu erhalten, ob es sich bei diesem Barrieredefekt um eine genetisch bedingte, also prädisponierende Veränderung handelt, sind in diversen Studien neben M. Crohn-Patienten auch deren Angehörige – genetisch Verwandte sowie Lebenspartner im gleichen Haushalt – untersucht worden. Die überwiegende Mehrzahl dieser Studien ergab eine Erhöhung der Permeabilität bei genetisch Verwandten (51, 53-57). Für eine primär durch Umwelt- oder Ernährungsfaktoren bedingte Störung, sprechen die Daten, die eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität auch bei nicht verwandten Lebenspartnern zeigen (54-55, 63). Eine interessante Studie aus Italien konnte bei sechs von 17 bis dato gesunden erstgradig Verwandten von M. Crohn-Patienten eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität nachweisen. In einer Kapselendoskopie zeigten sich dann bei vier erstgradig Verwandten

überraschenderweise entzündliche Veränderungen der Mukosa. In einer folgenden Koloskopie wurde in der Tat in allen Fällen ein M. Crohn diagnostiziert. Alle diese Individuen gehörten in die Gruppe der Probanden mit erhöhter intestinaler Permeabilität (64). Diese Daten legen nahe, dass die Messung der intestinalen Permeabilität auch als Screeninguntersuchung für asymptomatische Individuen mit hohem Erkrankungsrisiko für einen M. Crohn genutzt werden kann.

Über welche Mechanismen kann diese Störung der epithelialen Integrität erklärt werden? Da die genauen Ursachen nicht bekannt sind, gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt drei verschiedene Hypothesen: Die Erhöhung der intestinalen Permeabilität

1. entsteht primär durch einen genetisch bedingten Defekt innerhalb der epithelialen Barriere
2. ist ein rein sekundäres Phänomen als Folge der Entzündungsreaktion
3. entsteht durch einen Gendefekt, der zu einer Entzündungsreaktion führt, welche wiederum die Erhöhung der Permeabilität bedingt.

Für die verschiedenen Hypothesen gibt es – erwartungsgemäß – Argumente für und wider. Für einen genetisch bedingten Barriere Defekt sprechen Untersuchungen an Mausmodellen, wo eine intestinale Entzündung durch einen genetisch bedingten Epitheldefekt, beispielsweise in den Genen *MUC2* oder *NEMO*, bei normaler bakterieller Flora und normalem angeborenem und adaptivem Immunsystem (65-67) ausgelöst wird. Zudem sind bereits in Assoziationsstudien genetische Varianten für M. Crohn und Colitis ulcerosa entdeckt worden, die als direkte Regulatoren der epithelialen Integrität gelten (68-70).

Wichtige Entzündungsmediatoren, wie z.B. TNF α , können zu einer Erhöhung der Permeabilität führen (71-73). Eine Normalisierung der intestinalen Permeabilität kann andererseits durch die Therapie mit einem TNF α -Antagonisten (Infliximab) beobachtet werden (74).

Für die dritte Hypothese sprechen beispielsweise die funktionellen Daten der Mutationen im *NOD2*-Gen, welches eine starke Assoziation zum M. Crohn aufweist. Hier kommt es in der weiteren Signalkaskade zu Veränderungen der Defensin-Konzentrationen (75) oder zu erhöhter IL1 β -Konzentrationen (76), die jeweils eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität bedingen.

1.2.3 Rolle des angeborenen und des adaptiven Immunsystems

Gelangen Bakterien in die Darmmukosa, kommt es zu einer Konfrontation mit dem angeborenen (engl. innate) Immunsystem. Hierzu zählen insbesondere Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die mithilfe unspezifischer Abwehrmechanismen versuchen, die Bakterien via Phagozytose zu eliminieren. Diese angeborene Immunabwehr ist schnell und

unspezifisch, aber effektiv, generiert jedoch keine lang anhaltende Immunität. Die Erkennung von Bakterien erfolgt über so genannte „pattern recognition receptors (PPR)“: die membrangebunden Toll-like-Rezeptoren sowie als intrazelluläre Rezeptoren die „nucleotide binding site /leucine-rich repeat proteins (NBS/LRR)“. Zu den letzten gehören die „nucleotide-binding oligomerization domains“ NOD1 und NOD2. Diese Rezeptoren erkennen entweder LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien oder Peptidoglykan (PGN) aus der Zellwand grampositiver und – negativer Zellwände.

Falls die Infektion persistiert, kommt es durch das angeborene Immunsystem zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Antigen-präsentierende-Zellen (APCs) wie dendritische Zellen und M-Zellen präsentieren diese bakteriellen Antigene naiven T-Lymphozyten. In Abhängigkeit der kostimulatorischen Zytokine, welche durch die APCs sezerniert werden, kommt es zu einer Aktivierung von spezifischen Subpopulationen der T-Helferzellen: T_H1 , T_H2 oder T_H17 . Während T_H1 -Zellen wiederum Makrophagen und Effektor-T-Zellen aktivieren, stimulieren T_H2 -Zellen B-Zellen, welche im Darm in erster Linie zur Produktion von sekretorischem IgA führen. T_H17 -Zellen wiederum aktivieren neutrophile Granulozyten.

Die Identifikation von *NOD2* und *IL23R* als Suszeptibilitätsgene für den M. Crohn und im Fall von *IL23R* auch für die Colitis ulcerosa (77) legt nahe, dass sowohl das angeborene Immunsystem als auch die T_H17 -Subpopulation in der Pathogenese relevant sind.

Unabhängig von der Art der Stimulation sind proinflammatorische Zytokine an der Aufrechterhaltung der Inflammation beteiligt. Insbesondere $TNF\alpha$, IL-6 und IL-1 β wurden beim M. Crohn in der Mukosa erhöht nachgewiesen (78). Die Inhibition von $TNF\alpha$ durch monoklonale Antikörper stellte einen Durchbruch in der Therapie des M. Crohn dar (79).

1.3 Genetik im Fokus

Neue Aspekte der Pathophysiologie sind erst durch die Ergebnisse genetischer Studien identifiziert worden. Besonders hervorzuheben ist hierbei das angeborene Immunsystem (via *NOD2*), der Prozess der Autophagie (via *ATG16L1* und *IRGM*) sowie die Bedeutung der T_H17 -Subpopulation (via *IL23-R*, *JAK2* und *STAT3*).

1.3.1 Evidenz für einen genetischen Einfluss

Eine Unterstützung für die Hypothese eines genetischen Einflusses auf die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen resultiert aus einer Vielzahl unterschiedlicher Beobachtungen. Das relative Risiko (λ_s) ist beim M. Crohn 30-40fach und bei der Colitis ulcerosa 10-20fach erhöht. Für einen erstgradig Verwandten eines CED-Patienten besteht

ein Risiko von 5-10% für die Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (80).

Ist ein Elternteil an M. Crohn oder Colitis ulcerosa erkrankt, ist das relative Risiko eines Kindes zur Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung um das 2-30fache erhöht. Sind beide Eltern an einer CED erkrankt, erhöht sich das Risiko erneut: In einer Studie aus den USA erlitten hier 36% der Kinder ebenfalls eine chronisch entzündliche Darmerkrankung (81). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine französisch-belgische Erhebung: hierbei erkrankten durchschnittlich 1 von 3 Kindern bis zum Alter von 28 Jahren (82).

Zudem zeigen sich unterschiedliche Risiken für jeweils M. Crohn oder Colitis ulcerosa sowohl in Abhängigkeit des Geschlechts als auch des ethnischen Hintergrunds. Töchter erkranken etwas häufiger (83). Jüdische Populationen haben ein erhöhtes Risiko der Weitervererbung einer CED (84). In diesem Zusammenhang weisen insbesondere Ashkenazi-Juden ein 5-8fach erhöhtes Risiko auf (85).

Wesentliche Daten kommen von Zwillingsstudien. Beim M. Crohn haben eineiige Zwillinge eine Konkordanzrate (Häufigkeit, dass beide Zwillinge erkranken) von ca. 50%. Zweieiige Zwillinge haben hingegen eine Konkordanzrate von ca. 5-10% und unterscheiden sich somit nicht von der Erkrankungswahrscheinlichkeit für Familienangehörige. Bei der Colitis ulcerosa hingegen beträgt die Konkordanzrate zwischen 5% und 17% bei eineiigen Zwillingen und lediglich 0% bis 6% bei zweieiigen Zwillingen (Übersicht in 86). Der genetische Einfluss ist beim M. Crohn ausgeprägter als bei der Colitis ulcerosa. Zum anderen aber sind diese Daten ein Hinweis dafür, dass andere, nicht genetische Faktoren, beispielsweise der Komplex aus Ernährung/Umweltfaktoren/Infektionen, eine Rolle in der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielen.

1.3.2 Verschiedene Ansätze zur Identifikation von Risikogenen

M. Crohn und Colitis ulcerosa sind multifaktorielle und polygene Erkrankungen, deren Vererbung nicht nach den Mendelschen Gesetzen erfolgt. In den letzten Jahren haben sich Ansatz und Methode der Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen stark gewandelt. Der hypothesengesteuerte Kandidatengenansatz ist durch den hypothesenfreien Ansatz der Kopplungsanalysen und genomweiten Assoziationsstudien weitestgehend ersetzt worden.

Hypothesen-getriggert: der Kandidatengenansatz

Initial wurde die Identifikation von Suszeptibilitätsgenen über den Kandidatengenansatz versucht. Hierbei wurden in erster Linie Gene untersucht, deren Transkript in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine Rolle spielen könnte. Erste publizierte Arbeiten untersuchten hier *HLA*-Gene (87), den Komplementfaktor *C3* (88) sowie Polymorphismen im *T-Zell-Rezeptor* (89). Allerdings konnten erste positive Assoziationen im

Verlauf nicht bestätigt werden. Bis zum Jahr 2001 wurde mit diesem Ansatz kein replizierbares Kandidatengen für entweder M. Crohn oder Colitis ulcerosa identifiziert.

Hypothesen-frei: Kopplungsanalysen (Linkage) und genomweite Assoziationsstudien

Ein großer Fortschritt war die Einführung von Kopplungsanalysen (Engl. linkage analysis). Diese genomweiten und hypothesenfreien Kopplungsuntersuchungen wurden innerhalb von Familien mit mehreren CED-Patienten (u.a. 90) durchgeführt.

Kopplungsanalysen beruhen auf dem Prinzip, dass Geschwisterkinder oder andere Familienangehörige mit der gleichen Erkrankung in der genomischen Region, in der ein Risikogen liegt, dieselbe genetische Variante oder Merkmal dieser Region geerbt haben. Somit besteht eine Kopplung zwischen der Erkrankung und dieser genomischen Region, z.B. einem Abschnitt auf einem Chromosom. Auf diese Weise gelangt man vom gesamten menschlichen Genom zu deutlich kleineren Abschnitten von Chromosomen, innerhalb derer ein Risikogen vermutet wird. Im nächsten Schritt kann man dann beispielsweise alle Gene innerhalb dieses – deutlich kleineren - Abschnitts bezüglich eines Suszeptibilitätsgens analysieren.

Genomweite Kopplungsanalysen haben eine Vielzahl von suspekten Chromosomenabschnitten für entweder M. Crohn und/oder Colitis ulcerosa ergeben. Falls diese Regionen in weiteren Kopplungsanalysen repliziert wurden, erhielten sie das Kürzel IBD und eine laufende Nummer. Bislang wurden die folgenden Chromosomenregionen beschrieben, auf denen ein CED-Risikoallel vermutet wird: 16q12 (IBD1), 12q13 (IBD2), 6p13 (IBD3), 14q11-12 (IBD4), 5q31-33 (IBD5), 19p13 (IBD6) sowie 1p36 (IBD7).

Im Jahr 2001 gelang zeitgleich drei verschiedenen Arbeitsgruppen aus Frankreich, den USA und Deutschland die Entdeckung des ersten CED-Risikogens innerhalb der IBD1-Region (45, 91-92): drei Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen zeigten eine Assoziation zum M. Crohn: zwei Missense-Mutationen mit Aminosäureaustausch (p.Arg702Trp und p.Gly908Arg) und eine Frameshift-Mutation (p.Leu1007fs). Auf regionale Unterschiede, Funktion sowie klinische Implikationen der *NOD2*-Mutation wird detailliert an anderer Stelle eingegangen.

Mit Ausnahme der *NOD2*-Mutation auf dem IBD1 sind alle weiteren krankheitsverursachenden Mutationen der Loci IBD2-7 noch nicht identifiziert. Besonders stark zeigt sich dieses Dilemma bei Betrachtung der Region IBD5 auf dem Chromosomenabschnitt 5q31-33. Eine Assoziation konnte hier zunächst zu einem Haplotyp beschrieben werden, der durch 12 SNPs charakterisiert ist (93). Trotz der Tatsache, dass in dieser Region eine Reihe interessanter Kandidatengene lokalisiert sind - interferon regulatory factor 1 (*IRF1*) oder organic cation transporter (*OCTN1/2*) – bleibt das kausale Gen in dieser Region unbekannt (94).

Innerhalb des IBD2-Lokus befindet sich die HLA-Region. Auch wenn hier trotz diverser Studien keine generelle Assoziation zu entweder M. Crohn oder Colitis ulcerosa gefunden werden konnte, scheint die Region einen Zusammenhang zu bestimmten Subtypen aufzuweisen: Der HLA-Haplotyp DRB1 * 0103 erhöht das Risiko für eine proximale Ausbreitung der Colitis ulcerosa und für extraintestinale Komplikationen (95) sowie für einen Kolonbefall beim M. Crohn (96).

Für alle weiteren Regionen (IBD3, IBD4, IBD6 und IBD7) sind nicht einmal Assoziationen zu Subtypen beschrieben worden. Die Ergebnisse der Kopplungsanalysen werden zudem seit der Durchführung der im folgenden erläuterten genomweiten Assoziationsstudien kritisch betrachtet, da ein Großteil dieser Regionen hier nicht repliziert werden konnte. Hier muss jedoch angemerkt werden, dass die Kopplungsanalysen in Familien durchgeführt wurden. Patienten mit familiärem M. Crohn machten in den genomweiten Assoziationsstudien mit z.B. nur 15% der eingeschlossenen Patienten eine Minderheit aus. Dennoch waren die Erkenntnisse der Kopplungsanalysen zur Identifizierung insbesondere des *NOD2*-Gens von entscheidender Bedeutung.

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Ein erneuter Durchbruch hat sich in den letzten Jahren durch die Durchführung genomweiter Assoziationsstudien ergeben. Grundlagen hierfür waren eine Vielzahl von Faktoren: die Erforschung des menschlichen Genoms durch bedeutsame Projekte wie HapMap (International HapMap Project, <http://www.hapmap.org/>), neue kommerzielle Techniken der Genotypisierung sowie erweiterte informatische oder statistische Methoden. Zudem wurde durch Kooperationen die statistische Aussagekraft der Studien erhöht.

Bei einer genomweiten Assoziationsstudie wird ähnlich wie bei den Kopplungsanalysen aber im Unterschied zur Kandidatengenanalyse hypothesenfrei agiert. Durch das HapMap-Projekt wurde nicht nur eine Katalogisierung der SNPs durchgeführt, sondern die Beziehung der SNPs zueinander beschrieben. Hierbei handelt es sich um die so genannte Haplotyp-Struktur, die die gleichartige Weitervererbung von SNPs beschreibt. Bestimmte SNPs - tagging-SNPs - stehen hier stellvertretend für eine Vielzahl von weiteren in einem bestimmten Haplotyp befindlichen SNPs. Diese sind in enger Nachbarschaft mit der vermeintlich kausalen Variante lokalisiert. Diese Varianten werden somit von Generation zu Generation zusammen vererbt, da die Wahrscheinlichkeit einer Trennung während der Rekombination unwahrscheinlich ist.

In den genomweiten Assoziationsstudien können somit durch die Analyse der tagging-SNPs Informationen über die in diesem Haplotyp befindlichen SNPs eingeholt werden, ohne diese selbst zu analysieren. Neuere Chips sind in der Lage, über eine Million SNPs, verteilt über das gesamte Genom, zu analysieren. Von entscheidender Bedeutung ist hier zudem die

Korrektur bei multiplen Testen, so dass hier sehr strenge p-Werte für eine Signifikanz erwartet werden ($p < 5 \times 10^{-8}$). Allerdings ergeben die Daten der genomweiten Assoziationsstudien nicht unbedingt die verursachenden Mutationen, sondern beschreiben genomische Regionen unterschiedlicher Größe, in der sich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine krankheitsassoziierte Variante befindet.

Interessante Kandidatengene aus den Regionen werden herausgesucht und via Sequenzierung weiter analysiert, allerdings befinden sich viele der CED-assoziierten Varianten in Regionen, wo keine Gene vorhanden sind (sog. „gene desert“). Unabhängig davon könnten diese SNPs auch einen regulatorischen Einfluss auf Quantität und Qualität von Proteinen haben. Bis dato fehlen allerdings funktionelle Studien, die die Auswirkungen solcher Varianten beschreiben.

Mit Hilfe der genomweiten Assoziationsstudien wurde in kurzer Zeit eine Vielzahl von neuen Suszeptibilitätsgenen entdeckt. Entscheidende Durchbrüche gelangen im Jahr 2007 mit der Entdeckung von zwei neuen CED-Suszeptibilitätsgenen: *IL23R* (77) und *ATG16L1* (46). Erst hierdurch sind Erkenntnisse zum Stellenwert neuer pathophysiologischer Konzepte gewonnen worden: den Prozess der Autophagie und die Rolle der T_H17 -Subpopulation.

In einer kürzlich veröffentlichten Meta-Analyse wurden die Daten von drei genomweiten Assoziationsstudien zusammengefasst, die alleine 32 mit dem M. Crohn assoziierte Varianten beschreiben (97). Dennoch geht man davon aus, dass diese Varianten zusammen nur 20% des gesamten genetischen Einfluss beim M. Crohn ausmachen. Interessanterweise haben auch die neuesten genomweiten Assoziationsstudien den *NOD2*-Varianten das höchste Erkrankungsrisiko für den M. Crohn zugeschrieben (OR 3,99). Andere Varianten haben meist Odds Ratios von 1,1-1,5 und somit nur einen sehr moderaten Effekt (97).

Im Verlauf sind nun ebenfalls genomweite Assoziationsstudien bei Patienten mit Colitis ulcerosa veröffentlicht worden. Eine Arbeitsgruppe aus Kiel identifizierte drei Gene: *ECM1* (extracellular matrix 1), *ARPC2* (actin-related protein 2/3 complex subunit 2 gene) und *IL10* (98). Besonders *IL10* scheint hier von besonderem Interesse, da es unter anderem an der Stimulation naiver T-Zellen beteiligt ist. Zudem konnten mit Varianten in den Genen *IL23R* und *IL12B* erstmalig Marker identifiziert werden, die sowohl mit M. Crohn als auch mit Colitis ulcerosa assoziiert sind (98).

Zusammenfassend haben die genomweiten Assoziationsstudien einen deutlichen Erkenntniszuwachs im Hinblick auf den genetischen Hintergrund chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ergeben. Allerdings sind überwiegend die vermeintlich kausalen Mutationen nicht bekannt. Hier müssen sowohl weitere Sequenzierungen als auch funktionelle Untersuchungen erfolgen.

1.4 Herleitung von Aufgabenstellungen

Verschiedene Methoden und Ansätze haben in den letzten Jahren mehr als 40 Varianten identifiziert, die eine Assoziation zu M. Crohn und/oder Colitis ulcerosa aufweisen. Trotzdem ist eine Vielzahl weiterer Mutationen noch unbekannt. Neben diesen Erkenntnissen, welche langfristig zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen könnten, muss aus klinischer Sicht in erster Linie untersucht werden, inwiefern eine Genotypisierung im klinischen Alltag nutzbar ist.

Die im Folgenden zitierten Originalarbeiten auf diesem Gebiet haben somit folgende Aspekte behandelt:

1. Identifikation von genetischen Varianten, die eine Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder im speziellen mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa aufweisen?
2. Wie unterscheiden sich Merkmalsträger und Nichtmerkmalsträger einer bestimmten Variante hinsichtlich ihrer klinischen Ausprägung?
 - a. Erkranken diese Patienten früher?
 - b. Gibt es Assoziationen zu Raucherstatus, Befallsmuster oder extraintestinalen Manifestationen?
 - c. Lassen sich Komplikationen wie das Auftreten von Fisteln, Stenosen oder Operationen vorhersagen?
3. Kann durch die Genotypisierung das Ansprechen bzw. das Auftreten von Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie besser vorhersagen?
4. Können vorbeschriebenen Assoziationen in europäischen CED-Kollektiven repliziert werden? Finden sich regionale Unterschiede in der Häufigkeit der Mutationen in Europa?
5. Lässt sich das ungeklärte Phänomen der intestinalen Barrierestörung beim M. Crohn durch eine oder durch das Zusammenwirken verschiedener Mutationen erklären?
6. Bestehen genetische Interaktionen zwischen den einzelnen Varianten, genannt Epistase?

An der Charité Berlin wurde eine große Kohorte aus CED-Patienten zusammengestellt. Neben der DNA-Isolation wurden klinische Daten gesammelt: Alter bei Erstdiagnose/Erstsymptomatik, Befallsmuster, Komplikationen inklusive Art und Häufigkeit von Operationen, Raucherstatus, Ansprechen auf die medikamentöse Therapie etc. Als Kontrollgruppe wurden gesunde Probanden eingeschlossen, welche nach Alter und Geschlecht den Patientengruppen angeglichen wurden. Durch intensive Kooperationen mit zwei weiteren europäischen Zentren (Szeged/Ungarn und Nijmegen/Holland) konnten weitere CED-Kohorten eingeschlossen werden. Somit wurde ein europäisches Konsortium

bestehend aus Deutschland, Ungarn und Holland zusammengestellt, welches die Untersuchungskollektive der folgenden Arbeiten darstellt.

2 Originalarbeiten

2.1 Mutationen im *NOD2/CARD15*-Gen beim M. Crohn sind mit Ileozökalresektionen assoziiert und sind ein Risikofaktor für Reoperationen

Carsten Büning, Janine Genschel, Sabine Bühner, Sandrine Krüger, Kerstin Kling, Axel Dignass, Peter Baier, Bettina Bochow, Johann Ockenga, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. Mutations in the *NOD2/CARD15* gene in Cohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 19: 1073 -1079.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Häufigkeit der drei wichtigsten *NOD2*-Mutationen in der deutschen Kohorte untersucht. Zudem wurde eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse durchgeführt.

Insgesamt trugen 35,6% der M. Crohn-Patienten ein mutiertes Allel in einer der untersuchten *NOD2*-Mutationen und somit signifikant häufiger als Colitis ulcerosa (14,3%) und Kontrollen (15,5%). Die Genotyp-Phänotyp-Analyse ergab eine Reihe interessanter Befunde: Wir konnten zunächst eine Assoziation zu jüngerem Erkrankungsalter sowie zu einem Befall des terminalen Ileums beobachten, nur 6,2% der Patienten mit *NOD2*-Mutation hatten keinen Befall des terminalen Ileums. Interessanterweise zeigte sich zudem eine starke Assoziation zu Resektionen spezifisch für den Ileozökalbereich, nicht jedoch für andere Ileumresektionen und Kolonresektionen: in der mittleren Beobachtungszeit von ca. 8 Jahren wurden bei 45,3% bei den *NOD2*-positiven und bei nur 19,0% der *NOD2*-negativen Patienten eine Ileozökalresektion durchgeführt. Eine logistische Regressionsanalyse ergab zudem, dass dies unabhängig vom Befall des terminalen Ileums war. Nach der initialen Resektion konnten wir zudem zeigen, dass Patienten mit *NOD2*-Mutation ein deutlich höheres Risiko einer erneuten Resektion im neoterminalen Ileum aufwiesen: während es bei nur 9,1% der *NOD2*-negativen Patienten zu einem operativen Rezidiv kam, war dies in 41,4% der *NOD2*-positiven Patienten der Fall. Mehr als eine weitere Nachresektion wurde auch nur bei *NOD2*-positiven Patienten durchgeführt.

Diese Daten legen nahe, dass die Bestimmung der *NOD2*-Mutation genutzt werden kann, um Patienten mit hohem operativem Rezidivrisiko zu identifizieren. Prospektive Studien sollten evaluieren, ob *NOD2*-positive M. Crohn-Patienten beispielsweise früher und aggressiver behandelt werden sollten.

Carsten Büning, Janine Genschel, Sabine Bühner, Sandrine Krüger, Kerstin Kling, Axel Dignass, Peter Baier, Bettina Bochow, Johann Ockenga, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Cohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 19: 1073 -1079.

Carsten Büning, Janine Genschel, Sabine Bühner, Sandrine Krüger, Kerstin Kling, Axel Dignass, Peter Baier, Bettina Bochow, Johann Ockenga, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Cohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 19: 1073 -1079.

Carsten Büning, Janine Genschel, Sabine Bühner, Sandrine Krüger, Kerstin Kling, Axel Dignass, Peter Baier, Bettina Bochow, Johann Ockenga, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Cohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 19: 1073 -1079.

Carsten Büning, Janine Genschel, Sabine Bühner, Sandrine Krüger, Kerstin Kling, Axel Dignass, Peter Baier, Bettina Bochow, Johann Ockenga, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Cohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 19: 1073 -1079.

Carsten Büning, Janine Genschel, Sabine Bühner, Sandrine Krüger, Kerstin Kling, Axel Dignass, Peter Baier, Bettina Bochow, Johann Ockenga, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Cohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 19: 1073 -1079.

Carsten Büning, Janine Genschel, Sabine Bühner, Sandrine Krüger, Kerstin Kling, Axel Dignass, Peter Baier, Bettina Bochow, Johann Ockenga, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Cohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004, 19: 1073 -1079.

2.2 *NOD2/CARD15* Polymorphismen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Gibt es in Ungarn Unterschiede?

Carsten Büning, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Renita Weltrich, Bettina Bochow, Janine Genschel, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. *NOD2/CARD15* gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? *World Journal of Gastroenterology*, 2005;11:407-11.

Im Rahmen dieser Studie wurde erstmalig die Häufigkeit von *NOD2*-Mutationen in einer Kohorte von Patienten mit CED aus Ungarn beschreiben. Zudem wurde die in der deutschen Patientengruppe aufgestellte Hypothese überprüft, ob *NOD2*-Mutationen tatsächlich mit einer aggressiven Verlaufsform des M. Crohn assoziiert sind. Es zeigten sich ähnliche Allelfrequenzen der *NOD2*-Mutation bei M. Crohn-Patienten im Vergleich zur deutschen Kohorte: 32,4% der M. Crohn-Patienten waren positiv, signifikant mehr als bei Colitis ulcerosa-Patienten (13,2%) und bei den Kontrollen (11,5%). Interessanterweise zeigte sich hier, dass nur die p.Leu1007fs-Mutation im *NOD2*-Gen mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert ist. p.Leu1007fs-positive-Patienten neigten signifikant häufiger zur Ausbildung von Stenosen. Ähnlich der deutschen Kohorte, wurde bei 51,9% der p.Leu1007fs -positiven Patienten und nur bei 17,4% der p.Leu1007fs-negativen Patienten eine Resektion spezifisch für den Ileumbereich durchgeführt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *NOD2*-Mutationen in vergleichbarer Häufigkeit in Ungarn vorkommen. Die p.Leu1007fs-Mutation führt zudem zu einer aggressiven Verlaufsform mit Ausbildung von Stenosen und häufigen Ileumresektionen.

Carsten Büning, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Renita Weltrich, Bettina Bochow, Janine Genschel, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? World Journal of Gastroenterology, 2005;11:407-11.

Carsten Büning, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Renita Weltrich, Bettina Bochow, Janine Genschel, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? World Journal of Gastroenterology, 2005;11:407-11.

Carsten Büning, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Renita Weltrich, Bettina Bochow, Janine Genschel, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? World Journal of Gastroenterology, 2005;11:407-11.

Carsten Büning, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Renita Weltrich, Bettina Bochow, Janine Genschel, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? World Journal of Gastroenterology, 2005;11:407-11.

Carsten Büning, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Renita Weltrich, Bettina Bochow, Janine Genschel, Hartmut Schmidt, Herbert Lochs. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? World Journal of Gastroenterology, 2005;11:407-11.

2.3 Der genetische Hintergrund der erhöhten intestinalen Permeabilität in Familien mit M. Crohn: Spielt die *NOD2*-Mutation 3020insC eine Rolle?

Sabine Bühner, Carsten Büning, Janine Genschel, Kerstin Kling, Dana Herrmann, Axel Dignass, Ingeborg Küchler, Sandrine Krüger, Hartmut H.-J. Schmidt, Herbert Lochs. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Cohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006;55:342-7.

Neben der oben beschriebenen Assoziation zwischen *NOD2*-Mutationen und einem aggressiven Phänotyp des M. Crohn wurde in dieser Studie untersucht, ob *NOD2*-Mutationen für ein weiteres - bislang ungeklärtes - Phänomen verantwortlich sein könnten. Gibt es einen Zusammenhang zwischen *NOD2*-Mutationen und dem epithelialen Barrieredefekt beim M. Crohn?

In diesem Zusammenhang wurde evaluiert, ob diese Barriestörung eher genetisch oder durch Umweltfaktoren bedingt ist. Um eine solche Differenzierung zu erhalten, wurde eine Familienstudie durchgeführt: neben M. Crohn-Patienten und Kontrollen wurden erstgradig Verwandte und im gleichen Haushalt lebende Angehörige (z.B. Ehefrau/Ehemann), eingeschlossen. Die intestinale Permeabilität wurde mit Hilfe eines oralen Zuckertest mit anschließender Urinsammlung gemessen, hierbei diente das Lactulose/Mannitol-Verhältnis als Marker der intestinalen Permeabilität. Insgesamt wurden 128 M. Crohn-Patienten in Remission, 129 erstgradig Verwandte, 66 nicht Verwandte, aber im gleichen Haushalt lebende Personen sowie 96 gesunde Kontrollen eingeschlossen.

Eine erhöhte intestinale Permeabilität zeigte sich signifikant häufiger bei M. Crohn-Patienten (44%) und bei den erstgradig Verwandten (26%) als bei den Nicht-Verwandten (6%) und den Kontrollen (0%). Bei den erstgradig Verwandten war eine Erhöhung der Permeabilität unabhängig davon, ob diese Personen im gleichen Haushalt mit den Patienten lebten oder nicht. Interessanterweise ergab sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p.Leu1007fs-Mutation (3020insC) und der Erhöhung der intestinalen Permeabilität: während nur 16% der Verwandten ohne *NOD2*-Mutationen eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität aufwiesen, war dies bei 46% der *NOD2*-positiven Verwandten der Fall.

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse ein klarer Beleg für einen genetisch bedingten Barrieredefekt beim M. Crohn. Mit der p.Leu1007fs-Mutation konnte erstmalig eine genetische Variante identifiziert werden, die mit dieser epithelialen Barriestörung assoziiert ist.

Sabine Bühner, Carsten Büning, Janine Genschel, Kerstin Kling, Dana Herrmann, Axel Dignass, Ingeborg Kuchler, Sandrine Krüger, Hartmut H.-J. Schmidt, Herbert Lochs. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Cohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006;55:342-7.

Sabine Bühner, Carsten Büning, Janine Genschel, Kerstin Kling, Dana Herrmann, Axel Dignass, Ingeborg Kuchler, Sandrine Krüger, Hartmut H.-J. Schmidt, Herbert Lochs. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Cohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006;55:342-7.

Sabine Bühner, Carsten Büning, Janine Genschel, Kerstin Kling, Dana Herrmann, Axel Dignass, Ingeborg Küchler, Sandrine Krüger, Hartmut H.-J. Schmidt, Herbert Lochs. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Cohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 2006;55:342-7.

Sabine Bühner, Carsten Büning, Janine Genschel, Kerstin Kling, Dana Herrmann, Axel Dignass, Ingeborg Kuchler, Sandrine Krüger, Hartmut H.-J. Schmidt, Herbert Lochs. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Cohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006;55:342-7.

Sabine Bühner, Carsten Büning, Janine Genschel, Kerstin Kling, Dana Herrmann, Axel Dignass, Ingeborg Kuchler, Sandrine Krüger, Hartmut H.-J. Schmidt, Herbert Lochs. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Cohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006;55:342-7.

Sabine Bühner, Carsten Büning, Janine Genschel, Kerstin Kling, Dana Herrmann, Axel Dignass, Ingeborg Kuchler, Sandrine Krüger, Hartmut H.-J. Schmidt, Herbert Lochs. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Cohn's disease: Role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006;55:342-7.

2.4 *DLG5*-Varianten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. *DLG5* variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

Unmittelbar nach unserer Beschreibung der Assoziation zwischen der erhöhten intestinalen Permeabilität und der p.Leu1007fs-Mutation im *NOD2*-Gen wurde ein weiteres Risikogen für den M. Crohn entdeckt: eine Arbeitsgruppe aus Kiel beschrieb eine signifikante Assoziation zwischen dem M. Crohn und Varianten im *DLG5*-Gen. *DLG5* ist an Zell-Zell-Verbindungen lokalisiert und wahrscheinlich an der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität beteiligt. Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir die Häufigkeit von insgesamt sechs verschiedenen *DLG5*-Varianten in den Kohorten aus Deutschland und Holland. Das Hauptaugenmerk galt zudem einer Verbindung zwischen *DLG5*-Varianten und den Ergebnissen der intestinalen Permeabilität.

Nach der Analyse von 668 CED-Patienten verglichen mit 627 Kontrollen konnte interessanterweise kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Allel- und Genotypfrequenz zwischen Patienten mit M. Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen festgestellt werden. Auch eine Genotyp-Phänotyp-Analyse brachte kein signifikantes Ergebnis, zudem ließ sich keine Epistase zwischen *DLG5* und *NOD2* nachweisen. Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen *DLG5* und einer Störung der intestinalen Permeabilität nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte diese Analyse zweier großer europäischer Kohorten nicht bestätigen, dass *DLG5* ein Risikogen für den M. Crohn darstellt. Zudem scheint es in der Entstehung des epithelialen Barriere-defekts beim M. Crohn nicht involviert zu sein.

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. DLG5 variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. DLG5 variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. DLG5 variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. DLG5 variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. DLG5 variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. DLG5 variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

Carsten Büning, Lars Geerds, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Ghyslaine Pitre, Wolf Reuter, Werner Luck, Sabine Bühner, Tomas Molnar, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Axel Dignass, Olfert Landt, Renate Nickel, Janine Genschel, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. DLG5 variants in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.

2.5 Heterozygotität für die *IL23R*-Variante p.Arg381Gln stellt einen schützenden Effekt gegenüber M. Crohn und Colitis ulcerosa dar

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for *IL23R* p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Ein weiterer Durchbruch gelang im Jahre 2006 mithilfe einer genomweiten Assoziationsstudie aus den USA durch die Entdeckung von *IL23R* als Suszeptibilitätsgen sowohl für M. Crohn als auch Colitis ulcerosa. Die p.Arg381Gln-Mutation im *IL23R*-Gen wies in dieser Studie einen protektiven Effekt auf.

Bis dato waren Populationen aus Deutschland und Ungarn noch nicht untersucht worden. Durch eine Kooperation mit der Universität Nijmegen aus Holland wurde in dieser Studie eine weitere europäische Kohorte analysiert werden. Zudem untersuchten wir einen Einfluss der p.Arg381Gln-Mutation auf das klinische Erscheinungsbild sowie genetische Interaktionen zu *NOD2*-Mutationen. Weiterhin stellten wir die Hypothese auf, dass p.Arg381Gln die gastrointestinale Permeabilität beeinflusst. Eingeschlossen wurden insgesamt 919 CED-Patienten und 845 gesunde Kontrollen. Beispielhaft seien hier einmal drei Kohorten erwähnt: Deutschland (MC: n=318; CU: n=178), Ungarn (MC n=148; CU: n=118), und Holland (MC: n=157).

Es zeigte sich eine signifikant niedrigere Allelfrequenz für das Glutamin-Allel innerhalb p.Arg381Gln bei CED-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ($p < 0.000001$, Cochran-Mantel-Haenszel-Test). Auch in der Subgruppenanalyse der einzelnen Länder zeigten sich signifikante Assoziationen (Deutschland $p=0.001$, Ungarn $p=0.02$, und Holland $p=0.0002$). Eine ähnliche Allelfrequenz zeigte sich im Vergleich zwischen M. Crohn und Colitis ulcerosa. Hinweise für Epistase zu *NOD2*-Mutationen, eine Assoziation zum Phänotyp oder zur intestinalen Permeabilität ließen sich für p.Arg381Gln nicht nachweisen.

Zusammenfassend konnten hier in der Tat bestätigt werden, dass p.Arg381Gln im *IL23R*-Gen einen protektiven Effekt gegenüber M. Crohn und Colitis ulcerosa darstellt, aber das klinische Erscheinungsbild nicht beeinflusst.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

Carsten Büning, Hartmut H.-J. Schmidt, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Deike Weiss, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Joost PH Drenth, George V.Z. Dedoussis, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs & Heiko Witt, Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers protection against Crohn's disease but also against ulcerative colitis. *Alimentary and Pharmacology & Therapeutics*, 2007;26:1025-33.

2.6 Eine Studie in drei Europäischen Kohorten bestätigt: *ATG16L1* p.Thr300Ala ist ein Suszeptibilitätsfaktor für den M. Crohn

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

Ebenfalls mit Hilfe einer genomweiten Assoziationsstudie gelang einer Kieler Arbeitsgruppe die Identifizierung eines weiteren Gens für den M. Crohn: Die Missense-Mutation p.Thr300Ala im Autophagie-Gen *ATG16L1*. Auch hier war bis dato keine Assoziation zum Phänotyp beschrieben worden, so in dieser Studie zunächst eine Replikation bei insgesamt 919 CED-Patienten und 707 Kontrollen durchgeführt wurde. In der deutschen und in der holländischen Kohorte ergab sich eine klare Assoziation zwischen p.Thr300Ala und dem M. Crohn, ebenfalls zeigte sich in der ungarischen Patientenpopulation ein klarer Trend. Keiner der drei Populationen wies eine Assoziation zwischen p.Thr300Ala und Colitis ulcerosa auf. Auch wenn kein definierter Phänotyp für p.Thr300Ala identifiziert werden konnte, zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass p.Thr300Ala einen weiteren Suszeptibilitätsmarker für den M. Crohn, jedoch nicht für die Colitis ulcerosa darstellt. Diese Beobachtungen legen eine wichtige Rolle für den Prozess der Autophagie in der Pathogenese des M. Crohn dar.

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

Carsten Büning, Tahir Durmus, Tamas Molnar, Dirk J de Jong, Joost PH Drenth, Thomas Fiedler, Enno Gentz, Theodor Todorov, Verena Haas, Sabine Bühner, Andreas Sturm, Daniel C. Baumgart, Ferenc Nagy, Janos Lonovics, Olfert Landt, Andreas Kage, Herbert Büning, Renate Nickel, Janine Büttner, Herbert Lochs, Hartmut H.-J. Schmidt, Heiko Witt. 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 Crohn's and Colitis*, 2008.

3 Diskussion

3.1 Aufgaben der molekulargenetischen Diagnostik aus klinischer Sicht

CED-Patienten haben ein großes Interesse an genetischen Untersuchungen, auch wenn zum gegenwärtigen Zeitpunkt deren Aussagekraft noch begrenzt ist (99). Neue Ansätze und Techniken, hierbei seien insbesondere die Erkenntnis der genomweiten Assoziationsstudien erwähnt, haben zu einem immensen Fortschritt geführt. Aus klinischer Sicht ist das Einbringen von genetischen Markern in erster Linie relevant, wenn sie im Sinne der Patienten genutzt werden können, um beispielsweise eine bessere Vorhersage des Krankheitsverlaufs treffen zu können. Pharmakogenetische Studien sollen zudem die medikamentöse Standardtherapie individualisieren.

3.2 Der Einfluss des *NOD2*-Gen auf den M. Crohn

Die Bestimmung von *NOD2*-Mutationen bei Patienten mit M. Crohn könnte von klinischem Nutzen sein. Innerhalb des *NOD2*-Gens haben in erster Linie drei verschiedene Mutationen eine Assoziation zum M. Crohn gezeigt. Hierbei handelt es sich um zwei Missense-Mutationen mit Aminosäureaustausch (p.Arg702Trp und p.Gly908Arg) und eine Frameshift-Mutation (p.Leu1007fs). In den Analysen dieser Mutationen in Deutschland und Ungarn zeigte sich für den M. Crohn eine Assoziation zu einem bestimmten Phänotyp: jüngeres Erkrankungsalter, Befall des terminalen Ileums, Ausbildung von Stenosen, Operationen im Bereich des Ileums, hoher Risikofaktor für Rezidivoperationen. Dieser Verlauf scheint somit deutlich aggressiver zu sein (100, 101).

3.2.1 Biologische Funktion *NOD2*

NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der beispielsweise in Monozyten, dendritischen Zellen sowie Paneth-Zellen vorkommt. *NOD2* ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems, dem Frühwarnsystems für die Erkennung von bakteriellen Krankheitserregern. *NOD2* besitzt zwei N-terminale „caspase activation recruitment domains“ (CARDs), eine zentrale „nucleotide oligomerisation domain (NOD)“ und eine c-terminale „leucin rich repeat domain (LRR)“. *NOD2* erkennt das sogenannte Muramyldipeptid (MDP), welches die minimal bioaktive Form des Peptidoglykan darstellt und ein wesentlicher Bestandteil grampositiver und gramnegativer Zellwände ist. MDP wird von der LRR („leucin rich region“) des *NOD2* erkannt. Hierdurch kommt es zur Aktivierung von NF- κ B. Die drei gängigen *NOD2*-Mutationen liegen alle innerhalb oder in der Nähe dieser LRR. *NOD2* vereint somit drei eminent wichtige Faktoren in der Pathogenese des M. Crohn - Mutation, Abwehrsystem und

Bakterien- und passt somit perfekt in die augenblickliche Arbeitshypothese für dessen Entstehung: gestörte Immunantwort gegenüber Bakterien bei genetischer Prädisposition.

Haben *NOD2*-Mutationen einen Einfluss auf die bakterielle Antigenerkennung und über welche Mechanismen kommt es zur chronischen Entzündung?

Initial wurde postuliert, dass diese LR-Region bei den M. Crohn-assoziierten *NOD2*-Mutationen gestört ist, wodurch es zu einer defekten NF- κ B-Aktivierung in Monozyten kommt (45). Auch wenn *NOD2*-Knockout-Mäuse keine spontane Colitis entwickeln (102), geben Studien an Mäusen erste Hinweise. *NOD2*-Knockout-Mäuse oder das Vorhandensein einer dem M. Crohn ähnlichen Mutation führen – TLR2-vermittelt - zu einer verstärkten NF- κ B-c-Rel-Aktivierung mit Stimulation einer T_H1-Antwort. *NOD2* scheint somit einen regulatorischen Effekt auf NF- κ B-c-Rel haben. *NOD2*-Mutationen konnten in dieser Studie die durch NF- κ B-c-Rel vermittelte Aktivierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 nicht kontrollieren, was zur Unterhaltung der chronischen Entzündung führen könnte (103). Somit würde es sich um eine „loss-of-function“-Mutation handeln.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass *NOD2* notwendig für die Produktion einer Subgruppe von antibakteriellen intestinalen Peptiden ist, den so genannten Kryptidinen (75). Mangel an solchen Kryptidinen könnte die Aufnahme beispielsweise von Bakterien oder deren Bestandteilen erhöhen. Auch in humanen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit *NOD2*-Mutationen vermindert Defensine – das humane Korrelat der Kryptidine – aufwiesen (104). Diese Daten legen nahe, dass es sich bei den *NOD2*-Mutationen ebenfalls um eine Loss-of-Function-Mutation handelt. Zudem führt der Mangel an Kryptidinen zu einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität. Diese Daten legen somit nahe, dass *NOD2* direkt die intestinale Permeabilität beeinflussen kann. Passend hierzu sind weitere Daten in vivo, die einen Zusammenhang zwischen der p.Leu1007fs-Mutation im *NOD2*-Gen zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität zeigen (105).

Eine weitere Studie, wo eine der humanen p.Leu1007fs-Mutation in Mäusen erzeugt wurde, zeigte im Gegensatz zu den vorherbeschriebenen Ergebnissen eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung nach MDP-Stimulation sowie eine erhöhte Produktion von IL-1 β . Dies führte jedoch zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber einer durch Bakterien-getriggerten Inflammation (76). Allerdings sind diese Daten an Mäusen erhoben worden. Kürzlich konnten bei Patienten mit M. Crohn entgegengesetzte Ergebnisse beobachtet werden. Hier führte bei Patienten homozygot für die p.Leu1007fs-Mutation die Stimulation von peripheren mononukleären Zellen zu einer deutlich verminderten IL-1 β -Produktion (106, 107).

Weitere Funktionen sind für *NOD2* beschrieben worden. Neben der Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen aktiviert *NOD2* zudem verschiedene MAPK-Signalwege, wie z.B. ERK, p38 und JNK. Des Weiteren zeigt es synergistische Effekte mit den TLRs in der Stimulation der Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Übersicht in 108).

Zusammenfassend geben diese und eine Vielzahl anderer Studien zwar erste wichtige Hinweise über die Funktion von *NOD2* und dessen Mutationen. Diese sind jedoch teilweise kontrovers, so dass der genaue Einfluss der *NOD2*-Mutationen auf die Entstehung des M. Crohn weiterhin unbekannt ist.

3.2.2 Regionale Unterschiede der *NOD2*-Mutation

Bei der Analyse dieser Mutationen in Populationen mit M. Crohn hat es in den verschiedenen Untersuchungen weltweit deutliche Unterschiede gegeben. In einer deutschen Kohorte zeigten sich Allelfrequenzen von 7,2% für die p.Arg702Trp-Variante, 4,2% für die p.Gly908Arg-Variante und 12,2% für die Frameshift-Mutation p.Leu1007fs (100). In einer ungarischen Kohorte zeigten sich ähnliche Allelfrequenzen (p.Arg702Trp: 7,1%, p.Gly908Arg: 3,0%, p.Leu1007fs: 10,8%; 101). Insgesamt trugen in der deutschen Kohorte 35,6% und in der ungarischen Kohorte 32,4% der M. Crohn-Patienten zumindest ein mutiertes Allel innerhalb der untersuchten *NOD2*-Mutationen. Auch in einer weiteren europäischen Kohorte aus Nijmegen, Holland, waren *NOD2*-Mutationen in 36,1% der Patienten nachweisbar (109). Zumindest in diesen drei Kohorten zeigte sich eine große Übereinstimmung hinsichtlich der Häufigkeit dieser *NOD2*-Mutationen. In weiteren Untersuchungen aus England, Zentraleuropa und Nordamerika konnten ähnliche Allelfrequenzen gefunden werden: 9,1-12,9% für p.Arg702Trp, 3,3-6,0% für p.Gly908Arg und 6,6-16,0% für p.Leu1007fs (86). Interessanterweise gibt es sogar in Europa große regionale Unterschiede, wo niedrigere Allelfrequenzen der *NOD2*-Mutationen in Schottland, Irland und Skandinavien beschrieben wurden (110). Zudem konnte eine finnische Arbeit keinen Unterschied in der Häufigkeit der drei Mutationen zwischen M. Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen finden, trotzdem ist in Finnland die Inzidenz des M. Crohn hoch (111).

Tragen Individuen ein Risikoallel innerhalb der drei gängigen *NOD2*-Mutationen, besitzen sie ein ca. 2,4fach erhöhtes Risiko, an einem M. Crohn zu erkranken. Beim Vorhandensein von entweder homozygot oder verbunden-heterozygot ist dieses Risiko um das ca. 17fache erhöht (108). Zwar erhöht somit das Vorhandensein eines mutierten Allels die Wahrscheinlichkeit, an einem M. Crohn zu erkranken, jedoch reicht diese Mutation zur Entstehung eines M. Crohn nicht aus, da auch gesunde Individuen diese Mutation – homozygot, compound heterozygot - tragen können, in einer Studie aus Deutschland beispielsweise 15,5% (100). Weitere Mutationen oder Umweltfaktoren müssen hier eine Rolle spielen, insbesondere da in Regionen mit ähnlichen Inzidenzen für den M. Crohn geringere Frequenzen der *NOD2*-Mutationen gefunden wurden. Alle oben zitierten Studien haben kaukasische Populationen untersucht. Interessanterweise ist die Mutation in nicht-kaukasischen Patienten mit M. Crohn aus Asien (u.a. Japan, China) nicht vorhanden (112,

113). Der genetische Hintergrund in Asien scheint somit unabhängig von *NOD2*-Mutationen zu sein.

3.2.3 Einfluss auf den Phänotyp

Die Hypothese, dass genetische Faktoren das klinische Erscheinungsbild beeinflussen, wird durch Studien sowohl für Colitis ulcerosa als auch den M. Crohn gestützt. Analysiert man Geschwister oder Eltern/Kinder mit M. Crohn, so zeigen 70-80% der Patienten Übereinstimmungen im klinischen Erscheinungsbild (114). Ähnliches wird für die Colitis ulcerosa beschrieben (115). Unabhängig von diesen epidemiologischen Ergebnissen sind die Mechanismen unbekannt. Am Beispiel der *NOD2*-Mutationen soll im Folgenden der Einfluss auf den Verlauf des M. Crohn näher beschrieben werden.

Befall terminales Ileum

Wie unterscheiden sich M. Crohn-Patienten mit oder ohne *NOD2*-Mutation? Hierzu sind eine Vielzahl von Studien veröffentlicht worden. In der deutschen Kohorte konnte zunächst eine Assoziation zwischen *NOD2*-Mutationen und einem Befall des terminalen Ileums gezeigt werden, in der ungarischen Population zeigte sich ein solcher Trend. Fasst man die in den letzten Jahren publizierten Studien zusammen, so ist die Assoziation „*NOD2* – Befall terminales Ileum“ die am häufigsten replizierte Erkenntnis (Meta-Analyse in 116). Eine plausible Erklärung resultiert aus der Tatsache, dass *NOD2* vorwiegend in Paneth-Zellen exprimiert wird, welche in erster Linie im terminalen Ileum vorkommen (104, 117). Eine weitere Möglichkeit könnte mit der erhöhten intestinalen Permeabilität beim M. Crohn zusammenhängen, deren Assoziation zur p.Leu1007fs-Mutation im *NOD2*-Gen beschrieben wurde (105). Zudem könnte eine Kolonisation von Bakterien, welche spezifisch für das terminale Ileum ist und normalerweise durch intakte *NOD2*-Funktion supprimiert wird, diese Entzündung hervorrufen. Allerdings konnte bislang kein Zusammenhang zwischen *NOD2*-Mutationen und der bakteriellen Flora hergestellt werden (118).

Häufige Resektionen im Ileozökalbereich mit hohem operativem Rezidivrisiko

Sowohl in der deutschen als auch in der ungarischen Population zeigte sich ein Zusammenhang zwischen *NOD2*-Mutationen und Darmresektion spezifisch für den Ileozökalbereich. Bei den deutschen Patienten mit M. Crohn wurden - im Beobachtungszeitraum von durchschnittlich acht Jahren - 45,3% mit *NOD2*-Mutation im Vergleich zu 19,0% der Patienten ohne Mutation operiert. Diese Ergebnisse sind in der Folge von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt worden, sowohl in pädiatrischen Kohorten (119) als auch bei Erwachsenen (111; 120, 121).

Eine weitere wichtige Observation ergibt sich erst aus einer sehr detaillierten Analyse. In der deutschen Kohorte wurde nach einer ersten Ileozökalresektion deutlich häufiger eine Nachresektion in der *NOD2*-positiven Gruppe durchgeführt (*NOD2*-positiv: 41,4%; *NOD2*-negativ: 9,1%). Führt man die Analyse konsequent fort und untersucht Patienten mit mehr als zwei Nachresektionen, so trugen all diese Patienten in dieser Studie eine *NOD2*-Mutation. *NOD2*-Mutationen sind somit mit einem hohen operativen Rezidivrisiko assoziiert. Initial haben viele Studien lediglich eine Analyse hinsichtlich „Operationen ja/nein“ durchgeführt. Hier wurden beispielsweise auch Fisteloperationen eingeschlossen, eine weitere Aufschlüsselung hinsichtlich Grund und Lokalisation der Operation erfolgte nicht. Später konnten somit weitere Arbeitsgruppen diese Observation einer Reoperationshäufigkeit im Ileumbereich bei *NOD2*-positiven Patienten bestätigen (122, 123). Bis dato ist unklar, warum dieser Zusammenhang – *NOD2* und hohes Operationsrisiko im Ileumbereich - auftritt. Ist diese Beobachtung lediglich Folge des generell häufiger beobachteten Befalls im terminalen Ileum bei *NOD2*-Patienten? Dies wurde initial von einer englischen Arbeitsgruppe beschreiben (124). In der deutschen Kohorte konnte mit Hilfe einer logistischen Regression im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass die häufigen Operationen im Bereich des Ileums unabhängig vom Befall des Ileums sind (100).

Das erhöhte Rezidivrisiko bei *NOD2*-positiven Patienten könnte weiterhin durch die Assoziation zu einem stenosierenden Befallsmuster bedingt sein (101, 125), die insbesondere im Bereich des Ileums auftritt und postoperativ erneut einsetzt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht klar, welche Mechanismen zur Ausbildung von Stenosen führen und inwiefern dieser Mechanismus bei *NOD2*-positiven Patienten gesteigert ist. Im Fokus stehen hier solche Zytokine, die an der Entwicklung von Stenosen beteiligt zu sein scheinen. Diverse Studien beschreiben hier eine zentrale Funktion für TGF β . TGF β ist ein wesentlicher Aktivator des so genannten „epithelial mesenchymal transition (EMT)“, welches von wichtiger Bedeutung für die Wundheilung und die Ausbildung von Fibrosen ist (126). Zudem ist TGF β einer der Hauptmediatoren, der bei intestinaler Mukosaschädigung durch Entzündung zu einer Fibrose führt. In der Tat sind beim M. Crohn deutlich erhöhte Konzentrationen für TGF β und dessen Rezeptoren beschrieben worden (127). Eine aktuelle Studie zeigt signifikant höhere Konzentrationen von TGF β in der Mukosa bei stenosierendem M. Crohn im Vergleich zu nicht stenosierendem M. Crohn (128). Zudem waren erhöhte TGF β -Konzentrationen mit höherem postoperativem Risiko assoziiert (129). Diese Assoziation könnte insbesondere bei *NOD2*-positiven Patienten vorhandensein. Möglicherweise könnten *NOD2*-Mutationen dazu führen, dass einerseits T-Zellen vermehrt TGF β produzieren sowie zudem vermehrt Kollagen von glatten Muskelzellen und Fibroblasten im Darm produziert wird. Allerdings müssen die genauen Mechanismen noch untersucht werden.

Ein weiterer Mechanismus könnte die mit *NOD2*-assoziierte erhöhte intestinale Permeabilität sein (105). Interessanterweise konnte eine kürzlich publizierte Studie in der Tat einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten intestinalen Permeabilität und einem erhöhten Risiko für die Ausbildung von Stenosen feststellen (130). Eine prospektive Studie konnte zeigen, dass eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität das Rezidivrisiko erhöht (52) und somit langfristig die Ausbildung von Stenosen als Ausdruck der chronischen Entzündung fördern könnte. Zudem könnte eine spezifische Kolonisation von Bakterien durch die *NOD2*-Mutationen dahingehend moduliert werden, dass es zur aggressiveren Form der Entzündung kommt. Eine spezifische Kolonisation mukosaler Bakterien konnte allerdings nicht beschrieben werden (118).

Innerhalb der *NOD2*-Mutationen nimmt die Frameshift-Mutation p.Leu1007fs eine zentrale Rolle sowohl funktionell als auch mit besonderem Einfluss auf den Phänotyp ein. Bei der p.Leu1007fs-Mutation kommt es zu einem verkürzten *NOD2*-Protein im Bereich der LRR-Region. Funktionell führt dies zu einer komplett supprimierten NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit LPS (91). In der ungarischen Kohorte konnte eine Assoziation zum Phänotyp mit Stenosen/Ileumresektionen isoliert für die p.Leu1007fs beobachtet werden, eine weitere deutsche Studie konnte insbesondere das Phänomen des erhöhten Operationsrisikos spezifisch mit dieser Mutation in Verbindung bringen (123). Somit scheint diese Mutation im Vergleich zu den anderen *NOD2*-Mutationen den größten Effekt auf den Phänotyp zu haben.

Von besonderem Interesse sind solche Patienten mit M. Crohn, die zwar keine der *NOD2*-Mutationen aufwiesen, aber das klinische Erscheinungsbild mit stenosierendem Befall und häufigen Operationen im Ileumbereich aufweisen. Welche Faktoren führen zu diesem Phänotyp? Eine Möglichkeit sind private Mutationen im *NOD2*-Gen, die bei bis zu 19% der M. Crohn-Patienten auftreten (131). Hier kann allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht gesagt werden, welche dieser Varianten in der Tat eine funktionelle Rolle spielen. Alternativ könnten Mutationen in Genen mit einer ähnlichen Funktion wie *NOD2* eine Rolle spielen.

Zusammenfassend zeigen kaukasische Patienten mit einer *NOD2*-Mutation eine starke Assoziation zu einem bestimmten Phänotyp: jüngeres Erkrankungsalter, Befall des terminalen Ileums, Ausbildung von Stenosen, Operationen im Bereich des Ileums, hoher Risikofaktor für Rezidivoperationen. Dieser Verlauf scheint somit deutlich aggressiver zu sein. Diese Studienergebnisse zeigen vielseitige Auswirkungen für einen möglichen therapeutischen Nutzen einer *NOD2*-Genotypisierung: Patienten können identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko für operative Rezidive haben. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Mehrzahl der Studien durch retrospektive Datensammlung der Krankheitsverläufe

durchgeführt wurden. Eine prospektive Studie muss hier unsere Beobachtungen bestätigen. Diese ist in Planung.

Stellen weitere Mitglieder der CARD-Familie ebenfalls CED-Suszeptibilitätsgene dar?

Für diesen Phänotyp können somit neben den individuellen *NOD2*-Mutationen auch andere Gene oder Umweltfaktoren eine Rolle spielen, insbesondere bei *NOD2*-negativen Patienten mit M. Crohn.

NOD2 ist ein Mitglied der *CARD*-Familie. Somit stellen auch die anderen Mitglieder der *CARD*-Familie interessante Kandidatengene dar. Passend hierzu beschrieb im Jahr 2007 eine Arbeitsgruppe aus England eine Assoziation zwischen der p.Cys10Ter-Variante im *CARD8*-Gen (*TUCAM*) zum M. Crohn (132), die allerdings bislang noch nicht bestätigt worden war. Eine Analyse dieser p.Cys10Ter-Variante in drei europäischen Kohorten aus Deutschland, Ungarn und Holland konnte diese Assoziation zu M. Crohn oder Colitis ulcerosa nicht verifizieren (133). Interessanterweise zeigte sich auch hier keine Assoziation zu einem bestimmten Phänotyp. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch eine weitere negative Studie aus Deutschland/Norwegen (134).

NOD1 erkennt im Vergleich zu *NOD2*, dessen Zielantigen in erster Linie Muramyl-dipeptid des PGN bakterieller Zellwände ist, eine größere Anzahl von Bakterien (135). Allerdings ist hier die Studienlage nicht eindeutig, ob Mutation im *NOD1*-Gen das Risiko für M. Crohn erhöhen: nach einer starken Assoziation des (ND(1)+32656*)-Polymorphismus mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in einer englischen Population (136), wurde in Folgestudien in erster Linie diese Variante untersucht. Allerdings konnte die überwiegende Mehrheit großer Studien diesen Zusammenhang nicht bestätigen (137-140).

Kürzlich wurde eine Variante (rs10870077) in einem weiteren Mitglied der *CARD*-Familie, *CARD9*, als CED-Risikovariante beschrieben (141). Die Assoziationen waren moderat und etwas höher bei Colitis ulcerosa (1,28 95% CI 1,14-1,44) als beim M. Crohn (OR 1,16 95% CI 1,04-1,30). Hier müssen jedoch weitere Replikationsstudien erfolgen.

In Zusammenschau aller Daten gibt es bis dato keine überzeugenden Hinweise, dass neben *NOD2/CARD15* ein weiteres Mitglied der *CARD*-Familie ein Risikogen für den M. Crohn darstellt. Auch eine Assoziation zu einer klinischen Subgruppe konnte in keiner der Studien beschrieben werden.

Rezeptoren der bakteriellen Antigenerkennung: CD14 und TLR4

Alternativ könnten Mutationen in ähnlichen Signalwegen vorliegen, die wie *NOD2* in der Bakterienerkennung eine Rolle spielen. Hierbei sind die so genannten TOLL-like-Rezeptoren von besonderer Bedeutung, da sie – überwiegend membranständig – ebenfalls für die

Bakterienerkennung wichtig sind. TOLL-like-Rezeptoren befinden sich in erster Linie auf dendritischen Zellen und mukosalen Epithelzellen. Innerhalb der TLR-Familie scheint der TLR4-Rezeptor besonders wichtig, da hier insbesondere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Hochregulation von TLR4 erfolgt (142, 143). Makrophagen hingegen interagieren mit Bestandteilen der Bakterienwand, wie Lipopolysaccharide, über ihren CD14-Rezeptor. Zudem ist CD14 an der Beseitigung apoptotischer Zellen beteiligt.

Varianten in den Genen *CD14* und *TLR4* können somit ebenfalls Risikofaktoren für die Entwicklung einer CED darstellen und zu einem bestimmten Phänotyp führen. Das *CD14*-Gen liegt zudem im Bereich des IBD5, einer ca. 250 kb großen Region. Auch in dieser Region ist die relevante Mutation bislang noch nicht identifiziert.

Funktionell relevant in diesem Zusammenhang die c.1-260C>T-Promoter-Variante im *CD14*-Gen sowie die c.896A>G-Variante *TLR4*-Gen, die in einer Studie aus Deutschland/Holland bei 379 M. Crohn-Patienten, 263 Colitis ulcerosa-Patienten sowie 605 Kontrollen untersucht wurde. Interessanterweise konnte in der deutschen Kohorte eine Assoziation zwischen dem *CD14*-SNP und Colitis ulcerosa ($p=0.01$) sowie einen Trend zum M. Crohn ($p=0.19$) nachgewiesen werden. In der ungarischen Population konnte ein deutlicher Trend zwischen dem *CD14*-SNP und der Colitis ulcerosa ($p=0.08$) sowie eine Assoziation zum M. Crohn ($p=0.01$) beobachtet werden. Für den *TLR4*-SNP zeigte sich keine Assoziation in beiden untersuchten Populationen (144).

Zusammenfassend könnte die *CD14* c.1-260C>T-Promoter-Variante eine Rolle sowohl beim M. Crohn als auch der Colitis ulcerosa spielen. Studien aus Griechenland und Japan (145, 146) konnten ebenfalls Assoziationen zum M. Crohn oder Colitis ulcerosa feststellen. Auch eine Epistase zu *NOD2*-Mutationen (147) sowie ein Einfluss auf das Ansprechen auf Glucocorticoide wurden beschrieben (148). Arbeitsgruppen aus Australien und Neuseeland konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (149, 150). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es daher Hinweise, dass die c.1-260C>T-Promoter-Variante im *CD14*-Gen eine Risikovariante für chronisch entzündliche Darmerkrankungen darstellen könnte, jedoch keinen Phänotyp ähnlich der *NOD2*-Mutation hervorruft. Weitere Studien müssen hier durchgeführt werden.

Auch die oben beschriebene Missense-Mutation im *TLR4*-Gen (c.896A>G; p.Asp299Gly) wurde von weiteren Arbeitsgruppen untersucht. Drei Meta-Analysen sprechen von einer geringen Assoziation zum M. Crohn (151-153). Allerdings sind hier neuere Studien aus Italien (154) und Deutschland/Ungarn (144) mit negativen Ergebnissen nicht berücksichtigt. Auch hier bleibt letztendlich unklar, ob p.Asp299Gly im *TLR4*-Gen eine Risikovariante für den M. Crohn ist. Wenn überhaupt ist dieser Effekt sehr moderat (OR 1.45, 95% CI 1.11–1.90)

Trotz vieler funktioneller Ähnlichkeiten zum *NOD2*-Gen im Rahmen der bakteriellen Antigenerkennung führen somit die untersuchten Varianten in den Kandidatengenen *CD14*,

TLR4 und *TUCAN/CARD8* nicht zu einem *NOD2*-Phänotyp. Auch *NOD1* scheint nach der aktuellen Studienlage kein CED-Risikogen zu sein.

3.2.4 Welchen Einfluss haben *NOD2*-Mutationen auf eine epitheliale Barrierestörung?

Ergebnisse diverser Studien belegen beim M. Crohn eine Erhöhung der gastrointestinalen Permeabilität als Ausdruck einer epithelialen Barrierestörung. M. Crohn-Patienten in Remission weisen häufiger als gesunde Probanden eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität auf (49-55). Man geht davon aus, dass hierdurch eine verstärkte Aufnahme luminaler Antigene ermöglicht wird. Die Mechanismen, die zu dieser Störung der intestinalen Permeabilität führen, sind unklar.

Familienstudien mit der Analyse von genetisch-Verwandten sowie nicht-Verwandten Individuen liefern hier wichtige Hinweise zur Ursache dieser Barrierestörung. Eine große Studie aus Deutschland ergab eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität bei 26% der erstgradig Verwandten, jedoch nur bei 6% der Nicht-Verwandten (105). Diese Permeabilitätsstörung vorwiegend bei genetisch-Verwandten von Patienten mit M. Crohn ist in Übereinstimmung mit der überwiegenden Mehrzahl der bislang durchgeführten Studien und ist somit ein wichtiges Indiz für eine genetische Grundlage dieser Barrierestörung.

Welche genetischen Varianten bedingen diese Barrierestörung? Erstmals wurde ein Zusammenhang mit der Frameshift-Mutation p.Leu1007fs im *NOD2*-Gen beschrieben (105), da bei Angehörigen mit einer erhöhten Permeabilität die p.Leu1007fs-Mutation häufiger als bei Angehörigen ohne Permeabilitätserhöhung gefunden werden konnte. Bei den Patienten lag dieser Zusammenhang nicht vor, möglicherweise wurden hier die Ergebnisse der intestinalen Permeabilität durch die dauerhafte Medikation, Mangelernährung, Stress oder die schon durch die länger bestehende Erkrankung beeinflusst (155-159). Insbesondere die Angehörigen mit der p.Leu1007fs-Mutation und einer erhöhten Permeabilität scheinen somit eine Risikogruppe für die Entwicklung eines M. Crohn darzustellen (64). Im Rahmen einer prospektiven Studie wird diese Hypothese von uns zum gegenwärtigen Zeitpunkt analysiert. Eine italienische Studie konnte den Zusammenhang von *NOD2*-Mutationen mit einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität bestätigen (59). Diese Assoziation war besonders ausgeprägt beim familiären im Vergleich zum sporadischen M. Crohn. Da auch in dieser Studie erneut eine Erhöhung signifikant häufiger bei erstgradig Verwandten als bei nicht verwandten Angehörigen gesehen wurde, sprechen all diese Daten erneut für eine genetisch mitbedingte Barrierestörung und heben die Rolle der *NOD2*-Mutationen hervor. Eine weitere Studie aus Italien untersuchte ebenfalls den Zusammenhang von *NOD2*-Mutationen zur intestinalen Permeabilität. Auch wenn sich hier kein signifikantes Ergebnis zeigte, so konnte zumindest ein klarer Trend observiert werden ($p=0.08$). Diese Studie beinhaltete eine

geringere Fallzahl aller oben zitierten Studien, so dass dies als Erklärung herangezogen werden könnte (56).

Wie kann der Zusammenhang zwischen der p.Leu1007fs-Mutation und der intestinalen Permeabilität erklärt werden? NOD2 ist notwendig für die Produktion einer Subgruppe von antibakteriellen intestinalen Peptiden, sog. Kryptidinen (75). Der Mangel an Kryptidinen könnte über eine verstärkte Invasion von Bakterien zu einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität führen (160). Hypothetisch könnte somit die beim Menschen beobachtete verminderte Defensin-Produktion, welche beim Vorhandensein von *NOD2*-Mutationen auftritt (104), die Invasion von Bakterien erhöhen. Dies könnte eine lokale Entzündung induzieren, welche zu einer erhöhten Permeabilität führt. Zudem könnte auch ein direkter Effekt der Bakterien auf die Integrität der Darmbarriere vorhanden sein (160). Somit wäre die Erhöhung der Permeabilität eine genetisch bedingte Störung der Bakterienabwehr, die im Verlauf dann zu einer Entzündung mit resultierendem Barrieredefekt führt.

Zudem zeigt eine der humanen p.Leu1007fs-Mutation ähnliche Variante in Mäusen eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung nach MDP-Stimulation sowie eine erhöhte Produktion von IL1 β (76). IL1 β wiederum kann direkt zu einer erhöhten Permeabilität führen (161), so dass auch dieser Mechanismus zur Erklärung herangezogen werden kann.

Besteht somit bei genetisch Verwandten eine – zumindest unbemerkte – Entzündungsreaktion? Calprotectin im Stuhl ist in diesem Zusammenhang ein etablierter Marker einer subklinischen Inflammation. Angehörige von M. Crohn-Patienten zeigen in der Tat eine Erhöhung der Calprotectin-Konzentrationen und geben somit Hinweise für das – genetisch bedingte – Vorhandensein einer solchen subklinischen Inflammation (162). Ein weiteres Indiz hierfür sind Ergebnisse einer veränderten Stuhlflora bei erstgradig Verwandten (163). Die Komposition der mukosalen Bakterienflora scheint allerdings durch *NOD2*-Mutationen nicht abhängig zu sein (118).

NOD2-Mutationen können die Störung der intestinalen Barriere nicht vollständig erklären, weitere Mechanismen müssen hier eine Rolle spielen.

3.2.5 Welche weiteren Gene führen zur Störung der epithelialen Barriere bei M. Crohn?

Kandidatengene sind hierbei natürlich CED-assoziierte Varianten, die funktionell eine Rolle in der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität spielen. Eine Arbeitsgruppe aus Kiel beschrieb im Jahr 2004 eine Assoziation zwischen dem M. Crohn und Varianten im *DLG5*-Gen (164). *DLG5* ist an Zell-Zell-Verbindungen lokalisiert und somit möglicherweise an der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität beteiligt (165). Weitere Kohorten aus Deutschland sowie Ungarn zeigten bezüglich der Verteilung von sechs Varianten im *DLG5*-

Gen jedoch keine Assoziation zum M. Crohn. Zudem konnte kein Zusammenhang zu einer Störung der intestinalen Permeabilität festgestellt werden (166).

Die Frage, ob *DLG5* überhaupt ein CED-assoziiertes Risikogen darstellt, wird immer noch heftig diskutiert, da die überwiegende Mehrzahl der Studien ebenfalls keine Assoziation beschreiben konnte. Im Fokus steht hierbei insbesondere die p.Arg30Gln-Variante, die in der Erststudie aus Kiel die stärkste Assoziation gezeigt hatte. Durch eine Kooperation mit der Universität Auckland, in die Daten aus insgesamt 11 Studien eingeschlossen wurden, konnte gezeigt werden, dass die p.Arg30Gln-Variante keine generelle Assoziation zum M. Crohn zeigt. Erst eine Subgruppenanalyse ergab, dass bei Frauen mit M. Crohn das Vorhandensein von p.Arg30Gln eher zu einer geringen Risikoreduktion führt (OR 0,86; 95% CI 0,76-0,97; 167).

Ein weiteres interessantes Kandidatengen im Zusammenhang mit Störungen der epithelialen Barriere ist *Myosin IXb (MYO9B)*. *MYO9B* scheint an der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität beteiligt zu sein. Interessanterweise beschrieb eine Arbeitsgruppe hier im Jahre 2005 eine Assoziation zur Zöliakie und weist in diesem Zusammenhang auf einen primären Epitheldefekt hin (168).

Wir untersuchten vier *MYO9B*-Varianten (rs1545620 (Exon 20), rs1457092 (Intron 20), rs2305764 (Intron 28), rs2279002 (Intron 32)) in 549 M. Crohn-Patienten, 259 Colitis ulcerosa-Patienten und 702 Kontrollen. Zwei Varianten im *MYO9B*-Gen (rs2305764 und rs1457092) zeigten in der deutschen Kohorte eine signifikante Assoziation sowohl zum M. Crohn (rs2305764: p=0.0001, OR 1.89, 95%CI [1.463;2.434]; rs1457092: p=0.003, OR 1.50, 95%CI [1.150;1.958]) als auch zur Colitis ulcerosa (rs2305764: p=0.0002, OR 1.79, 95%CI [1.327;2.421]; rs1457092: p=0.01, OR 1.49, 95%CI [1.088;2.030]). Die Assoziation der Variante rs2305764 zum M. Crohn konnte in der niederländischen Kohorte (p=0.004, OR 1.56, 95%CI [1.153;2.11]) nicht jedoch in der ungarischen Kohorte bestätigt werden. Interessanterweise zeigte sich Heterozygotie und Homozygotie sowohl für die rs2305764- als auch die rs1457092-Variante signifikant mit einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität assoziiert (rs2305764: p=0.03; rs1457092: p=0.003). Zusammenfassend erhöht insbesondere die *MYO9B*-Variante rs230576 das Risiko zur Entstehung des M. Crohn. Dies könnte durch eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität bedingt sein (169).

Bis dato haben zwei große CED-Kohorten die Assoziation zwischen *MYO9B* und M. Crohn bestätigt (170, 171). Latiano et al. konnten zudem ebenfalls einen Zusammenhang zur Erhöhung der intestinalen Permeabilität feststellen. Wie *NOD2* können allerdings auch die *MYO9B*-Varianten den genetischen Hintergrund der epithelialen Barriestörung nicht vollständig erklären. Die weitere Erforschung der genetischen Grundlage der intestinalen Barriestörung ist somit zwingend notwendig.

In diesem Zusammenhang könnten zudem Mutationen in Genen vorliegen, die direkt am Aufbau der epithelialen Barriere beteiligt sind. Ein wesentlicher Mechanismus sind hier die Tight junctions (TJ), wie beispielsweise Occludin, Claudin-1, Claudin-4 sowie JAM-1. Diese Gene untersuchen wir derzeit im Rahmen eines Drittmittelprojekts bei Patienten mit M. Crohn und familiärer Häufung einer erhöhten intestinalen Permeabilität. Ziel dieser Studie ist es, erneut Assoziationen zwischen den genetischen Varianten und einer erhöhten Permeabilität aufzuzeigen.

Auch weitere Varianten mit Funktion in der Bakterienerkennung – *CD14*, *TLR4*, und *CARD8* – haben hier keinen Einfluss. Neuere Studien haben eine Reihe weiterer interessanter Kandidatengene identifiziert, die zur epithelialen Barriestörung führen können. Hierzu gehören das Gen *E-Cadherin* (172), sowie die Gene *MAGI2* und *PARD3* (68, 70). Weitere interessante Kandidatengene resultieren aus den Daten der GWAS: *PTGER4*, *ITLN1*, *DMBT1*, *XBP1*, denen alle eine potentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere zukommen könnte (97). Replikationen und funktionelle Untersuchungen stehen hier noch aus.

3.2.6 Spielt ein epithelialer Barriedefekt eine Rolle bei der Colitis ulcerosa?

Ob bei der Colitis ulcerosa ebenfalls eine intestinale Barriestörung vorliegt ist unklar. In einer weiteren großen Familienstudie untersuchten wir Patienten mit Colitis ulcerosa, deren erstgradig Verwandte, nicht-verwandte, aber im gleichen Haushalt lebende Angehörige sowie Kontrollen. In dieser Studie wurde die intestinale Permeabilität erneut via oralem Zuckertest gemessen. Die prolongierte Urinmessung der Sucralose wurde hier als Marker für die Permeabilität des Kolons verwendet.

Ähnlich wie beim M. Crohn zeigte auch hier eine Subgruppe von Patienten mit Colitis ulcerosa trotz klinischer Remission eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität (n=22/69, 31,9%; Kontrollen n=4/64, 6,3%, p=0.0001). Interessanterweise zeigten ebenfalls die Verwandten signifikant häufiger eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität, unabhängig davon, ob die Verwandten im gleichen Haushalt lebten oder nicht (n=7/32, 21,9%; p=0.03 im Vgl. zu Kontrollen). Kein Unterschied konnte hingegen beim Vergleich zwischen Nicht-Verwandten (n=3/24, 12,5%) sowie Kontrollen gefunden werden (p=0.39). Sowohl die gastroduodenale als auch die Kolonpermeabilität ergab keine Unterschiede. Diese Beobachtungen legen nahe, dass ein genetisch bedingter epithelialer Barriedefekt ähnlich wie beim M. Crohn auch in der Pathogenese der Colitis ulcerosa eine Rolle spielt (173). Da bei den Colitis ulcerosa-Patienten zudem ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten intestinalen Permeabilität und einer proximalen Ausbreitung der Colitis ulcerosa auffiel, könnte diese Barriestörung ein Risikofaktor für eine Ausbreitung nach proximal bei der

Colitis ulcerosa darstellen. Die Messung der Sucralose hat jedoch als Marker der Kolonpermeabilität nur eine bedingte Aussagekraft (174).

3.3 Autophagie und TH17-Zellen: neue Aspekte in der Pathophysiologie

3.3.1 IL23R

Nach der Identifikation der *NOD2*-Mutationen im Jahre 2001 konnte längere Zeit keine weitere CED-assoziierte Risikovariante identifiziert werden. Erst mit Hilfe einer genomweiten Assoziationsstudie wurde die p.Arg381Gln-Mutation innerhalb des *IL23R*-Gens entdeckt (77). Eine Analyse in drei europäischen Kohorten konnte zeigen, dass Heterozygotie für die p.Arg381Gln-Mutation einen protektiven Marker für sowohl M. Crohn als auch Colitis ulcerosa darstellt (175).

Biologische Funktion IL23R

IL23R und IL12R β 1 sind die zwei Untereinheiten des IL23-Rezeptors. IL23 gehört zur IL12-Familie und wird von APCs produziert. IL23 spielt eine wesentliche Rolle in der Stabilisierung von IL17-produzierenden T-Zellen, so genannte T_H17-Zellen, die eine Subpopulation der CD4-Helferzellen darstellen. Erhöhte Infiltration von T_H17-Zellen in entzündlichen Geweben wurden bei der multiplen Sklerose, rheumatoiden Arthritis sowie beim M. Crohn beschrieben (Übersicht in 176). T_H17-Zellen scheinen weiterhin wichtig für die Abwehr von bakteriellen Erregern zu sein. Diese Daten suggerieren eine Funktion sowohl im angeborenen als auch in der T-Zell-vermittelten Immunabwehr. Letztere Hypothese wird unterstützt durch zwei verschiedene Mausmodelle, wo IL23 sowohl für das angeborene Immunsystem als auch für T-Zell-vermittelte Aktivierung essentiell war (177). IL23R knock-out Mäuse oder anti-IL23R-Antikörper verhindern zudem die Ausbildung einer Colitis (178).

Neben den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhen Mutationen im *IL23R*-Gen zudem das Risiko einer Psoriasis (179), ein erneuter Hinweis für die Ähnlichkeiten dieser Erkrankungen. Interessanterweise haben Vorstudien mit Antikörpern gegen IL12p40 einen klinischen Benefit sowohl bei M. Crohn (180) als auch bei der Psoriasis gezeigt (181).

Über welche Mechanismen Varianten im *IL23*-Gen in die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen involviert sind, bedarf weiterer Forschung. Für einen Einfluss der T_H17-Achse in der Pathogenese des M. Crohn spricht auch die Assoziation zweier weiterer Varianten in den Genen *JAK2* und *STAT3* (97), die ebenfalls an der weiteren Kaskade nach IL23-Aktivierung lokalisiert sind.

Assoziationsstudien zu *IL23R* bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Assoziation von p.Arg381Gln im *IL23R*-Gen konnte im Verlauf sowohl für M. Crohn als auch für die Colitis ulcerosa in mehreren Populationen aus Europa, Kanada und auch Neuseeland (182-186) sowie zudem in einer pädiatrischen CED-Population aus den USA bestätigt werden (187). Die Odds Ratios lagen hier in vergleichbaren Bereichen von 0,26 bis 0,44 mit jeweils geringerer Assoziation zur Colitis ulcerosa. Eine erste asiatische Studie aus Japan ergab hingegen ähnlich wie bei den *NOD2*-Mutationen keine Assoziation zu M. Crohn oder Colitis ulcerosa (188).

Interessanterweise konnte zudem keine der Studien bislang einen Zusammenhang von p.Arg381Gln zu einem bestimmten Phänotyp herstellen, auch zeigte sich kein Zusammenhang zur intestinalen Permeabilität (175).

Somit stellt p.Arg381Gln im *IL23R*-Gen einen protektiven Marker gegenüber der Entwicklung von M. Crohn und Colitis ulcerosa dar. Diese Erkenntnisse identifizieren somit unerwartet einen neuen Aspekt der Pathophysiologie: die über IL23-vermittelte Aktivierung der T_H17-Achse. Die genauen Mechanismen, mit denen insbesondere p.Arg381Gln im *IL23R*-Gen einen protektiven Mechanismus gegenüber sowohl M. Crohn als auch Colitis ulcerosa darstellt, sind unbekannt.

3.3.2 ATG16L1

Unmittelbar nach der *IL23R*-Identifikation gelang einer Kieler Arbeitsgruppe um Prof. Schreiber der nächste Durchbruch: erneut wurde mit Hilfe einer genomweiten Assoziationsstudie ein neues Risikogen für den M. Crohn identifiziert: *ATG16L1*. Hier konnte gezeigt werden, dass eine zum Aminosäureaustausch führende Mutation (p.Thr300Ala; c.898.A>G; rs2241880) mit dem M. Crohn aber nicht mit der Colitis ulcerosa assoziiert ist (46). In den drei europäischen Kohorten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Ein Zusammenhang zu einem Phänotyp oder zu den Ergebnissen der intestinalen Permeabilität ließ sich erneut nicht nachweisen (189).

Biologische Funktion ATG16L1

ATG16L1 wird in intestinalen Epithelzellen und Leukozyten exprimiert. *ATG16L1* kodiert für ein Protein, welches eine wesentliche Rolle in der Autophagie spielt. Bei der Autophagie handelt es sich um einen Prozess zur Elimination intrazellulärer Bakterien sowie Viren. Dies geschieht über den intrazellulären Transport von Organismen, eingeschlossen in einer Doppelmembran – so genannte Autophagosomen - zu Lysosomen, wo diese Bestandteile degradiert werden. Allerdings ist der spezifische Mechanismus der p.Thr300Ala-Variante innerhalb des *ATG16L1*-Gens noch unklar. Neuere Daten zeigen, dass M. Crohn-Patienten homozygot für das *ATG16L1*-Risikoallel sowohl Veränderungen in der Struktur von Paneth-

Zellen als auch erhöhte Expressionen von Adipozytokinen wie Leptin und Adiponectin aufweisen (190). Adipozytokine werden bei M. Crohn und Colitis ulcerosa in Abhängigkeit von der Erkrankungsaktivität sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen unterschiedlich reguliert (191) und spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung des M. Crohn (Übersicht in 192). Zudem scheint die p.Thr300Ala-Mutation zu einer verminderten Autophagie von *Salmonella enterica* in humanen intestinalen Epithelzellen zu führen (193). ATG16L1-defiziente Makrophagen produzieren hohe Mengen von IL-1 β und IL-18 nach Stimulation mit LPS (194). Weitere Untersuchungen, die insbesondere die Funktion dieser Mutation auf Entstehung und Verlauf des M. Crohn beschreiben, werden erwartet.

Assoziationsstudien zu ATG16L1 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Somit ist von besonderem Interesse, ob hierbei ein ähnlicher Phänotyp wie bei der *NOD2*-Mutation vorliegt, da es sich ebenfalls um einen potentiellen Defekt in der Bakterienerkennung handeln könnte. Zudem könnte auch ein Einfluss auf die Störung der intestinalen Permeabilität bestehen. Vergleicht man die Allelfrequenzen aus den Kohorten aus Deutschland, Ungarn, Holland mit den bis dato publizierten Studien, lassen sich hier in kaukasischen Populationen ähnliche Allelfrequenzen des Risikoallels Glutamin nachweisen: 0,57-0,61 für M. Crohn-Patienten, 0,51-0,53 bei den Kontrollen. Interessant auch hier wieder, dass diese Mutation in asiatischen Populationen (Japan) bislang nicht nachgewiesen werden konnte (188). Im Vergleich zu den *NOD2*-Mutationen ist die Risikoerhöhung bei Vorliegen der p.Thr300Ala-Mutation eher gering (OR 1,318; 95% CI 1.129-1.539). Eine kürzlich veröffentlichte Meta-Analyse über 17 Studien in kaukasischen Kohorten ergab eine Bestätigung der Assoziation *ATG16L1* zum M. Crohn bei ähnlicher Odds Ratio von 1,33 (95% CI 1.28-1.38; 195).

Unmittelbar im Anschluss wurde ein weiteres Suszeptibilitätsgen mit M. Crohn assoziiert gefunden: *IRGM*, welches ebenfalls eine Rolle im Prozess der Autophagie spielt (196). Auch hier ist die Assoziation eher gering ausgeprägt (OR 1.33). Assoziationen zur Colitis ulcerosa konnten ähnlich wie bei *ATG16L1* nicht nachgewiesen werden. Kürzlich wurde ein Deletions-Polymorphismus oberhalb des *IRGM*-Gens identifiziert, der die *IRGM*-Expression reguliert und wahrscheinlich die kausale Variante innerhalb des *IRGM*-Lokus darstellt (197).

Die überwiegende Mehrheit der Studien konnte keine Assoziation zwischen *ATG16L1* und auch *IRGM* zu einem bestimmten Phänotyp herstellen. Lediglich eine Gruppe aus England beschrieb eine Assoziation zum Befall des terminalen Ileums ähnlich wie bei der *NOD2*-Mutation (198). Allerdings konnten neuere Studien diesen Trend nicht bestätigen (195). Anders als bei der *NOD2*-Mutation scheint hier kein bestimmter Autophagie-Phänotyp vorzuliegen. Auch in einer deutschen Kohorte von *IRGM*-Varianten konnte bislang kein spezifischer Phänotyp identifiziert werden (Prager et. al., 2009, in Vorbereitung). Allerdings

sind hier bedeutend größere Studien im Rahmen internationaler Kooperationen notwendig, um einen solchen Zusammenhang herzustellen, da auch hier der Einfluss der *IRGM*-Varianten auf den M. Crohn nur moderat ist. Zudem haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass möglicherweise eine weitere Variante im Autophagie-Prozess involviert ist: *LRRK2* (97). Allerdings ist dessen Funktion noch unbekannt.

3.4 Weitere Kandidatengenanalysen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Trotz der Weiterentwicklungen in Statistik und Methodik mit den bahnbrechenden Erkenntnissen der genomweiten Assoziationsstudien wird durch diese Methoden weiterhin nur ein geringer Teil des genetischen Hintergrunds dargestellt. Daher ist weiterhin der Kandidatengenansatz eine Möglichkeit, CED-assoziierte Varianten zu identifizieren. Dies kann über den hypothesen-gesteuerten Kandidatengenansatz erfolgen, unterstützt durch die Daten der Kopplungsanalysen oder der genomweiten Assoziationsstudien, die eine Chromosomenregion beschreiben.

3.4.1 Ist die erhöhte Inzidenz der Laktoseintoleranz beim M. Crohn genetisch mitbedingt?

Bei CED-Patienten tritt häufig eine Laktoseintoleranz auf, insbesondere beim M. Crohn. Dieses klinische Erscheinungsbild muss auch in der Differentialdiagnose gastrointestinaler Beschwerden bei Patienten miteinbezogen werden. Eine Studie aus Deutschland beschrieb eine Laktoseintoleranz bei 46% der Patienten mit M. Crohn im Vergleich zu 16% der Kontrollpopulation (199). Die Mechanismen sind nicht genau bekannt, eine entzündlich bedingte Verminderung der Laktase-Phlorizin-Hydrolase-Konzentration und somit eine sekundäre Ursache wird hierfür u.a. verantwortlich gemacht. Aufgrund der erhöhten Prävalenz könnte jedoch auch ein genetischer Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen bestehen. Eine finnische Arbeitsgruppe beschrieb im Jahr 2002 erstmalig eine starke Assoziation von zwei Varianten, *C/T*₋₁₃₉₁₀ and *G/A*₋₂₂₀₁₈, zur Laktoseintoleranz. Insbesondere die Variante *C/C*₋₁₃₉₁₀ zeigte eine komplette Assoziation bei allen Patienten mit primärer Laktoseintoleranz (200).

In einer deutschen CED-Kohorte fand sich die Variante *C/C*₋₁₃₉₁₀ bei 21,7% der M. Crohn-Patienten, 20,3% der Colitis ulcerosa-Patienten und bei 21,4% der gesunden Kontrollen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Variante *G/G*₋₂₂₀₁₈.

Diese beiden Laktoseintoleranz-Varianten scheinen in der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen somit keine Rolle zu spielen. Die Laktoseintoleranz scheint beim M. Crohn somit ein sekundär entzündlich-bedingtes Phänomen zu sein. Dennoch

könnte man die C/C₋₁₃₉₁₀-Variante nutzen, um solche Patienten mit primärer Laktoseintoleranz zu identifizieren. Letztere Gruppe sollte auch in der Remissionsphase eine Laktose-arme/freie Diät einhalten (201).

Genotypisierung für C/T₋₁₃₉₁₀ zur Diagnostik der Laktoseintoleranz

In der oben aufgeführten Studie konnten eine Häufigkeit der C/C₋₁₃₉₁₀ -Variante bei 21.4% der Kontrollen festgestellt werden. Dies ist etwas häufiger als die berichtete Frequenz von 15% der Bevölkerung in Deutschland. Bislang gab es noch keine Studie, die die diagnostische Aussagekraft der Genotypisierung für C/T₋₁₃₉₁₀ and G/A₋₂₂₀₁₈-Varianten bei Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer Laktoseintoleranz im Vergleich zur klinischen Standardmethode – dem H₂-Atemtest – untersucht hatte. Aus der Kombination Genotypisierung und H₂-Atemtest könnten zudem Patienten mit einer rein sekundären Laktoseintoleranz identifiziert werden.

Im Rahmen einer Studie wurden 166 Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer Laktoseintoleranz eingeschlossen. Bei allen Patienten wurde sowohl eine Genotypisierung für die beiden C/T₋₁₃₉₁₀ and G/A₋₂₂₀₁₈-Varianten als auch ein H₂-Atemtest durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei 116 Patienten ein positiver H₂-Atemtest, bei 110 Patienten zeigte sich auch der Nachweis der C/C₋₁₃₉₁₀-Variante. Bei den übrigen 10 Patienten – positiver H₂-Atemtest, Genetik negativ – konnten wir bei den Patienten in 4 Fällen in der Tat andere Grunderkrankungen mit intestinaler Beteiligung eruieren: Zöliakie, Kurzdarmsyndrom sowie eine Infektion mit *Gardia lamblia*sis. Von 50 Patienten mit negativem H₂-Atemtest, hatten auch 48 Patienten den C/T₋₁₃₉₁₀ -Genotyp. Bei den zwei übrigen Patienten mit positiver Genotypisierung ergab eine Wiederholung von H₂-Atemtest mit Messung der Glukosewerte ein pathologisches Testergebnis. Im Vergleich zum H₂-Atemtest ergaben sich somit Werte für Sensitivität von 91,4%, Spezifität von 96,0%, ein positiv prädiktiver Wert von 98,1% sowie ein negativ prädiktiver Wert von 82,8% (202).

Zusammenfassend konnten diese Studie erstmals zeigen, dass die Genotypisierung für die C/T₋₁₃₉₁₀ -Variante ein neues diagnostisches Verfahren zur Diagnose der primären Laktoseintoleranz darstellt. Daraus ergibt sich ein neuer diagnostischen Algorithmus bei der Verdachtsdiagnose einer Laktoseintoleranz:

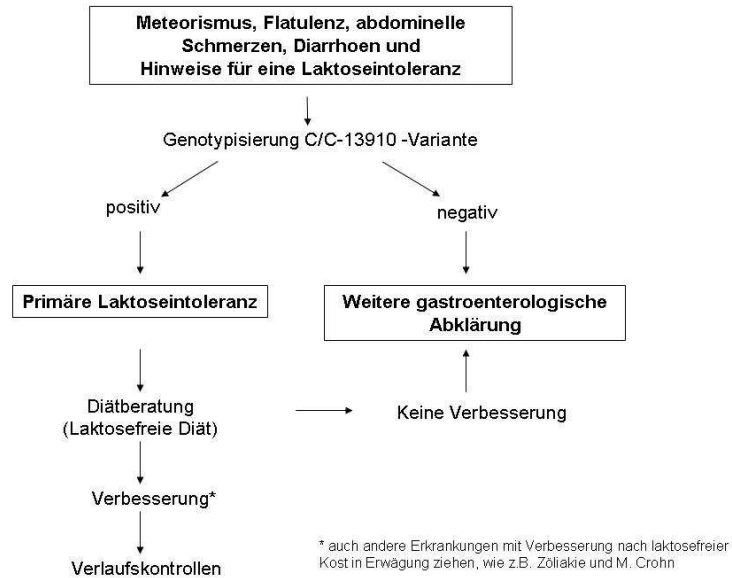


Abbildung 1: Empfohlener diagnostischer Algorithmus bei Verdacht auf Laktoseintoleranz

Klinische Implikationen des C/C-₁₃₉₁₀-Genotyp zeigte eine Studie aus Österreich, wo bei Patienten mit C/C-₁₃₉₁₀-Genotyp ein erhöhtes Risiko für eine erniedrigte Knochendichte sowie Frakturen berichtet wurde. Allerdings beschrieben die Kollegen auch ein erhöhtes Risiko für den C/T-₁₃₉₁₀-Genotyp (203). Diese Patienten sind jedoch als laktosetolerant zu bezeichnen, anderenfalls hätten allein 74% der österreichischen Patienten ein erhöhtes Risiko für Frakturen und eine verminderte Knochendichte (204).

3.4.2 Kandidatengensuche durch Daten der Kopplungsanalysen

Ein großer Fortschritt war hierbei die Einführung so genannter Linkage-Analysen. Auf diese Weise gelangt man vom gesamten menschlichen Genom zu deutlich kleineren Abschnitten von Chromosomen, innerhalb derer ein Risikogen vermutet wird.

IBD2: Keratin 8

Zwei große Studien konnten zeigen, dass der IBD2-Lokus in erster Linie mit der Colitis ulcerosa assoziiert ist (205, 206). Auf dem IBD2-Lokus in der Region 12q13-14 liegt das *Keratin-8*-Gen (*KRT8*). *KRT8*-defiziente Mäuse entwickeln spontan eine intestinale Entzündung innerhalb der Lamina propria sowie der Submucosa mit Kryptenarchitekturstörungen, die zum Durchfall führen (207). Zudem bindet Keratin 8 an den intrazellulären TNF-Rezeptor. Somit stellt *KRT8* ein interessantes Kandidatengen insbesondere für die Colitis ulcerosa dar.

Zwei Mutationen im *KRT8*-Gen, p.Tyr54His und p.Gly62Cys, zeigten eine Assoziation sowohl zur kryptogenen Leberzirrhose (208) als auch zur chronischen Pankreatitis (209) beschrieben wurde.

Eine Studie an 217 M. Crohn-Patienten, 131 Colitis ulcerosa-Patienten und 560 Kontrollen untersuchte diesen beiden Varianten. Die p.Gly62Cys-Mutation zeigte sich jeweils 2,3% der Fälle in beiden Patientengruppen im Vergleich zu 1,6% der Kontrollen. Der Unterschied war nicht signifikant. Die p.Tyr54His-Mutation konnte weder bei den CED-Patienten noch bei den Kontrollen detektiert werden (210). Fehlende Assoziationen dieser beiden *KRT8*-Varianten wurden in zwei weiteren Populationen aus den USA und England beschrieben (211, 212). Zu weiteren Kandidatengenen, die in der IBD2-Region untersucht wurden, gehörten die Gene *AVIL*, β 7-*Integrin*, *IFN- γ* , *NRMP2*, *STAT6* und *VDR*. Alle Studien konnten jedoch ebenfalls keine Assoziationen zu M. Crohn oder Colitis ulcerosa nachweisen (Übersicht in 210). Eine aktuelle Studie beschreibt jedoch eine Assoziation der rs2228226-Variante im *GLI1*-Gen (glioma-associated oncogene homolog 1) innerhalb des IBD2-Lokus zur Colitis ulcerosa in einer Kohorte aus England und Schottland (213). Inwiefern es sich bei der *GLI1*-Variante rs2228226 tatsächlich um die kausale IBD2-Mutation handelt, oder diese mit der echten Mutation gekoppelt ist, müssen weitere Replikationen, Sequenzierungsansätze und funktionelle Untersuchungen zeigen.

IBD4: *IL25*

Der IBD4-Lokus liegt auf dem Chromosomenabschnitt 14q11-12, hier haben mehrere Kopplungsanalysen eine Assoziation zu chronisch entzündliche Darmerkrankungen beschrieben (214-216). Besonders stark ist diese Assoziation bei Rauchern und liefert somit einen Hinweis auf einen Zusammenhang Genetik/Umwelt (217).

Die CED-assoziierte Variante im IBD4-Gen ist unbekannt. Von besonderem Interesse im IBD4-Lokus ist das *IL25*-Gen. IL25 induziert T_H2-Antworten über die Induktion von IL4, IL5 and IL13 (218) und erhöht zudem die Expression von TNF- α and IFN- γ (219). Somit scheinen die Effekte von IL25 nicht nur auf die Produktion von Th2-Zytokinen beschränkt zu sein. Zudem konnten mRNA-Untersuchungen hohe Expressionen von IL25 im Gastrointestinaltrakt detektieren (219).

Eine Sequenzierung des *IL25*-Gen in 40 CED-Patienten identifizierten wir erstmalig einen Polymorphismus im Exon 2 (c.424C>A). Allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der c.424C>A-Variante in einer Kohorte von 151 Patienten mit M. Crohn, 111 Patienten mit Colitis ulcerosa und 119 Kontrollen. Das *IL25*-Gen scheint somit kein Risikogen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu sein (220). Unabhängig davon sind trotz der multiplen Replikationen des IBD4-Lokus keine weiteren Studien publiziert worden, die andere Kandidatengene in diesem Lokus analysiert haben.

Auch die Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass die verantwortlichen Varianten in allen Loci IBD2-9 weiterhin nicht bekannt sind.

3.6 Pharmakogenetik: Versuch einer Optimierung der medikamentösen Therapie durch Genotypisierung

Die medikamentöse Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zeichnet sich häufig durch unzureichendes Ansprechen oder eine Vielzahl von Nebenwirkungen aus. Mithilfe pharmakogenetischer Studien sollen Varianten identifiziert werden, die die Effektivität oder das Auftreten von Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie für den individuellen Patienten besser vorhersagen. Lediglich für die Therapie mit den Immunsuppressiva 6-Mercaptopurin und sein Prodrug Azathioprin gibt es eine solche Möglichkeit: Mithilfe der TPMT-Genotypisierung können Patienten mit geringer TPMT-Aktivität identifiziert werden, wo der somit verminderte Abbau des Metaboliten 6TGN zu einer Myelosuppression führen kann.

Weitere genetische Marker mit solcher Funktion sind bislang nicht bekannt, jedoch sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Varianten in Genen untersucht worden, die im Metabolismus der Standardtherapeutika eine Rolle spielen könnten.

3.6.1 MDR1

In diesem Zusammenhang ist *MDR1*-Gen von besonderem Interesse. *MDR1* kodiert für das transmembranöse P-Glykoprotein, welches aktiv endogene und exogene Substrate, insbesondere Medikamente aus der Zelle heraustransportiert. Hierzu gehören beispielsweise Glucocorticoide, Methotrexat und Cyclosporin A, alles etablierte Therapien bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Das *MDR1*-Gen liegt auf einem IBD-Lokus in der Chromosomenregion 7q21.1. Zudem konnten tierexperimentelle Daten zeigen, dass *MDR*-Knock-out-Mäuse eine spontane Colitis entwickeln, die durch eine antibiotische Therapie erfolgreich behandelt werden kann (221).

Vorläufer-Studien waren zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen, insbesondere bzgl. der Assoziation zweier SNPs (c.2677G>T/A und c.3435C>T) zur Colitis ulcerosa (222-227). Ziel unserer Fall-Kontroll-Studie war es, einen Zusammenhang zwischen den SNPs auf den Positionen c.2677G>T/A und c.3435C>T zu M. Crohn oder Colitis ulcerosa zu detektieren. Zudem wurde untersucht, inwiefern die Effektivität der Therapie mit Glucocorticoiden vom *MDR1*-Genotyp abhängt. Hierzu wurden die Patienten in die drei Gruppen „Ansprechen, Nicht-Ansprechen sowie Abhängigkeit“ der Glucocorticoid-Therapie eingeteilt.

Die Resultate zeigten zwar keine generellen Unterschiede in der Allelfrequenz zwischen M. Crohn, Colitis ulcerosa und Kontrollen in der individuellen Analyse der SNPs. Kombiniert

man hingegen die beiden SNPs, so zeigte sich eine signifikante Überexpression des seltenen Genotyp *c.2677G>T/A/c.3435C>T* bei Colitis ulcerosa-Patienten mit einem jungen Erkrankungsalter <25 Jahre (OR 7.0, 95% CI 2.5–19.7). Zudem untersuchten wir, ob ein schwerer Erkrankungsverlauf – definiert als Steroideinnahme über 1 Jahr, Gabe von Cyclosporin oder Kolektomie bei medikamentösem Therapieversagen – mit einer der *MDR1*-Genotypen assoziiert ist. Nach einer weiteren Stratifizierung hinsichtlich des Erkrankungsalters (<25 Jahre) zeigte sich erneut ein Zusammenhang zwischen *c.2677G>T/A/c.3435C>T* und der schweren Verlaufsform. Ähnliche Zusammenhänge ließen sich für den M. Crohn nicht finden. Die Genotyp-Kombination *c.2677G>T/A/c.3435C>T* im *MDR1*-Gen zeigte zusammenfassend eine Assoziation mit jungem Erkrankungsalter und schwerer Verlaufsform. Allerdings resultierte kein Zusammenhang zum Outcome der Glucocorticoidmedikation. Hier scheinen andere Faktoren eine Rolle zu spielen (228).

Weitere Studien, die im Verlauf *MDR1*-Polymorphismen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht haben, sind zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. Eine Metaanalyse beschreibt nur für die *c.3435C>T*-Variante eine geringe Assoziation zur Colitis ulcerosa (OR 1,36 95% CI 1,05-1,76; 229). Ursachen für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sowohl kleine Fallzahlen als genetische Heterogenität sein, da die Häufigkeit des T-Allels innerhalb der *c.3435C>T*-Variante großen Schwankungen unterworfen ist: Colitis ulcerosa-Patienten zwischen 42,3% bis 65,3%, bei Kontrollen sogar 35,7% bis 63,0%. Neuere Studien aus den Niederlanden und Ungarn zeigen ebenfalls keine Assoziation (230, 231). Zusammenfassend scheinen *MDR1*-Varianten, wenn überhaupt, Suszeptibilitätsfaktoren mit nur geringem Einfluss auf die Colitis ulcerosa zu sein.

Eine kürzlich publizierte schottische Studie beschreibt eine neue Variante im Intron des *MDR1*-Gens, rs3789243, die eine signifikante Assoziation zur Colitis ulcerosa, insbesondere zur Pancolitis, aufwies (232). Dieser Zusammenhang zeigte sich jedoch unabhängig von der oben zitierten *3435C>T*-Variante. Hier müssen zur weiteren Abschätzung Replikationsstudien erfolgen.

3.6.2 Weitere pharmakogenetische Studien

Neben der TPMT-Genotypisierung vor einer Therapie mit Azathioprin und 6-Mercaptopurin zur Identifikation von Patienten mit hohem Risiko einer Myelosuppression haben weitere pharmakogenetische Untersuchungen in erster Linie die Therapien mit Glucocorticoiden und TNF α -Antagonisten untersucht. CED-Patienten mit Mutationen im *hGR-Bcll*-Gen zeigten ein deutlich besseres Ansprechen auf Glucocorticoide (233), allerdings sind diese Beobachtungen bislang noch nicht repliziert worden. Von besonderem Interesse ist zudem die nebenwirkungsreiche und teure Therapie mit TNF α -Antagonisten, die zunehmend auch im Frühstadium der Erkrankung bei schwerem Verlauf eingesetzt wird. Ein Ansprechen der

Therapien mit TNF α -Antagonisten ist unabhängig der gängigen NOD2-Mutationen, die in diesem Zusammenhang als erstes untersucht wurden (39, 234). Interessant sind zudem das *TNF*-Gen, *TNF*-Mikrosateliten sowie die Rezeptoren *TNFRSF1A* und *TNFRSF1B*. Varianten in all diesen Genen können aber nach bisherigem Kenntnisstand das Ansprechen auf die Therapie mit Infliximab beim M. Crohn ebenfalls nicht vorhersagen (235-238). Einer der postulierten Wirkmechanismen von Infliximab ist ein proapoptotischer Effekt auf Monozyten und aktivierte T-Zellen. Eine Analyse von 21 Polymorphismen in Apoptose-Genen konnte hier zwei Genen identifizieren, *Faslg* und *Casp9*, deren Varianten das Ansprechen der Infliximab-Therapie beeinflussten (239). Allerdings stehen auch hier Replikationen noch aus. Zusammenfassend gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt daher außer einer TPMT-Genotypisierung im Rahmen der Anwendung von Azathioprin/6-Mercaptopurin noch keine weiteren Möglichkeiten, Ansprechen und Nebenwirkungen der medikamentösen Standardtherapie durch molekulargenetische Untersuchungen besser vorherzusagen.

4 Ausblick

Die Anzahl an Risikoallelen wird durch neue genomweite Assoziationsstudien sowohl M. Crohn als auch Colitis ulcerosa weiter steigen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass viele Varianten nur einen geringen Effekt haben. Daher sind, insbesondere zur Durchführung robuster Genotyp-Phänotyp-Analysen, internationale Kooperationen notwendig. Das „International IBD Genetics Consortium“ soll hierzu weitere Beiträge leisten.

Zudem sind genomweite Assoziationsstudien als Methode limitiert, seltene Varianten mit großer Penetranz zu identifizieren. Ein weiteres Problem liegt darin, dass die assoziierten Varianten häufig in nicht-kodierenden Regionen oder im Bereich von „gene deserts“ lokalisiert sind und deren Funktionen somit unbekannt sind. Hier werden groß angelegte Sequenzierungsversuche sowie funktionelle Studien hoffentlich helfen, die kausalen Varianten zu identifizieren.

Neben dem Vorhandensein von Risikoallelen scheint zudem von entscheidender Bedeutung, wie oft ein bestimmtes Gen vorliegt (sog. Copy number variants, CNV), was wiederum dessen Aktivität beeinflusst. Erstmals konnte für das *HD2*-Gen (Human Defensin Gen 2) eine Assoziation zum M. Crohn mit Colonbefall hergestellt werden (240). Genomweite Assoziationsstudien erfassen die CNV nicht, so dass hier weitere Techniken entwickelt werden müssen, um den Einfluss der CNVs einzelner interessanter Varianten – *NOD2*, *IL23R*, *ATG16L1* – auf M. Crohn und Colitis ulcerosa zu detektieren.

Idealerweise könnte eine Genotypisierung bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eines Tages wie folgt aussehen: unmittelbar nach Diagnosestellung wird der Patient auf das Vorhandensein von z.B. 10 wichtigen Mutationen untersucht, wodurch Prognosen zum Erkrankungsverlauf gemacht werden können und zudem eine individuelle und nebenwirkungsarme Therapie festgelegt werden kann. An dieser Vision muss noch viel gearbeitet werden. Sollte es allerdings nicht gelingen, die vielen Varianten in einen Kontext zu bringen und entweder klinisch oder therapeutisch zu nutzen, wird der Stellenwert der Genotypisierung in der klinischen Routine und somit für die Patienten gering sein.

5 Zusammenfassung

Kein wissenschaftliches Forschungsgebiet hat in den letzten Jahren einen solchen Zugewinn an Informationen zu der Entstehung diverser Krankheiten beigetragen wie die Molekulargenetik. Glücklicherweise trifft dies insbesondere auf die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu, wo im Vergleich zu anderen Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II sowie die rheumatoide Arthritis deutlich mehr Suszeptibilitätsgene vermutet werden (241). Die Identifikation relevanter pathophysiologischer Konzepte – Bakterienerkennung über das angeborene Immunsystem, Autophagie sowie die Subpopulation der T_H17 -Lymphozyten – stellen einen wichtigen Beitrag dar, hierauf aufbauende neue therapeutische Ansätze werden jedoch weiterhin erwartet.

Die individuelle Genotypisierung eines Patienten könnte jedoch zu folgenden Zwecken verwendet werden: einerseits eine bessere Vorhersagbarkeit des Krankheitsverlaufs mit hieran adaptierter Therapie sowie zudem Ansprechen und Nebenwirkungen des ausgewählten Medikaments. Die gegenwärtige Diskussion einer frühen und aggressiven Therapie beim M. Crohn ist auch dadurch limitiert, dass wir keine relevanten Marker haben, die solche Patienten eindeutig als aggressive Verlaufsform identifizieren.

Bei der Vielzahl der bislang bekannten genetischen Varianten der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen steht weiterhin die *NOD2*-Mutation im Vordergrund. Patienten mit Mutationen im *NOD2*-Gen zeigen einen aggressiven Krankheitsverlauf. Es kommt unabhängig vom Befall des terminalen Ileums im Verlauf häufig zu einer Operation im Ileozökalbereich. Zudem weisen Merkmalsträger ein hohes postoperatives Rezidivrisiko auf. Klinische Studien sollten somit eine Genotypisierung für *NOD2*-Mutationen zur Subklassifizierung durchführen, um zu klären, ob eine aggressivere Therapie – welcher Form auch immer – gerechtfertigt ist. Einen solchen Zusammenhang zu einem bestimmten Phänotyp ist bislang für keine andere Variante beschreiben worden. Dies gilt insbesondere für die p.Arg381Gln-Variante im *IL23R*-Gen sowie p.Thr300Ala-Variante innerhalb des *ATG16L1*-Gens. Möglicherweise müssen hier erst weitere Varianten in T_H17 -Genen (*JAK2*, *STAT3*) sowie in Autophagie-Genen (*IRGM*) untersucht werden, bevor ein definitiver Phänotyp identifiziert werden kann.

Zudem sind erste Varianten identifiziert worden, die einen Einfluss auf die intestinale Barrierestörung beim M. Crohn haben könnten: erneut das *NOD2*-Gen sowie das Myosin-IXb-Gen. Hier zeigen sich Assoziationen zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität in vivo. Ausgehend von der Hypothese, dass die intestinale Barrierestörung entweder ein früher Entwicklungsprozess ist oder nach Ausbrechen der Erkrankung das Rezidivrisiko erhöht, könnte die Beeinflussung dieser beiden Signalwege ein therapeutischer Ansatz zur Rezidivprophylaxe sein. Weitere CED-Gene – *IL23R*, *ATG16L1*, *DLG5*, *CD14*, *TLR4*,

CARD8 – scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Barrierestörung haben. Von besonderem Interesse sind die genauen Mechanismen, mit denen *NOD2* und *MYO9B* die intestinale Permeabilität erhöhen, diese sind jedoch weiterhin unbekannt.

Trotz dieser Fortschritte führt die unerwartet hohe Anzahl an genetischen Varianten für chronisch entzündliche Darmerkrankungen an einen Scheideweg, der über Sinn und Zweck der Genotypisierung entscheiden wird. Der gegenwärtige Kenntnisstand reicht nicht aus, um eine Genotypisierung in Diagnostik oder Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einzubeziehen. Dies wird bislang nur zu wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt. Hier sind zwingend prospektive Studien notwendig, sonst wird der klinische Nutzen für Patienten gering sein.

6 Literatur

1. Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 20:917-23.
2. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Sandborn WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:254-61.
3. Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, Gao ZX, Guo ZR, Wang Z. Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis.* 2005;6:175-81.
4. Tsironi E, Feakins RM, Probert CS, Rampton DS, Phil D. Incidence of inflammatory bowel disease is rising and abdominal tuberculosis is falling in Bangladeshis in East London, United Kingdom. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1749-55.
5. Maté-Jimenez J, Muñoz S, Vicent D, Pajares JM. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988. *J Clin Gastroenterol.* 1994;18:27-31.
6. Aamodt G, Jahnsen J, Bengtson MB, Moum B, Vatn MH; IBSEN Study Group. Geographic distribution and ecological studies of inflammatory bowel disease in southeastern Norway in 1990-1993. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:984-91.
7. Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P. Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol.* 2001;154:328-35.
8. Calkins BM, Lilienfeld AM, Garland CF, Mendeloff AI. Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1984;29:913-20.
9. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut.* 1996;39:690-7.
10. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol.* 1999;149:916-24.
11. Molinié F, Gower-Rousseau C, Yzet T, Merle V, Grandbastien B, Marti R, Lerebours E, Dupas JL, Colombel JF, Salomez JL, Cortot A. Opposite evolution in incidence of

- Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut*. 2004;53:843-8.
12. Sawczenko A, Sandhu BK. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child*. 2003;88:995-1000.
 13. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1989;34:1841-54.
 14. Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, Keane EM, Inui TS. Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1988;23:1147-52.
 15. Cottone M, Rosselli M, Orlando A, Oliva L, Puleo A, Cappello M, Traina M, Tonelli F, Pagliaro L. Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1994;106:643-8.
 16. McGrath J, McDonald JW, Macdonald JK. Transdermal nicotine for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;4:CD004722.
 17. Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1342–52.
 18. Frisch M, Pedersen BV, Andersson RE. Appendicitis, mesenteric lymphadenitis, and subsequent risk of ulcerative colitis: cohort studies in Sweden and Denmark. *BMJ*. 2009;338:b716. doi: 10.1136/bmj.b716.
 19. Tozun N, Atug O, Imeryuz N, Hamzaoglu HO, Tiftikci A, Parlak E, Dagli U, Ulker A, Hulagu S, Akpinar H, Tuncer C, Suleymanlar I, Ovunc O, Hilmioglu F, Aslan S, Turkdogan K, Bahcecioglu HI, Yurdaydin C; Members of the Turkish IBD Study Group. Clinical Characteristics of Inflammatory Bowel Disease in Turkey: A Multicenter Epidemiologic Survey. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43:51-57.
 20. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev*. 2004;3:394-400.
 21. Büning C, Lochs H. Conventional therapy for Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12:4794-806.
 22. Modigliani R, Mary JY, Simon JF, Cortot A, Soule JC, Gendre JP, Rene E. Clinical, biological, and endoscopic picture of attacks of Crohn's disease. Evolution on prednisolone. Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology*. 1990;98:811-8.
 23. Hanauer SB, Korelitz BI, Rutgeerts P, Peppercorn MA, Thisted RA, Cohen RD, Present DH. Postoperative maintenance of Crohn's disease remission with 6-mercaptopurine, mesalamine, or placebo: a 2-year trial. *Gastroenterology*. 2004;127:723-9.

24. Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Hanauer SB. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:402-413.
25. Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM, Zwinderman AH, Runday HK, Han KH, Westedt ML, Gerards AH, van Groenendael JH, Lems WF, van Krugten MV, Breedveld FC, Dijkmans BA. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3381-90.
26. Frøslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH; IBSEN Group. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology.* 2007;133:412-22.
27. Lichtenstein GR, Yan S, Bala M, Blank M, Sands BE. Infliximab maintenance treatment reduces hospitalizations, surgeries, and procedures in fistulizing Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2005;128:862-9.
28. Feagan BG, Panaccione R, Sandborn WJ, D'Haens GR, Schreiber S, Rutgeerts PJ, Loftus EV Jr, Lomax KG, Yu AP, Wu EQ, Chao J, Mulani P. Effects of adalimumab therapy on incidence of hospitalization and surgery in Crohn's disease: results from the CHARM study. *Gastroenterology.* 2008;135:1493-9.
29. Lionetti P, Bronzini F, Salvestrini C, Bascietto C, Canani RB, De Angelis GL, Guariso G, Martellosi S, Papadatou B, Barabino A. Response to infliximab is related to disease duration in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:425-431.
30. Kugathasan S, Werlin SL, Martinez A, Rivera MT, Heikenen JB, Binion DG. Prolonged duration of response to infliximab in early but not late pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3189-3194.
31. Gisbert JP, Panés J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:760-7.
32. Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, Sandborn WJ. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4:621-30.
33. Toruner M, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, Colombel JF, Egan LJ. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2008;134:929-36.

34. Mackey AC, Green L, Leptak C, Avigan M. Hepatosplenic T cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease: update. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;48:386-8.
35. Kempen JH, Daniel E, Dunn JP, Foster CS, Gangaputra S, Hanish A, Helzlsouer KJ, Jabs DA, Kaçmaz RO, Levy-Clarke GA, Liesegang TL, Newcomb CW, Nussenblatt RB, Pujari SS, Rosenbaum JT, Suhler EB, Thorne JE. Overall and cancer related mortality among patients with ocular inflammation treated with immunosuppressive drugs: retrospective cohort study. *BMJ.* 2009;339:b2480. doi:10.1136/bmj.b2480.
36. Travis SPL, Stange EF, Lemann M, Oeresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel J-F, Gionchetti P, Bouhnik Y, Turet E, Kroesen A, Starlinger M, Mortensen NJMcM for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* 2006; 55 suppl 1;i16-i35.
37. Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M. Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease. *Z Gastroenterol.* 2008;46:1094-146.
38. Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens G, Diamond RH, Broussard D, Hegedus R, van der Woude CJ, Sandborn WL. SONIC: a randomized, double-blind, controlled trial comparing infliximab and infliximab plus azathioprine to azathioprine in patients with Crohn's disease naive to immunomodulators and biologic therapy. *J Crohn's Colitis* 2009;3:s45-46.
39. Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Belaiche J, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Vlietinck R, Merlin F, Zouali H, Thomas G, Colombel JF, Hugot JP; NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;123:106-11.
40. H.L. Klaasen, P.J. Van der Heijden, W. Stok, F.G. Poelma, J.P. Koopman, M.E. Van den Brink, M.H. Bakker, W.M. Eling, A.C. Beynen, Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice, *Infect. Immun.* 1993;61:303-306.
41. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122:44-54.

42. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;127:412–421.
43. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, et al. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*. 2004;127:80–93.
44. Ryan P, Kelly RG, Lee G, et al. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease—detection by laser capture microdissection and PCR. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:1539–1543.
45. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599-603.
46. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Gunther S, Prescott NJ, Onnie CM, Hasler R, Sipos B, Folsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-211.
47. Deretic V. Autophagy, an immunologic magic bullet: Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block and how to bypass it. *Future Microbiol*. 2008;3:517-24.
48. Behr MA, Kapur V. The evidence for Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24:17-21.
49. Katz KD, Hollander D, Vadheim CM, et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* 1989;97:927–31.
50. Teahon K, Smethurst P, Levi AJ, et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut* 1992;33:320–3.
51. Hollander D. Permeability in Crohn's disease: altered barrier functions in healthy relatives? *Gastroenterology* 1993;104:1848–51.
52. Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, et al. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993;341:1437–9.
53. Yacyshyn BR, Meddings JB. CD45RO expression on circulating CD19+ B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology* 1995;108:132–7.
54. Peeters M, Geypens B, Claus D, et al. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;113:802–7.

55. Soderholm JD, Olaison G, Lindberg E, et al. Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence? *Gut* 1999;44:96–100.
56. Fries W, Renda MC, Lo Presti MA, Raso A, Orlando A, Oliva L, Giofré MR, Maggio A, Mattaliano A, Macaluso A, Cottone M. Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:2730-6.
57. D'Inca` R, Annese V, di Leo V, Latiano A, Quaino V, Abazia C, Vettorato MG, Sturniolo GC. Increased intestinal permeability and NOD2 variants in familial and sporadic Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:1455-61.
58. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000;119:1740–4.
59. D'Inca` R, Sturniolo GC, Martines D, et al.. Functional and morphological changes in small bowel of Crohn's disease patients. Influence of site of disease. *Dig Dis Sci* 1995;40:1388–93.
60. Miki K, Moore DJ, Buther RN, et al. The sugar permeability test reflects disease activity in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 1998;133:750–4.
61. Sanderson IR, Boulton P, Menzies I, et al. Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut* 1987;28:1073–6.
62. Teahon K, Smethurst P, Pearson M, et al. The effect of elemental diet on intestinal permeability and inflammation in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991;101:84–9.
63. Breslin NP, Nash C, Hilsden RJ, et al. Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2934–8.
64. Parrilli G, Orsini L, Corsaro M, Bianco MA, Coccoli P, Garofano ML, Rotondano GG, Cipolletta L. Is intestinal permeability test useful for asymptomatic Crohn's disease? *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:1189-90.
65. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 2006;131:117–129.
66. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature.* 2007;446:557-61.

67. Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 2008;5:e54.
68. Wapenaar MC, Monsuur AJ, van Bodegraven AA, Weersma RK, Bevova MR, Linskens RK, Howdle P, Holmes G, Mulder CJ, Dijkstra G, van Heel DA, Wijmenga C. Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2008;57:463-7.
69. Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, Nieuwenhuis EE, Higgins DE, Schreiber S, Glimcher LH, Blumberg RS. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell.* 2008;134:743-56.
70. McGovern DP, Taylor KD, Landers C, Derkowski C, Dutridge D, Dubinsky M, Ippoliti A, Vasiliauskas E, Mei L, Mengesha E, King L, Pressman S, Targan SR, Rotter JI. MAGI2 genetic variation and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:75-83.
71. Marano CW, Lewis SA, Garulacan LA, et al. Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line. *J Membr Biol* 1998;161:263-74.
72. Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, et al. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:193-203.
73. Tsao N, Hsu HP, Wu CM, et al. Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis. *J Med Microbiol* 2001;50:812-21.
74. Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2000-4.
75. Kobayashi K.S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, R.A. Flavell, Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract, *Science.* 2005;307:731e734.
76. S. Maeda, L.C. Hsu, H. Liu, L.A. Bankston, M. Iimura, M.F. Kagnoff, L. Eckmann, M. Karin, Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NFkappaB activity and IL-1beta processing, *Science.* 2005;307:734e738.
77. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science.* 2006;314:1461-3.

78. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol.* 1993;94:174-81.
79. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med.* 1997;337:1029-35.
80. Binder, V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis.* 1998;16:351-355.
81. Bennett RA, Rubin PH, Present DH. Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1991;100:1638-43.
82. Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Bélaïche J, Fiasse R, Dupas JL, Lerebours E, Piotte S, Cortot A, Vermeire S, Grandbastien B, Colombel JF. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology.* 2001;120:816-9.
83. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts P. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology.* 1996;111:597-603.
84. Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut.* 1993;34:517-24.
85. Mayberry JF, Judd D, Smart H, Rhodes J, Calcraft B, Morris JS. Crohn's disease in Jewish people--an epidemiological study in south-east Wales. *Digestion.* 1986;35:237-40.
86. Bonen DK, Cho JH The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2003;124:521-36.
87. Purrmann J, Bertrams J, Knapp M, Cleveland S, Hengels KJ, Gemsa R, Strohmeyer G. Gene and haplotype frequencies of HLA antigens in 269 patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 1990;25:981-5.
88. Elmgreen J, Sørensen H, Berkowicz A. Polymorphism of complement C3 in chronic inflammatory bowel disease. Predominance of the C3F gene in Crohn's disease. *Acta Med Scand.* 1984; 215:375-8.
89. Katakura S, Einarsson K, Hammarström L, Smith CI. Restriction fragment length polymorphism analysis of T-cell receptor genes in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1989;24:381-4.

90. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996;379:821-3.
91. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411:603-6.
92. 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;357:1925-8.
93. Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet*. 2001;29:223-8.
94. Silverberg, M.S. et al. Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease. *Eur. J. Hum. Genet*. 2007;15:328–335
95. Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, Landers C, Jewell DP. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1997;112:1845-53.
96. Silverberg MS, Mirea L, Bull SB, Murphy JE, Steinhart AH, Greenberg GR, McLeod RS, Cohen Z, Wade JA, Siminovitch KA. A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9:1-9.
97. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ.

- Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40:955-62.
98. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH; IBSEN study group, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet.* 2008;40:1319-23.
99. Lewis JR, Konda V, Rubin DT. Genetic Testing for Inflammatory Bowel Disease: Focus Group Analysis of Patients and Family Members. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13:495-503.
100. Büning C, Genschel J, Bühner S, Krüger S, Kling K, Dignass A, Baier P, Bochow B, Ockenga J, Schmidt H, Lochs H. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004;19:1073 -1079.
101. Büning C, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Weltrich R, Bochow B, Genschel J, Schmidt H, Lochs H. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: Is Hungary different? *World Journal of Gastroenterology,* 2005;11:407-11.
102. A.L. Pauleau, P.J. Murray, Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists, *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:7531e7539.
103. T. Watanabe, A. Kitani, P.J. Murray, W. Strober, NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses, *Nat. Immunol.* 2004;5:800e808.
104. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut.* 2004;53:1658-64.
105. Bühner S, Büning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut.* 2006;55:342-7.
106. M.G. Netea, G. Ferwerda, D.J. de Jong, S.E. Girardin, B.J. Kullberg, J.W. van der Meer, NOD2 3020insC mutation and the pathogenesis of Crohn's disease: impaired IL-1beta production points to a loss-of-function phenotype. *Neth. J. Med.* 2005;63:305e308.

107. J. Li, T. Moran, E. Swanson, C. Julian, J. Harris, D.K. Bonen, M. Hedl, D.L. Nicolae, C. Abraham, J.H. Cho, Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations, *Hum. Mol. Genet*, 2004;13:1715e1725.
108. Abraham C, Cho J. Functional Consequences of NOD2 (CARD15) Mutations. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:641–650.
109. Oostenbrug LE, Nolte IM, Oosterom E, van der Steege G, te Meerman GJ, van Dullemen HM, Drenth JP, de Jong DJ, van der Linde K, Jansen PL, Kleibeuker JH. CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis* 2006;38:834-45.
110. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun*. 2004;5:417-25.
111. Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Farkkila M, Krusius T, Kontula K. CARD15/ NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003;52:558-562.
112. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:86-91.
113. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-1470.
114. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996;38:738-41.
115. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18:525-39.
116. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2393-404.
117. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and Nod 2 gene: a role for paneth cell. *Gastroenterology* 2003;125:47–57.
118. Büning C, Fiedler T, Gentz E, Genschel J, Schmidt H, Lochs H, Swidsinski A. CARD15 mutations decrease the mucosal bacterial flora in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006. S130 Suppl:T1978

119. Kugathasan S, Collins N, Maresco K, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology & Hepatology*. 2004;2:1003–1009.
120. Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease—an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:84–92.
121. Russell R, Drummond H, Nimmo E, Anderson N, Smith L, Wilson D, Gillett P, McGrogan P, Hassan K, Weaver L, Bisset M, Mahdi G, Satsangi J. Genotype-phenotype Analysis in Childhood-onset Crohn's Disease: NOD2/CARD15 Variants Consistently Predict Phenotypic Characteristics of Severe Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:955–964.
122. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, Tassies D, Plaza S, Delgado S, Lacy AM, Pique JM, Yagüe J, Panés J. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg*. 2005;242:693-700.
123. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, Hofbauer K, Dambacher J, Tillack C, Sackmann M, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41:1421-32.
124. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:854-66.
125. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123:679–688.
126. R. Kalluri, E.G. Neilson, Epithelial–mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *J. Clin. Invest* 2003;112:1776–1784.
127. di Mola F.F., H. Friess, A. Scheuren, S.P. Di, H. Graber, B. Egger, A. Zimmermann, M. Korc, M.W. Buchler, Transforming growth factor-betas and their signalling receptors are coexpressed in Crohn's disease, *Ann. Surg*. 1999;229:67–75.
128. Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, Picariello L, Cazzola P, Monteleone G, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT, Pender SL. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut*. 2009;58:777-89.

129. Scarpa M, Bortolami M, Morgan SL, Kotsafti A, Ferraro S, Ruffolo C, D'Inca R, Polese L, Barollo M, D'Amico DF, Sturniolo GC, Angriman I. TGF-beta1 and IGF-1 Production and Recurrence of Crohn's Disease After Ileo-Colonic Resection. *J Surg Res.* 2009;152:26-34.
130. Benjamin J, Makharia GK, Ahuja V, Kalaivani M, Joshi YK. Intestinal permeability and its association with the patient and disease characteristics in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:1399-405.
131. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-57.
132. McGovern DP, Butler H, Ahmad T, et al. TUCAN (CARD8) genetic variants and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2006;131:1190–1196.
133. Büning C, Schmidt HH, Molnár T, Drenth JP, Fiedler T, Gentz E, Todorov T, Baumgart DC, Sturm A, Nagy F, Lonovics J, de Jong DJ, Landt O, Kage A, Nickel R, Büttner J, Lochs H, Witt H. No association of the CARD8 (TUCAN) c.30T>A (p.C10X) variant with Crohn's disease: a study in 3 independent European cohorts. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:332-7.
134. Franke A, Rosenstiel P, Balschun T, Von Kampen O, Schreiber S, Sina C, Hampe J, Karlsen TH, Vatn MH; IBSEN Study Group, Solberg C. No association between the TUCAN (CARD8) Cys10Stop mutation and inflammatory bowel disease in a large retrospective German and a clinically well-characterized Norwegian sample. *Gastroenterology.* 2007;132:2080-1.
135. Hruz P, Eckmann L: Caspase recruitment domain-containing sensors and adaptors in intestinal innate immunity. *Curr Opin Gastroenterol* 2008, 24:108-114.
136. McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WO, Jewell DP: Association between a complex insertion/ deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2005;14:1245-1250.
137. Franke A, Ruether A, Wedemeyer N, Karlsen TH, Nebel A, Schreiber S: No association between the functional CARD4 insertion/ deletion polymorphism and inflammatory bowel diseases in the German population. *Gut* 2006, 55:1679-1680.
138. Tremelling M, Hancock L, Bredin F, Sharpstone D, Bingham SA, Parkes M: Complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) is not associated with inflammatory bowel disease susceptibility in East Anglia panel. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12:967-971.
139. Van Limbergen J, Nimmo ER, Russell RK, Drummond HE, Smith L, Anderson NH, Davies G, Arnott ID, Wilson DC, Satsangi J: Investigation of NOD1/CARD4

- variation in inflammatory bowel disease using a haplotype-tagging strategy. *Hum Mol Genet* 2007;16:2175-2186.
140. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Torkvist L, Lees CW, Drummond HE, Smith L, Anderson NH, Gillett PM, McGrogan P, et al.: Contribution of the NOD1/CARD4 insertion/deletion polymorphism +32656 to inflammatory bowel disease in Northern Europe. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:882-889.
 141. Zhernakova A, Festen EM, Franke L, Trynka G, van Diemen CC, Monsuur AJ, Bevova M, Nijmeijer RM, van 't Slot R, Heijmans R, Boezen HM, van Heel DA, van Bodegraven AA, Stokkers PC, Wijmenga C, Crusius JB, Weersma RK. Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am J Hum Genet.* 2008;82:1202-10.
 142. Cario E, Podolsky DK: Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010–7017.
 143. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ: Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005;129:50–65.
 144. Baumgart DC, Büning C, Philipp L, Schmidt H, Genschel J, Fiedler T, Gentz E, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Lochs H, Wiedenmann B, Witt H, Dignass A. The -260 C>T promoter variant of the CD14, but not the D299G variant of the toll-like receptor 4 (TLR-4) genes are associated with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2007;;76:196-202.
 145. Obana N, Takahashi S, Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, Hiwatashi N, Shimosegawa T. Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37:699-704.
 146. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonopoulou J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol.* 2005;11:681-5.
 147. Klein W, Tromm A, Griga T, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, et al. Interaction of polymorphisms in the CARD15 and CD14 genes in patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:834-6.
 148. Griga T, Wilkens C, Schmiegel W, Folwaczny C, Hagedorn M, Duerig N, Eppelen J, Klein W. Association between the promoter polymorphism T/C at position -

- 159 of the CD14 gene and anti-inflammatory therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Med Res*. 2005;10:183-6.
149. Peters KE, O'Callaghan NJ, Cavanaugh JA. Lack of association of the CD14 promoter polymorphism--159C/T with Caucasian inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40:194-7.
150. Leung E, Hong J, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Abbott WG, Krissansen GW. Polymorphisms of CARD15/NOD2 and CD14 genes in New Zealand Crohn's disease patients. *Immunol Cell Biol*. 2005;83:498-503.
151. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, Belaiche J, Vermeire S, Farwell L, Goris A, Libioulle C, Jani N, Dassopoulos T, Bromfield GP, Dubois B, Cho JH, Brant SR, Duerr RH, Yang H, Rotter JI, Silverberg MS, Steinhardt AH, Daly MJ, Podolsky DK, Louis E, Hafler DA, Rioux JD; Quebec IBD Genetics Consortium; NIDDK IBD Genetics Consortium. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun*. 2007;8:387-97.
152. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:1760-6.
153. Browning BL, Huebner C, Petermann I, Geary RB, Barclay ML, Shelling AN, Ferguson LR. Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2504-12.
154. Rigoli L, Romano C, Caruso RA, Lo Presti MA, Di Bella C, Procopio V, Lo Giudice G, Amorini M, Costantino G, Sergi MD, Cuppari C, Calabro GE, Gallizzi R, Salpietro CD, Fries W. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14:4454-61.
155. Miehsler W, Puspok A, Oberhuber T, et al. Impact of different therapeutic regimens on the outcome of patients with Crohn's disease of the upper gastrointestinal tract. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:99-105.
156. De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005;33:1125-35.
157. Ferraris RP, Carey HV. Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu Rev Nutr* 2000;20:195-219.
158. Hart A, Kamm MA. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:2017-28.

159. Soderholm JD, Yang PC, Ceponis P, et al. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 2002;123:1099–108.
160. Sasaki M, Sitaraman SV, Babbin BA, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Garrett N, Alpern JA, Akyildiz A, Theiss AL, Nusrat A, Klapproth JM. Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. *Lab Invest.* 2007;87:1042-54.
161. Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol.* 2007;178:4641– 4649.
162. Thjodleifsson B, Sigthorsson G, Cariglia N, Reynisdottir I, Gudbjartsson DF, Kristjansson K, Meddings JB, Gudnason V, Wandall JH, Andersen LP, Sherwood R, Kjeld M, Oddsson E, Gudjonsson H, Bjarnason I. Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives? *Gastroenterology.* 2003;124:1728-37.
163. Van de Merwe JP, Schroder AM, Wensinck F, et al. The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:1125–31.
164. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seeger D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet.* 2004;36:476-80.
165. Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, et al. Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* *dlg*, *P-dlg*, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett.* 1998;433:63–7
166. Büning C, Geerds L, Fiedler T, Gentz E, Pitre G, Reuter W, Luck W, Buhner S, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Dignass A, Landt O, Nickel R, Genschel J, Lochs H, Schmidt HH, Witt H. *DLG5* variants in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:786-92.
167. Brian L. Browning, Murray L. Barclay, Sheila A. Bingham, Carsten Büning, Massimo Castro, Lynnette R. Ferguson, Sheila Fisher, Richard B. Geary, Jürgen Glas, Claudia Huebner, Laszlo Lakatos, Peter Laszlo Lakatos, Xiangdong Liu, Christopher Mathew, William G. Newman, Miles Parkes, Ivonne Petermann, Paul Rutgeerts, Andrew N. Shelling, Katherine A. Siminovitch, Helga-Paula Török, Mark Tremelling, Séverine Vermeire, Heiko Witt. Gender-stratified analysis of *DLG5* R30Q in 4707 Crohn's disease patients and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts. *J Med Genet.* 2008;45:36-42.

168. Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zhernakova A, Bevova MR, Strengman E, Franke L, van't Slot R, van Belzen MJ, Lavrijsen IC, Diosdado B, Daly MJ, Mulder CJ, Mearin ML, Meijer JW, Meijer GA, van Oort E, Wapenaar MC, Koeleman BP, Wijmenga C. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet.* 2005;37:1341-4.
169. Büning C, Durmus T, Monar T, de Jong DJ, Drenth J, Haas V, Bühner S, Sturm A, Baumgart D, Nagy F, Lonovics J, Büttner J, Lochs H, Schmidt H, Witt H. Myosin IXb-Gen-Varianten erhöhen das Risiko für die Entwicklung eines M. Crohn: Hinweise für einen primären Epitheldefekt. *Z Gastroenterol* 9/2008;Band XLVI P014.
170. Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, D'Inca R, Caprilli R, Cucchiara S, Sturniolo GC, Bossa F, Andriulli A, Annese V. The association of MYO9B gene in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27:241-8.
171. Cooney R, Cummings JR, Pathan S, Beckly J, Geremia A, Hancock L, Guo C, Morris A, Jewell DP. Association between genetic variants in myosin IXB and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:1014-21.
172. Muise AM, Walters TD, Glowacka WK, Griffiths AM, Ngan BY, Lan H, Xu W, Silverberg MS, Rotin D. Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut* 2009;58:1121-7.
173. Büning C, Saupe N, Haas V, Bühner S, Baumgart D, Sturm A, Büttner J, Schmidt H, Lochs H. Epitheliale Barriere-defekte bei Colitis ulcerosa? Ergebnisse einer Familienstudie. *Z Gastroenterol* 9/2008;Band XLVI: P030.
174. Haas V, C. Büning, S. Buhner, C. von Heymann, L. Valentini and H. Lochs. Clinical relevance of measuring colonic permeability. *Eur J Clin Invest* 2009; 39:139–144.
175. Büning C, Schmidt HH, Molnar T, De Jong DJ, Fiedler T, Bühner S, Sturm A, Baumgart DC, Nagy F, Lonovics J, Drenth JP, Landt O, Nickel R, Büttner J, Lochs H, Witt H. Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers a protective effect not only against Crohn's disease but also ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:1025-33.
176. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect.* 2009;11:625-30.
177. Hue S, Ahern P, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006;203:2473–83.
178. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310–6.

179. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 2007;80:273–390.
180. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, et al. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. *N Engl J Med* 2004;351:2069–79.
181. Kauffman CL, Aria N, Toichi E, et al. A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *J Invest Dermatol* 2004;123:1037–44.
182. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, et al. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;132:1657–1664.
183. Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, et al. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1063–1068.
184. Van Limbergen JE, Russell RK, Nimmo ER, et al. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut*. 2007;56:1173–1174.
185. Oliver J, Rueda B, Lopez-Nevot MA, et al. Replication of an association between IL23R gene polymorphism with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:977–981.
186. 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;102:2754–2761.
187. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, et al. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:972–976.
188. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet*. 2007;52:575-83.
189. Büning C, Durmus T, Molnar T, de Jong DJ, Drenth JP, Fiedler T, Gentz E, Todorov T, Haas V, Buhner S, Sturm A, Baumgart DC, Nagy F, Lonovics J, Landt O, Kage A, Büning H, Nickel R, Büttner J, Lochs H, Schmidt HH, Witt H. 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 Crohn's and Colitis*, 2007;1,70-76.

190. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW 4th. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008;456:259-63.
191. Valentini L, Wirth EK, Schweizer U, Hengstler S, Schaper L, Koernicke T, Dietz E, Norman K, Buning C, Winklhofer-Roob BM, Lochs H, Ockenga J. Circulating adipokines and the protective effects of hyperinsulinemia in inflammatory bowel disease. *Nutrition*. 2009;25:172-81.
192. Batra A, Zeitz M, Siegmund B. Adipokine signaling in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1897-1905.
193. 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:e3391.
194. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008;456:264–268.
195. Márquez A, Núñez C, Martínez A, Mendoza JL, Taxonera C, Fernández-Arquero M, Díaz-Rubio M, de la Concha EG, Urcelay E. Role of ATG16L1 Thr300Ala polymorphism in inflammatory bowel disease: A Study in the Spanish population and a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1697-704.
196. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L, Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2007;39:830-2.
197. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, Zody MC, Hall JL, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Silverberg MS, Taylor KD, Rioux JD, Altshuler D, Daly MJ, Xavier RJ. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40:1107-12.
198. 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;132:1665–1671.
199. von Tirpitz C, Kohn C, Steinkamp M, Geerling I, Maier V, Moller P, et al. Lactose intolerance in active Crohn's disease: clinical value of duodenal lactase analysis. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:49–53.

200. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002;30:233–7.
201. Büning C, Ockenga J, Krüger S, Jurga J, Baier P, Dignass A, Vogel A, Strassburg C, Weltrich R, Genschel J, Lochs H, Schmidt H. The C/C₋₁₃₉₁₀ and G/G₂₂₀₁₈ genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2003;38:538-42.
202. Büning C, Jurga J, Fiedler T, K pferling S, Worm M, Weltrich R, Genschel J, Lochs H, Schmidt H, Ockenga J. Introducing genetic testing for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005;71:245-250
203. Obermayer-Pietsch B, Bonelli C, Walter C, Kuhn RJ, Fahrleitner-Parmer A, Berghold A, Goessler W, Stepan V, Dobnig H, Leb G, Renner W. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J Bone Miner Res.* 2004;19:42–47.
204. Büning C, Schmidt H, Lochs H, Ockenga J. Genetic components of lactose intolerance and community frequency. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004;19:1746.
205. Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, et al. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2000;67:1605–1610.
206. Achkar JP, Dassopoulos T, Silverberg MS, et al. Phenotype-stratified genetic linkage study demonstrates that IBD2 is an extensive ulcerative colitis locus. *Am J Gastroenterol* 2006;101:572– 580.
207. Baribault H, Penner J, Iozzo RV, Wilson-Heiner M. Corectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes Dev* 1994;8:2964–73.
208. Ku NO, Gish R, Wright TL, Omary MB. Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *N Engl J Med* 2001;344:1580–7.
209. Cavestro GM, Frulloni L, Nouvenne A, Neri TM, Calore B, Ferri B, et al. Association of keratin 8 gene mutation with chronic pancreatitis. *Dig Liver Dis* 2003;35:416–20.
210. Büning C, Halangk J, Dignass A, Ockenga J, Deindl P, Nickel R, Genschel J, Landt O, Lochs H, Schmidt H, Witt H. Keratin 8 Y54H and G62C mutations are not associated with inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*, 2004;36:388-391.
211. Tao GZ, Strnad P, Zhou Q, Kamal A, Zhang L, Madani ND, Kugathasan S, Brant SR, Cho JH, Omary MB, Duerr RH. Analysis of keratin polypeptides 8 and 19 variants in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:857-64.

212. Owens DW, Wilson NJ, Hill AJ, Rugg EL, Porter RM, Hutcheson AM, Quinlan RA, van Heel D, Parkes M, Jewell DP, Campbell SS, Ghosh S, Satsangi J, Lane EB. Human keratin 8 mutations that disturb filament assembly observed in inflammatory bowel disease patients. *J Cell Sci.* 2004;117:1989-99.
213. Lees CW, Zacharias WJ, Tremelling M, Noble CL, Nimmo ER, Tenesa A, Cornelius J, Torkvist L, Kao J, Farrington S, Drummond HE, Ho GT, Arnott ID, Appelman HD, Diehl L, Campbell H, Dunlop MG, Parkes M, Howie SE, Gumucio DL, Satsangi J. Analysis of germline GLI1 variation implicates hedgehog signalling in the regulation of intestinal inflammatory pathways. *PLoS Med.* 2008;5:e239.
214. Cho, J.H., Nicolae, D.L., Gold, L.H., Fields, C.T., LaBuda, M.C., Rohal, P.M., Pickles, M.R., Qin, L., Fu, Y., Mann, J.S. et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A USA*;1998;95:7502.
215. Duerr, R.H., Barmada, M.M., Zhang, L., Pfutzer, R. & Weeks, D.E. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11. The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. *J Hum Genet* 2000;66:1857-62.
216. Ma, Y., Ohmen, J.D., Li, Z., Bentley, L.G., McElree, C., Pressman, S., Targan, S.R., Fischel-Ghodsian, N., Rotter, J.I. & Yang, H. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 1999;5:271.
217. Pierik M, Yang H, Barmada MM, Cavanaugh JA, Annese V, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Hugot JP, McGovern DP, Paavola-Sakki P, Radford-Smith GL, Pavli P, Silverberg MS, Schreiber S, Taylor KD, Vlietinck R; IBD International Genetics Consortium. *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:1-7.
218. Fort, M.M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S.M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R. et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15:985-95.
219. Pan, G., French, D., Mao, W., Maruoka, M., Risser, P., Lee, J., Foster, J., Aggarwal, S., Nicholes, K., Guillet, S. et al. Forced expression of murine IL-17E induces growth retardation, jaundice, a Th2-biased response, and multiorgan inflammation in mice. *Journal of Immunology.* 2001;167:6559-67.
220. Büning C, Genschel J, Weltrich R, Lochs H, Schmidt H. The interleukin-25 gene located in the inflammatory bowel disease (IBD) 4 region: no association with inflammatory bowel disease. *European Journal of Immunogenetics*, 2003;30:329-333.

221. Panwala CM, Jones JC, Viney JL A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol.* 1998;161:5733–5744.
222. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C et al Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2003;24:26–33
223. Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *J. Hum Mol Genet.* 2006;15:797-805.
224. Croucher PJ, Mascheretti S, Foelsch UR et al Lack of association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and inflammatory bowel disease in two independent Northern European populations. *Gastroenterology.* 2003;125:1919–1920.
225. Gazouli M, Zacharatos P, Gorgoulis V et al The C3435T MDR1 gene polymorphism is not associated with susceptibility for ulcerative colitis in Greek population. *Gastroenterology* 2004;126:367-69.
226. Glas J, Torok HP, Schiemann U et al MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2004;126:367.
227. Onnie CM, Fisher SA, Pattni R, Sanderson J, Forbes A, Lewis CM, Mathew G Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (*ABCB1* or *MDR1*) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:263–271.
228. Fiedler T, Büning C, Reuter W, Pitre G, Gentz E, Schmidt H, Büttner J, Bochow B, Ockenga J, Gerloff T, Meisel C, Roots I, Lochs H, Köpke K, Johne A. Possible role of MDR1 two-locus genotypes for young-age onset ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63:917-25.
229. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2006;12:3636-44.
230. Fischer S, Lakatos PL; Hungarian IBD Study Group, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szilvasi A, Tulassay Z, Osztovits J, Papp J, Demeter P, Schwab R, Tordai A, Andrikovics H. ATP-binding cassette transporter *ABCG2* (*BCRP*) and *ABCB1* (*MDR1*) variants are not associated with disease susceptibility, disease phenotype response to medical therapy or need for surgery in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42:726-33.

231. Oostenbrug LE, Dijkstra G, Nolte IM, van Dullemen HM, Oosterom E, Faber N, de Jong DJ, van der Linde K, te Meerman GJ, van der Steege G, Kleibeuker JH, Jansen PL (2006) Absence of association between the multidrug resistance (MDR1) gene and inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 41:1174–1182.
232. Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A et al (2005) Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 128:288–296.
233. De Iudibus S, Stocco G, Martelossi S, Drigo I, Norbedo S, Lionetti P, Pozzi E, Barabino A, Decorti G, Bartoli F, Ventura A. Association of BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene locus with response to glucocorticoids in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007;56:1319-20.
234. Mascheretti S, Hampe J, Croucher PJ, Nikolaus S, Andus T, Schubert S, Olson A, Bao W, Fölsch UR, Schreiber S. Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics*. 2002;12:509-15.
235. Taylor KD, Plevy SE, Yang H, Landers CJ, Barry MJ, Rotter JI, Targan SR. ANCA pattern and LTA haplotype relationship to clinical responses to anti-TNF antibody treatment in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2001;120:1347-55.
236. Mascheretti S, Hampe J, Kühbacher T, Herfarth H, Krawczak M, Fölsch UR, Schreiber S. Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. *Pharmacogenomics J*. 2002;2:127-36.
237. Pierik M, Vermeire S, Steen KV, Joossens S, Claessens G, Vlietinck R, Rutgeerts P. Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20:303-10.
238. Dideberg V, Théâtre E, Farnir F, Vermeire S, Rutgeerts P, Vos MD, Belaiche J, Franchimont D, Gossum AV, Louis E, Bours V. The TNF/ADAM 17 system: implication of an ADAM 17 haplotype in the clinical response to infliximab in Crohn's disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16:727-734.
239. Hlavaty T, Ferrante M, Henckaerts L, Pierik M, Rutgeerts P, Vermeire S. Predictive model for the outcome of infliximab therapy in Crohn's disease based on apoptotic pharmacogenetic index and clinical predictors. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:372-9.
240. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF A chromosome

8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet.* 2006;79:439-48.

241. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;447:661-78.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Lochs danke ich von ganzem Herzen für die mir gewährte hervorragende Unterstützung in der langjährigen Zusammenarbeit und für die Möglichkeit, früh wissenschaftlich selbstständig zu arbeiten. Seine Ideen, kritische Denkart und klinische Expertise wird mir immer Vorbild bleiben.

Ich danke Frau Dr. Janine Büttner und Herrn Prof. Dr. Hartmut Schmidt, die mir den Einstieg in die molekulargenetischen Untersuchungen ermöglicht haben und ohne deren langjährigen Beistand diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des molekulargenetischen Labors, Frau Bettina Bochow, Frau Renita Weltrich, Frau Sabina Naranjo Kuchta und Frau Martina Werich.

Herrn Prof. Dr. Heiko Witt danke ich für die langjährige exzellente Kooperation und Unterstützung und freue mich, mit seiner Hilfe künftig weitere Projekte zu entwickeln.

Zudem danke ich meinen Kooperationspartnern PD Dr. Andreas Sturm sowie PD Dr. Daniel Baumgart vom Campus Virchow der Charité, PD Dr. Tamás Molnar von der Universität Szeged, Ungarn, sowie Prof. Joost Drenth und Dr. Dirk de Jong von der Universität Nijmegen, Holland.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Hannelore und Prof. Dr. Herbert Büning, meiner Schwester Nicola und meinen Schwiegereltern Sylvia und Joachim Woltmann für ihre Unterstützung.

In allererster Linie gilt mein Dank meiner Frau Carola und meinen Kindern Clara und Christopher. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift