

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Alexander L. Gerbes

**Die Rolle des Autophagie-Gens *IRGM* bei chronisch entzündlichen
Darmerkrankungen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Stephanie Bues

aus München

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Brand

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Eigler, Prof. Dr. Thomas Ochsenkühn

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2015

Meiner Familie und meinem Freund.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung	3
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	3
1.1.1 Epidemiologie.....	5
1.1.2 Morbus Crohn.....	5
1.1.2.1 Pathologie.....	5
1.1.2.2 Symptomatik und Komplikationen.....	6
1.1.2.3 Diagnostik.....	9
1.1.2.4 Therapie und Prognose.....	13
1.1.3 Colitis ulcerosa.....	16
1.1.3.1 Pathologie.....	16
1.1.3.2 Symptomatik und Komplikationen.....	17
1.1.3.3 Diagnostik.....	18
1.1.3.4 Therapie und Prognose.....	21
1.1.4 Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	24
1.1.4.1 Umweltfaktoren.....	25
1.1.4.2 Genetische Faktoren.....	27
1.1.4.3 Mikrobielle und immunologische Faktoren.....	32
1.1.4.4 Besonderheiten der Pathogenese bei Morbus Crohn.....	38
1.1.4.5 Besonderheiten der Pathogenese bei Colitis ulcerosa.....	40
1.1.4.6 Zusammenfassende Aspekte der Pathogenese.....	41
1.2 Autophagie und das Autophagie-Gen <i>IRGM</i>.....	41
1.2.1 Autophagie.....	41
1.2.2 „Immunity-related GTPasen“.....	44
1.2.3 Bedeutung von <i>IRGM</i>	45
2 Zielsetzung der Arbeit.....	52
3 Studienpopulation.....	54
3.1 Patientenkollektiv.....	54
3.2 Kontrollkollektiv.....	54
3.3 Phänotyp-Definition.....	54
4 Methoden.....	57

4.1	DNA-Extraktion	57
4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	57
4.3	Gelelektrophorese von PCR-Produkten	58
4.4	Genotypisierung der <i>IRGM</i>-Varianten	58
4.4.1	Die Polymerase-Kettenreaktion.....	59
4.4.2	Fluorescence resonance energy transfer (FRET) -Sonden.....	63
4.4.3	Schmelzkurvenanalyse.....	66
4.4.4	Praktische Durchführung.....	67
4.4.5	Genotypisierung der <i>NOD2</i> -, <i>IL23R</i> - und <i>ATG16L1</i> -Varianten.....	70
4.4.6	Statistische Analysen	70
5	Material	71
6	Ergebnisse	74
6.1	Suszeptibilitätsanalyse.....	74
6.2	Haplotypen-Analyse	78
6.3	Genotyp-Phänotyp-Analyse	85
6.4	Epistasis-Analyse.....	88
7	Diskussion	91
7.1	Aktuelles Verständnis der Pathogenese von CED	91
7.2	Analyse von <i>IRGM</i> -Genvarianten bzgl. der M. Crohn-Suszeptibilität.....	96
7.3	<i>IRGM</i> -Haplotypen-Analyse	98
7.4	Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	99
7.5	Epistasis-Analyse für <i>IRGM</i> mit anderen M. Crohn-Hauptsuszeptibilitätsgenen	100
8	Zusammenfassung	104
9	Anhang	107
9.1	Tabellenverzeichnis	107
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	109
9.3	Literaturverzeichnis.....	111
9.4	Abkürzungen und Begriffe	140
9.5	Danksagung.....	148
9.6	Lebenslauf.....	150

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) zählen zu den wichtigsten immunologisch vermittelten Erkrankungen; dazu zählen auch die Rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus erythematodes, die Multiple Sklerose, der Typ-1-Diabetes, sowie die Psoriasis. Obwohl die Beteiligung autoimmuner Prozesse bei Erkrankungen wie CED in Frage gestellt wird, weisen sich überschneidende genetische Assoziationen auf eine gemeinsame Pathogenese hin. Neben verschiedenen epidemiologischen, klinischen und therapeutischen Merkmalen, welche diese Erkrankungen sich teilen, ist allen eine chronische und oftmals intermittierend auftretende Entzündung gemeinsam. Diese Inflammation trägt im Laufe der Zeit dazu bei, das Zielorgan zu zerstören, da dieses bestimmte Antigene beherbergt oder Immunkomplexe hier abgelagert werden. (Cho & Gregersen, 2011)

Zu den beiden Hauptformen der CED gehören Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa (C. ulcerosa), die ähnliche Symptome verursachen, allerdings unterschiedliche pathologische Merkmale besitzen. Zu den anderen unspezifischen entzündlichen Darmerkrankungen zählen die mikroskopischen Kolitiden, darunter die beiden klinisch identisch in Erscheinung tretenden, histologisch jedoch unterschiedlichen Krankheitsbilder, die kollagene Kolitis und die lymphozytäre Kolitis. (Kabi et al., 2011; Stewart et al., 2011)

Mitte des 19. Jahrhunderts wurde C. ulcerosa erstmals beschrieben, deutlich später wurde im Jahre 1932 vom M. Crohn berichtet. Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Hauptformen M. Crohn und C. ulcerosa zeigen sich in ihren epidemiologischen, klinischen und therapeutischen Eigenschaften, sowie in ihren histologischen und radiologischen Auffälligkeiten. Da der M. Crohn ebenfalls häufig das Colon einbeziehen kann und seine klinische Erscheinungsform oftmals der C. ulcerosa ähnelt, verschmolzen diese beiden Entitäten unter dem Gesamtbegriff der chronisch

entzündlichen Darmerkrankung. Es ist dennoch von Bedeutung, zwischen diesen beiden chronischen, rezidivierenden Entzündungen des Gastrointestinaltraktes (GIT) zu unterscheiden, da es sich eindeutig um verschiedene pathophysiologische Entitäten handelt und sich Unterschiede im Krankheitsmanagement ergeben. Denkbar wäre jedoch auch, dass M. Crohn und C. ulcerosa lediglich verschiedene Aspekte ein und derselben Erkrankung darstellen. (Cho, 2008; Cho & Gregersen, 2011; Danese & Fiocchi, 2011; Kumar & Clark, 2005)

10-20% der Fälle einer Kolitis lassen keine Abgrenzung zu. 1978 stellte Price das Konzept der „Colitis indeterminata“ vor, um Fälle, bei denen Kolonresektionen aufgrund einer CED durchgeführt worden waren, ohne eine definitive Unterscheidung zwischen den beiden klassischen Varianten M. Crohn und C. ulcerosa treffen zu können, zu beschreiben. (Price, 1978) Später wurde der Begriff Colitis indeterminata für Biopsiematerial verwendet, bei dem diese Unterscheidung ebenfalls nicht möglich war. Andere Wissenschaftler plädieren allerdings dafür, in diesem Falle andere Bezeichnungen, wie beispielsweise „CED, nicht klassifiziert“, zu verwenden, um diese Diagnose limitiert für Kolektomie-Proben beizubehalten, da somit eine relativ gut definierte Patientengruppe gebildet wird, bei denen Folgen und Management der Erkrankung viel deutlicher werden. Bei einem Großteil dieser Fälle wurde ein Verlauf wie bei C. ulcerosa beobachtet. (Martland & Shepherd, 2007)

CED betreffen insbesondere junge Menschen und nehmen großen Einfluss auf die Lebensqualität durch signifikante gastrointestinale Symptome wie Durchfälle, Bauchschmerzen, Blutungen, Anämie und Gewichtsverlust. Andere, extraintestinale Manifestationen sind ebenfalls mit CED assoziiert, so zum Beispiel Arthritis, Spondylitis ankylosans, sklerosierende Cholangitis, Uveitis, Iritis, Pyoderma gangraenosum und Erythema nodosum. (Pithadia & Jain, 2011; Wei et al., 2011)

Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist komplex; genetische, Umwelt- und immunologische Faktoren tragen wahrscheinlich zu ihrer Ätiologie bei. (Pithadia & Jain, 2011; Wei et al., 2011)

1.1.1 Epidemiologie

CED treten generell weltweit, jedoch vermehrt in den westlichen Ländern der Erde auf, insbesondere in Nordamerika und Nordeuropa, allerdings steigen Inzidenz und Prävalenz inzwischen auch in Südeuropa, Asien und einem Großteil der Entwicklungsländer. (Loftus, 2004) Sowohl M. Crohn als auch C. ulcerosa sind in der weißen Bevölkerung stärker vertreten als in der nicht-weißen. M. Crohn tritt etwas häufiger bei Frauen als bei Männern auf, während Männer für C. ulcerosa anfälliger sind als Frauen. (Thukkani et al., 2011) Insgesamt leiden 1,4 Millionen Menschen in den Vereinigten Staaten und 2,2 Millionen Menschen in Europa unter einer CED. (Loftus, 2004)

1.1.2 Morbus Crohn

1.1.2.1 Pathologie

M. Crohn kann jeden Abschnitt des GIT betreffen, bevorzugt jedoch das terminale Ileum und das ascendierende Kolon. Die Erkrankung kann sich auf umschriebene Areale wie das terminale Ileum beschränken oder mehrere Regionen diskontinuierlich befallen, die durch gesunde Abschnitte der Darmschleimhaut voneinander getrennt sind. Dieser segmentale Befall wird als „skip lesions“ bezeichnet, makroskopisch imponiert ein pflastersteinartiges Relief. Der betroffene Darmabschnitt bei M. Crohn ist verdickt und verengt, es kann zudem zu transmuralen Ulzerationen kommen, die eine Fistelbildung zur Folge haben, welche die Darmwand perforieren und andere Organe beeinträchtigen können. (Cho, 2008; Cosnes et al., 2011; Nagalingam & Lynch, 2011) Hierbei kann es z.B. zu rektovaginalen, kolovesikalen und rektovesikalen Fisteln kommen. Auch zwischen Darm und Uterus können Fisteln entstehen, allerdings ist diese Form der Fistelbildung deutlich seltener. (Andreani et al., 2007; Holroyd et al., 2012; R. M. King et al., 1982) Mikroskopisch zeigt sich eine transmurale Entzündung, also alle Schichten der Darmwand betreffend. Es finden sich eine verdickte Submukosa, Fissuren, Ulzerationen, Fisteln, Strikturen sowie nicht-

verkäsende intestinale Granulome, welche allerdings in 30-40 % der Fälle fehlen können. (Abraham & Cho, 2009b; Chambers & Morson, 1979; Khor et al., 2011)

1.1.2.2 Symptomatik und Komplikationen

Das klinische Erscheinungsbild beim M. Crohn, welches aufgrund der unterschiedlichen Stadien und Manifestationsmöglichkeiten sehr variabel ist, hängt primär von der Lokalisation des Entzündungsprozesses, der Ausdehnung, der Aktivität und der Beziehung zu den Nachbarorganen ab. Aufgrund der häufigen Lokalisation im Bereich des terminalen Ileums präsentiert sich die Ileokolitis häufig mit chronisch wiederkehrenden Episoden von rechtsseitigem Unterbauschmerz und (meist unblutigen) Durchfällen. Der Schmerz besitzt in der Regel kolikartigen Charakter und bessert sich nach Defäkation. Weitere Symptome der Erkrankung sind leichtes Fieber, Müdigkeit und Gewichtsverlust als Folge der Diarrhoen, der Anorexie sowie der Angst vor Nahrungsaufnahme, aber auch Übelkeit und Erbrechen. Blutabgänge mit dem Stuhl lassen an einen gleichzeitigen Befall des Kolons oder Rektums denken und machen die Differenzierung zu C. ulcerosa schwierig. In 15% der Fälle können gastrointestinale Symptome völlig fehlen. (Fauci, 2008; Greten, 2005; Kumar & Clark, 2005) Bei klassischer Lokalisation imitiert die initiale Präsentation von M. Crohn oftmals eine akute Appendizitis im Sinne von akutem, rechtsseitigem Unterbauschmerz, Fieber, Leukozytose und einem tastbaren, sogenannten „Konglomerattumor“, der aus entzündeten Darmanteilen, anhaftendem und verhärtetem Mesenterium und vergrößerten abdominellen Lymphknoten besteht. Eine Ausdehnung des Konglomerats kann zu einer Obstruktion des rechten Ureters und einer Harnblasenentzündung führen, was sich wiederum in Dysurie und Fieber bemerkbar macht. Hohes Fieber spricht für eine intraabdominelle Abszessformation. (Fauci, 2008; Narin et al., 2009)

Im Verlaufe der Erkrankung kommt es initial aufgrund von Darmwandödemen und -spasmen zu intermittierenden Obstruktionen mit konsekutiven postprandialen Schmerzen. Später entwickeln sich auf dem Boden der persistierenden Entzündung

fibrostenotische Verengungen und Strikturen. Durchfälle werden seltener und durch chronische Verstopfung ersetzt. Eine akute Ileussympomatik kann ebenfalls auftreten und wird durch die Entzündung mit Schleimhautödem des betroffenen Darmabschnittes, Spasmen, aber auch durch Umschließung unverdauter Nahrungsreste oder Medikamente beschleunigt. Bei stark ausgeprägter Inflammation der ileozökalen Region kann es bei lokalisierter Ausdünnung der Darmwand zu Mikroperforationen und Fistelbildung (kutane, enteroenterische, enterovesikale, enterovaginale, perianale oder rektale Fisteln), siehe Abbildung 1, oder zu einer Abszesshöhle im Mesenterium kommen. (Fauci, 2008)

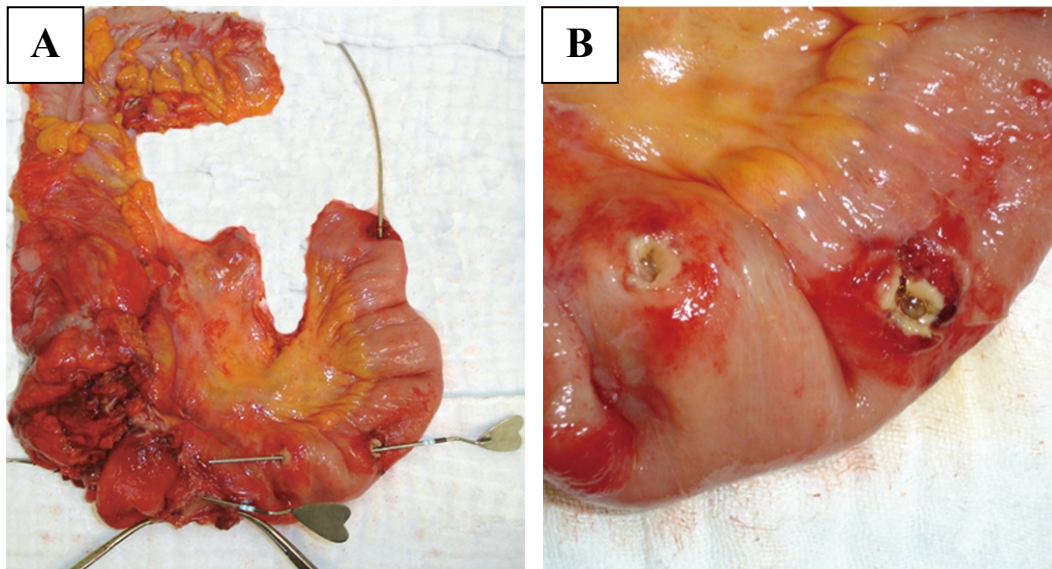


Abbildung 1: Makroskopische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Teke et al., 2008, p. 148)

Makroskopisches Erscheinungsbild eines resezierten Präparates, auf welchem eine M. Crohn-bedingte Ileitis mit multiplen, durch Instrumente sondierte Fisteln abgebildet ist (A), und ein ileales Segment mit zwei angrenzenden Öffnungen einer internen enterischen Fistel nach Adhäsilyse (B). (Teke et al., 2008)

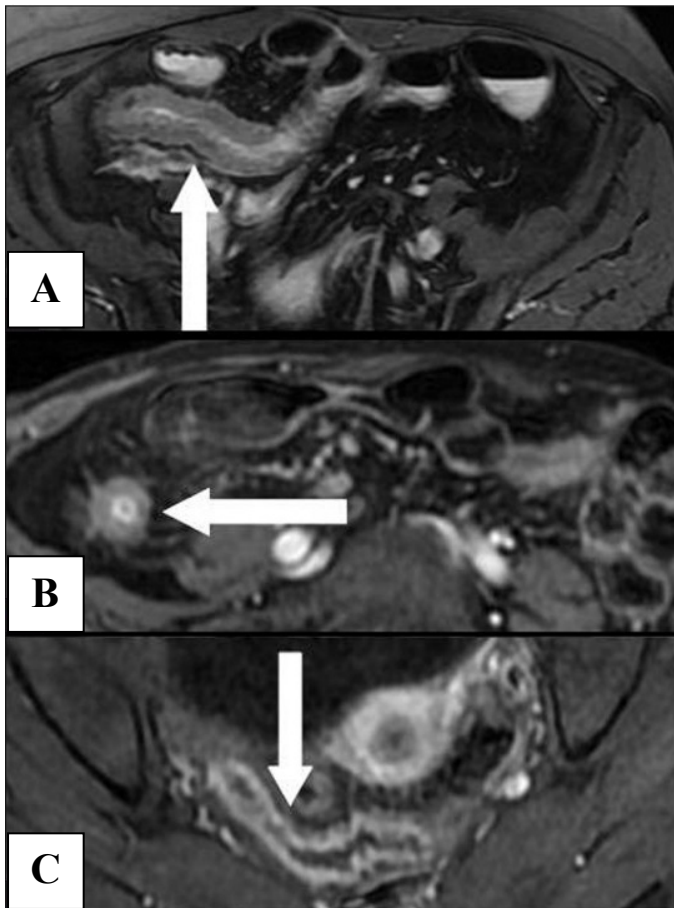


Abbildung 2: Radiologische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Fornasa et al., 2011, p. 5)

Drei unterschiedliche Patienten: (A) ein 25-jähriger Mann, (B) ein 34-jähriger Mann, (C) eine 45-jährige Frau mit einer aktiven inflammatorischen Stenose einer distalen Ileum-Schlinge (axiale Schichtführung).

Moderate Signalintensität in einer T2-gewichteten, FRFSE, fettunterdrückten Sequenz (Abk. FRFSE von engl. *fast relaxation fast spin echo sequence*) (Pfeil in A); Hohes „Enhancement“ in „Lava“-T1-gewichteten Sequenzen 60 Sekunden nach i.v.-Applikation eines paramagnetischen Kontrastmittels (Pfeile in B und in C). (Fornasa et al., 2011)

Abbildung 2 zeigt das radiologische Erscheinungsbild aktiver inflammatorischer Stenosen dreier unterschiedlicher Patienten.

Im Rahmen einer Jejunoileitis kann die Erkrankung auch in Malabsorption mit all ihren Folgen, wie beispielsweise Hypoalbuminämie, Hypokalzämie, Hypomagnesiämie, Hyperoxalurie mit Nephrolithiasis bei Patienten mit intaktem Kolon, sowie Steatorrhoe, resultieren. Dies geschieht aufgrund eines Verlustes der Kontaktfläche für Verdauung und Absorption. Bei Patienten mit Kolitis und

perianaler Erkrankung können u.a. rektale Blutungen, perianale Abszesse und Inkontinenz weitere Komplikation darstellen, ebenso wie das toxische Megakolon, welches zwar selten ist, aber durchaus bei ausgeprägter Entzündung und kurzzeitigem Verlauf auftreten kann. Ein gastroduodenaler Befall äußert sich häufig in epigastrischen Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen. (Abraham & Cho, 2009a; Fauci, 2008)

1.1.2.3 Diagnostik

Inspektorisch zeigen sich meist wenige Erkrankungszeichen in der körperlichen Untersuchung, außer ein reduzierter Allgemein- und Ernährungszustand. Manchmal zeigen sich orale Läsionen, wie z.B. eine aphthöse Stomatitis. (Benjamin et al., 2008; Lankarani et al., 2013) Es sollte außerdem auch immer nach den mit CED assoziierten extraintestinalen Manifestationen gesucht werden, siehe Abbildung 3. Extraintestinale Manifestationen können fast jedes Organsystem betreffen und kommen bei 25-40% aller CED-Patienten vor. Entzündungserscheinungen der Haut, Augen, Leber und Gelenke werden als primäre Manifestationen betrachtet; werden zusätzlich indirekte Folgen der Krankheitsaktivität in Betracht gezogen, so haben fast 100% der CED-Patienten eine Anomalie außerhalb des GIT. (Levine & Burakoff, 2011)

Das Abdomen kann sich bei der körperlichen Untersuchung distendiert darstellen; außerdem sind tastbare Resistenzen, eine Hepatomegalie oder Operationsnarben oftmals ein Hinweis auf einen M. Crohn. Druckschmerz, Loslass-Schmerz und Abwehrspannung sind ebenfalls mögliche klinische Zeichen. Aufgrund einer Obstruktion können die Darmgeräusche auskultatorisch alteriert erscheinen. Eine rektale Untersuchung sollte immer erfolgen, um anale Strikturen oder rektale Tumoren nicht zu übersehen. Ebenso kann oft die Untersuchung der perianalen Region Hinweise auf einen M. Crohn ergeben, wenn sich beispielsweise Marisken, Fissuren, Fisteln oder Abszesse darstellen. (Bernstein et al., 2010)

<p>Okulär</p> <ul style="list-style-type: none">• Uveitis• Episkleritis <p>Muskuloskelettal</p> <ul style="list-style-type: none">• Periphere Arthritis• Ankylosierende Spondylitis• Sakroiliitis <p>Hepatobiliär</p> <ul style="list-style-type: none">• Primär sklerosierende Cholangitis• Cholelithiasis• Autoimmun-Hepatitis• Akute Pankreatitis <p>Pulmonal</p> <ul style="list-style-type: none">• Chronische Bronchitis• Bronchiektasen• Granulomatöse Lungenerkrankungen• Diffuse oder fokale interstitielle Fibrose• Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie• Sulfasalazin-induzierte Pneumonitis• Methotrexat-induzierte Pneumonitis	<p>Dermatologisch</p> <ul style="list-style-type: none">• Pyoderma gangraenosum• Erythema nodosum <p>Hämatologisch</p> <ul style="list-style-type: none">• Anämie (Eisen-, Folsäure- oder Vitamin B12-Mangel)• Thrombozytose <p>Kardiovaskulär</p> <ul style="list-style-type: none">• Perikarditis (z.B. als Mesalazin-Nebenwirkung) <p>Renal</p> <ul style="list-style-type: none">• Nierensteine (Oxalat bei der Crohn-bedingten Ileitis) <p>Neurologisch</p> <ul style="list-style-type: none">• Periphere Neuropathie
---	---

Abbildung 3: Extraintestinale Manifestationen von M. Crohn. (Bhat & Dawson, 2007, p. 718)

Die Sonographie liefert Informationen bezüglich intestinaler und extraintestinaler Läsionen, darunter Darmwandverdickungen, Stenosen, prästenotische Darmwanddilataionen, Abszesse und Fisteln, siehe Abbildung 4. (Calabrese, 2011)

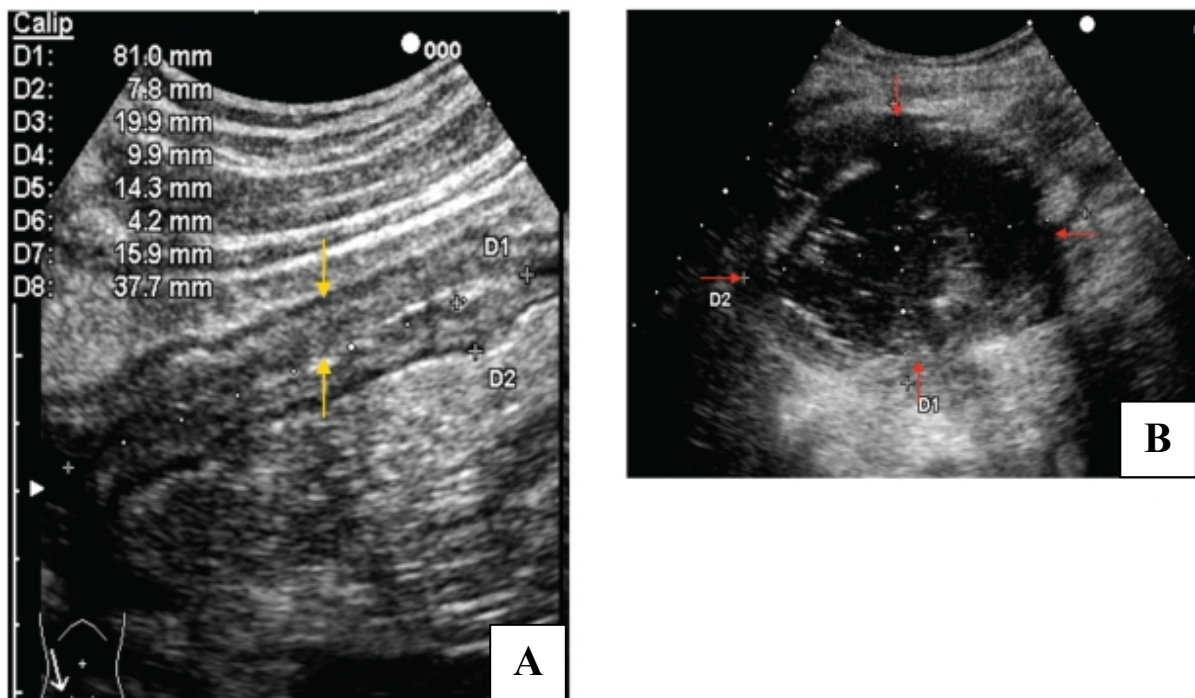


Abbildung 4: Sonographische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Calabrese, 2011, p. 108)

Die gelben Pfeile weisen auf eine Wandverdickung und Stenosierung des terminalen Ileums eines 30-jährigen M. Crohn-Patienten hin (A). Sonographie eines oberflächlichen Abszesses (rote Pfeile), welcher sich als runde, echoarme bis echofreie Läsion mit internen Echos und Wandunregelmäßigkeiten bei einer 16-jährigen M. Crohn-Patientin darstellt (B). (Calabrese, 2011)

Mittels Koloskopie besteht demgegenüber die Möglichkeit, die mukosale Oberfläche zu beurteilen und einen direkten Blick auf M. Crohn-assoziierte Läsionen im Kolon und terminalen Ileum zu erlangen, siehe Abbildung 5. Zu den endoskopischen M. Crohn-Merkmalen gehören eine rektale Aussparung, aphthöse Ulzerationen, entzündete Areale im Wechsel mit normaler Mukosa (sog. „skip lesions“), ein plastersteinartiges Relief, longitudinale, irreguläre Ulzera, Fisteln, Strikturen und kleinste hämorrhagische Läsionen. (Calabrese, 2011; Danese & Fiocchi, 2011)

Eine histologische Befundung von endoskopischen Mukosabiopsien gehört zudem als Untersuchungsmethode der 1. Wahl zur Diagnosefindung. Hierzu sind multiple Biopsieentnahmen aus dem terminalen Ileum und jedem Kolonsegment unter Einschluss des Rektums erforderlich. Auch bei unauffällig erscheinendem Rektum, z.B. bei alleinigem Dünndarmbefall, sollte dies im Rahmen der Sigmoidoskopie

durchgeführt werden, um mögliche unspezifische histologische Veränderungen in der Mukosa zu entdecken. Auch bei sehr ausgeprägtem M. Crohn kann das Rektum ausgespart bleiben und normal erscheinen, dennoch kann hier eine lückenhafte Beteiligung mit ödematöser, hämorrhagischer Mukosa bestehen. (Hoffmann et al., 2008)

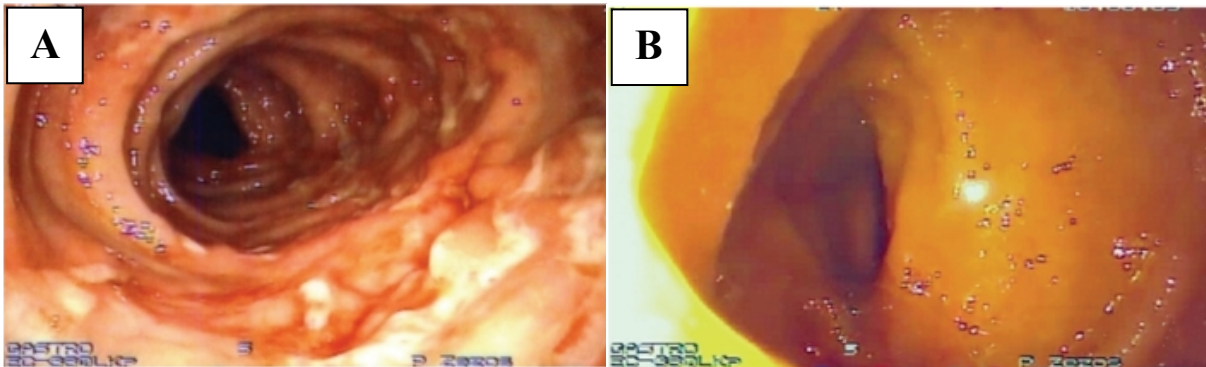


Abbildung 5: Endoskopische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Zezos et al., 2010, p. 2)

In der Koloskopie sichtbare aktive Kolitis mit longitudinalen Ulzerationen vom Colon sigmoideum bis durch das Zökum (A) und ein normales terminales Ileum (B). (Zezos et al., 2010)

Mittels Kapselendoskopie lässt sich die gesamte Dünndarmmukosa begutachten; Dünndarmläsionen werden somit besonders sensitiv erfasst. Wie Vergleichsstudien aufzeigen konnten, ist die Kapselendoskopie der konventionellen Dünndarmdiagnostik mittels Magnetresonanztomographie, dem CT-Enteroklysma, dem Barium-Doppelkontrast-Enteroklysma sowie der Koloskopie bzgl. der Mukosa-Beurteilung überlegen. (Albert et al., 2005; Eliakim et al., 2003; Gölder et al., 2006; Liangpunsakul et al., 2003; Triester et al., 2006; Voderholzer et al., 2005) Bereits bei dem Verdacht auf Fisteln oder Perforationen sollte grundsätzlich wasserlösliches Kontrastmittel verwendet werden. (Matsukawa et al., 2007)

Laboruntersuchungen können Hinweise zu Entzündung, Mangelernährung bzw. Malabsorption sowie zur Schwere der Erkrankung geben. Anämie und Thrombozytose stellen die häufigsten Veränderungen im Blutbild von M. Crohn-Patienten dar und gelten als Zeichen der chronischen Entzündung. Das Entzündungsausmaß lässt sich

mittels BSG, CRP und Leukozytose einstufen. Zeichen einer Mangelernährung bzw. Malabsorption sind Anämie, die bei M. Crohn-Patienten meist als mikrozytär und hypochrom im Rahmen einer Eisenmangelanämie in Erscheinung tritt, sowie erniedrigte Serumspiegel von Eisen, Ferritin, Calcium, Magnesium, Kalium, Zink, Vitamin A und D. Leberwerte können abnorm sein, bei schweren Verläufen zeigt sich zudem eine Hypoalbuminämie. Serologisch sind oft Anti-Saccharomyces cerevisiae-Antikörper (ASCA) positiv und perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (pANCA) negativ. (Fauci, 2008; Greten, 2005; Hoffmann et al., 2008; Kulnigg & Gasche, 2006; Kumar & Clark, 2005)

Mikrobiologische und virologische Tests auf darmpathogene Keime, darunter *E. coli*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* inklusive *Clostridium-difficile*-Toxin (insbesondere nach Antibiotika-Einnahme) sowie die Cytomegalievirus-(CMV)-Diagnostik (mit immunhistochemischer Aufarbeitung der Biopsie, Antigennachweis im Blut und PCR aus Blut oder Biopsie), die Röntgen-Abdomen-Übersichtsaufnahme (zum Ausschluss eines toxischen Megakolons und zur Darstellung von freier abdomineller Luft bei Perforation), die Computertomographie (CT) und die Kernspintomographie (bei Verdacht auf Fisteln oder Abszessbildung) ergänzen die Diagnostik. (Bernstein et al., 2010; Hoffmann et al., 2008)

1.1.2.4 Therapie und Prognose

Medikamentöse Ansätze haben zum Ziel, die Remission der Erkrankung zu induzieren und zu erhalten und sekundäre Effekte zu bessern. Bei Patienten mit mildem Krankheitsverlauf reicht oftmals die symptomatische Therapie aus. So sollte mit dem Rauchen aufgehört werden, da Tabakrauchen das Risiko eines endoskopischen und klinischen Rezidivs, eines stenosierenden oder penetrierenden Verlaufs, der Notwendigkeit von chirurgischen Eingriffen und immunsuppressiver Therapie sowie von Osteoporose erhöht. Durchfälle sollten zudem mit adäquaten Mitteln gestoppt (z.B. Loperamid oder Colestyramin bei Gallensäureverlustsyndrom) und eine Anämie je nach Mangelerscheinung therapiert werden. (Burger & Travis, 2011; Greten, 2005;

Hoffmann et al., 2008; Kumar & Clark, 2005; Nyhlin et al., 1994; Pithadia & Jain, 2011)

Kortikosteroide, insbesondere Prednisolon, sind wichtiger Bestandteil der CED-Therapie. Sie werden bei moderaten bis schweren Schüben eingesetzt, eignen sich jedoch aufgrund ihrer Nebenwirkungen und ihrer Unfähigkeit, eine Remission zu erhalten, nicht zur Langzeittherapie. In Abhängigkeit vom klinischen Ansprechen wird die Dosis über 2-4 Monate wöchentlich reduziert; eine raschere Dosisreduktion birgt die Gefahr eines Frührezidivs. (Burger & Travis, 2011; Hoffmann et al., 2008; Pithadia & Jain, 2011)

Ein zu selten eingesetztes Mittel stellt die spezifische enterale Ernährung dar, welche einen geringen Gehalt an Fett und Linolsäure haben sollte. Als alleiniges Nahrungsmittel für eine Dauer von 28 Tagen eingesetzt, wurden insbesondere bei pädiatrischen Patienten ähnliche Remissionsraten beobachtet, wie nach Steroidgabe. Zusätzliche Vorteile waren hierbei die Verbesserung des Ernährungszustands sowie die Vermeidung steroidinduzierter Nebenwirkungen. (Cameron et al., 2013; Greten, 2005; Kumar & Clark, 2005)

Aminosalizylate, deren aktiver Metabolit 5-Aminosalizylsäure ist (Abk. 5-ASA von engl. *5-aminosalicylic acid*), werden bei Patienten mit M. Crohn zur Remissionsinduktion eingesetzt, sind allerdings im Vergleich zur Placebothherapie nur geringfügig überlegen. (Burger & Travis, 2011; Fauci, 2008; Levesque & Kane, 2011; Pithadia & Jain, 2011)

Zur Remissionserhaltung werden Immunsuppressiva wie Azathioprin und dessen Metabolit 6-Mercaptopurin eingesetzt. Sie besitzen zudem eine Steroid-sparende Wirkung, allerdings kann es Wochen dauern, bis der effektive Wirkspiegel erreicht ist und somit die gewünschte antientzündliche Wirkung eintritt, was ihre Wirkung im akuten Schub stark limitiert und sie somit geeigneter für die Langzeittherapie macht. Rückfälle sind mit ca. 70% bei Therapieunterbrechung häufig, was somit eine solche

Dauertherapie mit Azathioprin und 6-Mercaptopurin notwendig macht. In diesem Fall sind regelmäßige Blutbildkontrollen aufgrund der Immun- und Knochenmarkssuppression erforderlich. Auch Mycophenolat-Mofetil, welches die Proliferation von T- und B-Lymphozyten supprimiert, wird z.T. als remissionserhaltende Therapie bei der C. ulcerosa eingesetzt. Bei Patienten, die auf Steroide und Immunsuppressiva nicht oder nicht ausreichend reagieren, ist es möglich, Methotrexat (bei M. Crohn) oder Cyclosporin A (bei C. ulcerosa) einzusetzen, welche allerdings lediglich Remission erzielen, aber (im Falle von Cyclosporin) nicht zur remissionserhaltenden Therapie eingesetzt werden. (Bouguen et al., 2013; Burger & Travis, 2011; Greten, 2005; Kumar & Clark, 2005; Laharie et al., 1; Pithadia & Jain, 2011; Stein et al., 2013)

Neue Therapieansätze stellen humanisierte monoklonale Antikörper dar, welche in der Lage sind, die betroffenen biochemischen Signalwege der Inflammation zu modifizieren, beispielsweise Infliximab, ein Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Antikörper. Weitere Anti-TNF-Antikörper sind Adalimumab, Golimumab und Certolizumab pegol. Diese Art der Therapie wird bei mittelschweren und schweren Formen einer CED durchgeführt, insbesondere auch bei steroidrefraktären und steroidabhängigen Krankheitsformen und bei Patienten, die nicht auf eine Azathioprin-Therapie ansprechen. (Burger & Travis, 2011; Pithadia & Jain, 2011)

Seit Juli 2014 ist in Deutschland mit Vedolizumab, einem sog. $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-Antagonisten, ein weiteres (darmselektives) Biologikum zur Therapie des M. Crohn und der C. ulcerosa zugelassen. (Wyant et al., 2015)

Eine mögliche Ergänzung zur medikamentösen Therapie der Komplikationen in der Akutphase (insbesondere beim M. Crohn) stellen Antibiotika wie Ciprofloxacin und Metronidazol dar, wobei diese aber keine Standardtherapie sind. Speziell Ciprofloxacin hat sich als unterstützende Therapie (z.B. in Kombination mit Anti-TNF-Antikörpern) beim inflammatorischen, perianal lokalisierten und Fistel-bildenden M. Crohn erwiesen. Vor diesem Hintergrund werden zur Zeit auch weitere Ansätze

geprüft, beispielsweise die Gabe probiotischer Bakterien, Thalidomid und Medikamente auf pflanzlicher Basis. (Fauci, 2008; Pineton de Chambrun et al., 2012; Pithadia & Jain, 2011; Vavricka & Rogler, 2010)

Trotz der großen medizinischen Fortschritte des letzten Jahrzehnts im Management des M. Crohn, insbesondere die Einführung neuer therapeutischer Wirkstoffe zur Prophylaxe und Behandlung von Komplikationen, bleibt eine Operation für viele M. Crohn-Patienten im Laufe ihres Lebens unumgänglich. Die häufigste Indikation, die eine chirurgische Behandlung des M. Crohn notwendig macht, stellt das medikamentöse Therapieversagen bzw. die Unverträglichkeit einer effektiven medikamentösen Therapie dar. Weitere Indikationen sind Obstruktion, Sepsis als Folge von Fisteln, Abszessen, entzündlicher Raumforderungen oder freier Perforation, Blutungen, Dysplasien/Krebs und Wachstumsretardierung. Elektiven chirurgischen Eingriffen sollte eine komplette Evaluierung des Gastrointestinaltraktes vorausgehen. (Fichera & Michelassi, 2007)

Das größte langfristige Gesundheitsrisiko von CED-Patienten stellt die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms dar. Obwohl kolorektale Karzinome im Rahmen von CED weniger als 0,5 % der gesamten in der Bevölkerung auftretenden kolorektalen Karzinome ausmachen, wird die Prävention dieser zum primären klinischen Ziel im Verlauf der langfristigen Betreuung von CED-Patienten, da besonders bei jungen Patienten und solchen mit langandauernder, ausgeprägter Erkrankung die relative Inzidenz hoch ist. (Harpaz et al., 2013)

1.1.3 Colitis ulcerosa

1.1.3.1 Pathologie

C. ulcerosa beschränkt sich meist auf das Rektum und das Kolon, und weist eine hauptsächlich im Rektum beginnende stets kontinuierliche Ausbreitung auf. Die Erkrankung kann nur das Rektum betreffen (Proktitis), sich weiter proximal bis zum Colon sigmoideum und Colon descendens (linksseitige Kolitis) ausbreiten, oder aber

das gesamte Kolon betreffen (Pankolitis). Bei einigen Patienten, die unter einer Pankolitis leiden, kommt es sogar zur Entzündung des distalen terminalen Ileums, was als „backwash ileitis“ bezeichnet wird. Diese bleibt jedoch oberflächlich und weist keine tiefen Ulzerationen, Strikturen oder Fisteln auf. (Cosnes et al., 2011; Danese & Fiocchi, 2011; Khor et al., 2011; Nagalingam & Lynch, 2011)

Makroskopisch imponiert die Darmschleimhaut gleichmäßig entzündet mit einem abrupten oder gleichmäßigen Übergang von betroffener zu normaler Mukosa. In milden Fällen erscheint die Schleimhaut brüchig, granulär und erythematös mit einem Verlust des Venenmusters, während sich in moderaten Fällen Erosionen und Mikroulzerationen zeigen. In schwerwiegenden Fällen kommt es zu extensiv ausgedehnten oberflächlichen Ulzerationen, die zu Spontanblutungen neigen. (Danese & Fiocchi, 2011) Mikroskopisch ist C. ulcerosa durch eine Entzündung charakterisiert, die sich auf die oberflächlichen mukosalen und submukosalen Schichten der Darmwand beschränkt. Hierbei zeigt sich eine Kryptitis mit Kryptenabszessen. (Cho, 2008; Khor et al., 2011)

1.1.3.2 Symptomatik und Komplikationen

Hauptsymptome der C. ulcerosa sind blutig-schleimige Durchfälle, Tenesmen und krampfartige Bauchschmerzen begleitet von unspezifischen Symptomen wie Unwohlsein, Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust, Fieber, Anorexie und Lethargie, wobei die Schwere der Symptomatik mit dem Ausmaß der Erkrankung korreliert. (Danese & Fiocchi, 2011; Fauci, 2008)

Die Ausprägung der Erkrankung kann sich zwischen mild, moderat und schwer bewegen. Der Beginn ist oft schleichend, kann aber auch subakut oder akut verlaufen. 10% der Patienten leiden unter persistierenden chronischen Symptomen, andere haben nur einen einzigen Schub. C. ulcerosa ist wie der M. Crohn von Remissionen und Exazerbationen gekennzeichnet. (Danese & Fiocchi, 2011; Greten, 2005; Kumar & Clark, 2005)

Bei alleinigem Befall des Rektums kommt es vermehrt zu Abgängen von frischem Blut oder blutig tingiertem Schleim, entweder vermischt mit Stuhl oder als Auflage eines normalen oder harten Stuhls. Hierbei kommt es zwar häufig zu Tenesmen oder einem Drang mit dem Gefühl der unvollständigen Entleerung, seltener allerdings zu abdominellen Schmerzen. Eine Proktitis oder Proktosigmoiditis führt zu einer verlangsamten proximalen Darmassage, was vermutlich die häufig beobachtete paradoxe Konstipation bei Patienten mit distalem Befall erklärt. Bei Ausdehnung der Erkrankung jenseits des Rektums zeigen sich eine Vermischung von Blut mit Stuhl bzw. ausgeprägt blutige Durchfälle. Die durch die Inflammation veränderte Kolonmotilität und die somit beschleunigte Darmassage führen bei ausgedehntem Kolonbefall und im akuten Schub zu flüssigen Stühlen, z.T. vermischt mit Pus und Blut. Es kommt häufig zu vermehrten, vorherrschend nachts und postprandial auftretenden und mit Inkontinenz einhergehenden Durchfällen, die den Patienten extrem einschränken. (Danese & Fiocchi, 2011; Fauci, 2008)

Zu den Komplikationen einer schweren *C. ulcerosa* zählen Perforation, Blutung und das toxische Megakolon. Diese Dilatation des Kolons ist mit einer hohen Perforationsgefahr mit konsekutivem septischen Schock verbunden und kann bis hin zum Multiorganversagen führen. Die fulminant-toxische Verlaufsform ist durch eine extrem hohe Zahl an blutig-schleimigen Durchfällen, einem septischen Krankheitsbild mit hohem Fieber, Dehydratation, Distension und Druckschmerzhaftigkeit des Abdomens gekennzeichnet. In diesen Phasen eines schweren Schubes ist der Patient schwerst krank, und eine dringende Krankenhausbehandlung ist unumgänglich. (Caprilli et al., 2000; Greten, 2005; Kumar & Clark, 2005)

1.1.3.3 Diagnostik

Zeichen einer Proktitis sind ein empfindlicher Analkanal und Blut in der rektalen Untersuchung. Bei ausgeprägterer Erkrankung kann das Abdomen gebläht erscheinen und die Palpation druckschmerzhaft sein. Patienten mit toxischer Kolitis leiden unter

extremen Schmerzen und können stark bluten, im Rahmen eines toxischen Megakolons findet sich ein tympanitischer Klopfeschall über der Leber. (Fauci, 2008)

In der Koloskopie findet sich in leichten Fällen eine von samtartigem Aussehen gekennzeichnete, geschwollene, hyperämische und bei Berührung leicht blutende Schleimhaut, während diese bei schwerem Verlauf hämorrhagisch infiltriert mit unregelmäßig konfluierenden Ulzerationen imponiert (Abbildung 6). Bei chronischem Verlauf zeigt sich ein starres, röhrenförmiges Kolon mit Stenosen, Verkürzungen und Pseudopolypen. Schwere Krankheitsschübe oder ein toxisches Megakolon sind aufgrund der Perforationsgefahr eine Kontraindikation für eine Koloskopie. (Greten, 2005; Kumar & Clark, 2005)

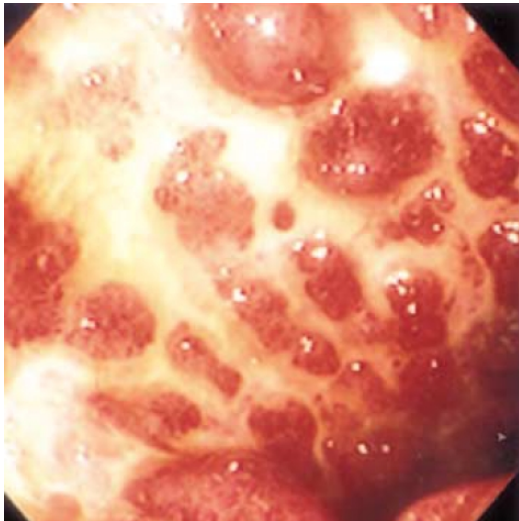


Abbildung 6: Endoskopisches Erscheinungsbild der Colitis ulcerosa. (Ji et al., 2007, p. 751)

In der Koloskopie sichtbare hyperämie Mukosa, multiple, diffuse Ulzerationen und mukosale Nodularität. (Ji et al., 2007)

Im Kolonkontrasteinlauf, welcher ebenfalls in kritischen Stadien nicht durchgeführt werden sollte, stellt sich das Kolon typischerweise aufgrund der aufgehobenen Haustrierung als langes, glattes Rohr dar und ähnelt einem „Fahrradschlauch“ (siehe Abbildung 7), durch Kontrastmittelaussparungen werden zudem die Pseudopolypen sichtbar. Frühestes radiologisches Zeichen der C. ulcerosa ist eine im Einlauf sichtbare körnige Beschaffenheit der Mukosa. (Danese & Fiocchi, 2011; Fauci, 2008)



Abbildung 7: Kolonkontrasteinlauf bei Colitis ulcerosa. (Ji et al., 2007, p. 751)

Es zeigt sich ein insgesamt verkürztes und verengtes Kolon mit aufgehobener Haustrierung. (Ji et al., 2007)

Die Magnetresonanztomographie sollte primär zur Bildgebung bei CED-Patienten herangezogen werden, wobei die Wahl des diagnostischen Verfahrens abhängig von der lokalen Verfügbarkeit, der Expertise sowie der Kosten ist. Ungeachtet der Strahlenbelastung ist die CT-Untersuchung gleichermaßen effizient und Mittel der Wahl bei klinischen Notfällen. Hinsichtlich der Beurteilung beteiligter anatomischer Strukturen, Vorhandensein und Ausprägung von Darmwandverdickungen und Komplikationsarten dient ebenfalls die CT-Untersuchung, insbesondere zur differentialdiagnostischen Unterscheidung zu M. Crohn. Ergänzend kann die Sonographie zur Bildgebung herangezogen werden, jedoch sollte dies in erfahrenen Zentren durchgeführt werden. (Herfarth, 2013; Thoeni & Cello, 2006)

Die minimale Labordiagnostik bei Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa sollte ein Blutbild, inflammatorische Marker (z.B. CRP), Parameter des Eisenhaushalts, Nierenretentionsparameter, Transaminasen und Cholestaseparameter enthalten. (Dignass et al., 2011) Im akuten Schub zeigt sich oftmals eine Eisenmangelanämie. Leukozyten und Thrombozyten sind erhöht, ebenso BSG und CRP, insbesondere im Rahmen der toxischen Verlaufsform. Die Leberwerte können abnorm sein; bei schweren Verläufen zeigt sich eine Hypoalbuminämie, häufig sind auch

Hypoproteinämie und Hypokaliämie. Anders als beim M. Crohn werden bei der C. ulcerosa oftmals erhöhte pANCA-Spiegel gemessen. Die Schwere der Entzündung kann zudem mittels Spiegelbestimmung von fäkalem Calprotectin oder Laktoferrin eingestuft werden. Um eine infektiöse Genese der Durchfälle auszuschließen, sollten hier Stuhlkulturen auf *Clostridium difficile*-Toxin, *Campylobacter*-Spezies und *Escherichia coli* O157:H7 die Diagnostik ebenfalls komplettieren. Außerdem sollte auch hier eine CMV-Kolitis durch PCR (aus dem Stuhl und Darmbiopsien) ausgeschlossen werden. (Danese & Fiocchi, 2011; Dignass et al., 2011; Fauci, 2008; Hoffmann et al., 2008)

1.1.3.4 Therapie und Prognose

Hinsichtlich Ernährungsempfehlungen gibt es aus interventionellen Studien relativ wenig Evidenz. Trotzdem sollte die Nahrungsaufnahme nicht unangebracht eingeschränkt werden. Es gibt keine Evidenz für eine therapeutische Wirkung durch enterale Ernährung bei aktiver C. ulcerosa. Einer totalen intravenösen Ernährung konnte ebenfalls kein therapeutischer Effekt, insbesondere kein Einfluss hinsichtlich Operationsraten und nur ein kleiner Vorteil aufgrund der Umgehung der Darmpassage nachgesagt werden. Auch bei chronisch aktiver Erkrankung ist eine intravenöse Ernährung nicht von Vorteil. Bei unterernährten Patienten jedoch ist eine Nahrungsergänzung durchaus angebracht, da eine optimale Versorgung mit Nährstoffen die Darmmotilität, die intestinale Permeabilität, sowie den Ernährungszustand verbessert und die Entzündungsreaktion reduziert. Die allgemeine Schlussfolgerung ist jedoch, dass die Ernährung bei der Entstehung der C. ulcerosa kaum eine Rolle spielt. Dennoch gibt es Hinweise, dass das Risiko für C. ulcerosa bzw. das Rezidivrisiko bei C. ulcerosa-Patienten unter denjenigen erhöht ist, die einen hohen Anteil an rotem Fleisch und Margarine in ihrem Ernährungsplan haben. Für die Empfehlung, Milchprodukte strikt zu vermeiden, gibt es nicht ausreichend Evidenz. (Richman & Rhodes, 2013; Triantafillidis & Papalois, 2014)

Üblicherweise erhalten C. ulcerosa-Patienten ein Aminosalizylat, dessen aktiver Metabolit 5-Aminosalizylsäure (5-ASA) ist. Es hat sich eine gute Effektivität in der Remissionsinduktion bei mild bis moderat aktiver Erkrankung, sowie in der Remissionserhaltung bei allen Aktivitätsformen, gezeigt. Um eine frühzeitige Absorption zu verhindern und somit eine Wirkung im Kolon zu erreichen, ist es notwendig, entweder eine Prodrug (Balsalazid, Olsalazin oder Sulfasalazin) oder ein Medikament mit magensaftresistentem, pH-abhängigem Überzug (z.B. Asacol®, Salofalk®) bzw. ein Medikament mit langsamem Freisetzungsmechanismus (z.B. Pentasa®) zu verabreichen. Trotz dieser Maßnahmen sollten zusätzlich Einläufe oder Suppositorien verwendet werden, um die mukosale Konzentration von 5-ASA bei Patienten mit distaler C. ulcerosa zu erhöhen. (Burger & Travis, 2011)

Akute Exazerbationen mit signifikanter Inflammation werden zusätzlich mit Glukokortikoiden behandelt. Für mildere Verläufe, bei denen lediglich das Rektum betroffen ist, ist die topische Gabe dieser Medikamente, im Sinne von Suppositorien, Schäumen oder Klysmen, oftmals ausreichend. Bei häufigen Rückfällen trotz dieser Medikamentenkombination können auch Purinmetabolite, also Azathioprin oder Mercaptopurin, sowie monoklonale anti-TNF-Antikörper (Infliximab, Adalimumab oder Golimumab) gegeben werden. (Ben-Horin et al., 2014; Greten, 2005; Park & Jeen, 2015; Pithadia & Jain, 2011)

Für die Gabe probiotischer Bakterien in der Erhaltungstherapie der C. ulcerosa konnte ein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden, während dies für M. Crohn nicht zutrifft. (Kruis, 2013; Lee et al., 2013)

Chirurgisch ist C. ulcerosa durch die Proktokolektomie heilbar. Diese ist dann indiziert, wenn es trotz konsequenter medikamentöser Therapie zu schweren rezidivierenden Schüben kommt, und erfolgt in der Regel elektiv und kontinenzershaltend mittels ileoanalem Pouch. Die Letalität dieses Eingriffs beträgt ca. 3%, und ein Drittel der operierten Patienten leiden im Verlauf unter einer sogenannten „Pouchitis“, einer Inflammation der Pouch-Mukosa mit klinischen Symptomen wie

Durchfällen, Blutungen, Fieber und mitunter einer Exazerbation extraintestinaler Manifestationen. (Greten, 2005; Kumar & Clark, 2005; Pithadia & Jain, 2011) Prognostisch ist eine lang andauernde und ausgeprägte C. ulcerosa mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Karzinome verbunden (7-14% nach 25 Jahren, bis zu 30% nach 35 Jahren; siehe Abbildung 8). (Bernstein et al., 2001; Pellisé, 2013) Ein erhöhtes Risiko ist zudem mit der zeitgleichen Diagnose einer primär sklerosierenden Cholangitis, einer positiven Familienanamnese für kolorektale Karzinome und dem Vorhandensein von Pseudopolyphen assoziiert. Empfehlungen besagen, dass alle Patienten mit Colitis ulcerosa nach 8 bis 10 Jahren Erkrankungsdauer jährlich oder halbjährlich eine Vorsorge-Koloskopie mit multiplen Biopsien in regelmäßigen Abständen bei Pankolitis und nach spätestens 15 Jahren Erkrankungsdauer bei Linksseitenkolitis durchführen lassen sollten. Bei Nachweis höhergradiger Dysplasien oder multifokaler niedriggradiger Dysplasien in flacher Mukosa sollte eine Kolektomie erfolgen, wenn der pathologische Befund von einem Pathologen bestätigt wurde, der auf dem Gebiet der Dysplasien bei CED erfahren ist. (Farraye, Odze, Eaden, & Itzkowitz, 2010; Farraye, Odze, Eaden, Itzkowitz, et al., 2010; Kornbluth & Sachar, 1997; Pellisé, 2013; Winawer et al., 2003)

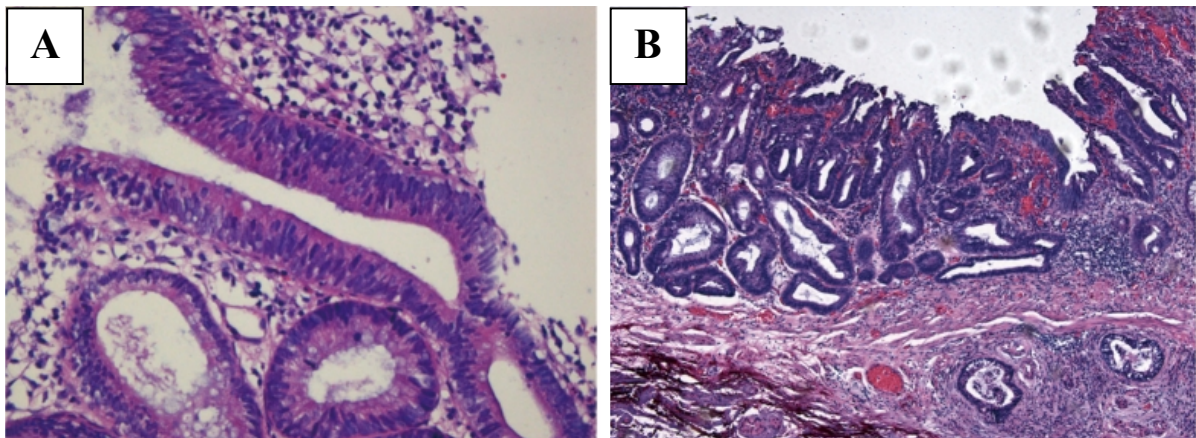


Abbildung 8: Histopathologische Erscheinungsbilder bei Colitis ulcerosa. (Neumann et al., 2011, p. 3188)

Histopathologisches Bild einer Dysplasie-assoziierten Läsion oder eines Tumors mit „low-grade“ intraepithelialer Neoplasie bei einem Patienten mit ruhender C. ulcerosa (A). Die Abbildung B illustriert ein Colitis-assoziiertes Karzinom mit submukosaler Invasion. (Neumann et al., 2011)

Colitis ulcerosa-Patienten haben insgesamt eine normale Lebenserwartung. Mortalität war signifikant mit zunehmendem Alter und der Anwesenheit von Komorbiditäten verbunden; krankheitsspezifische Faktoren wie Schwere und Ausmaß der Erkrankung sowie erstmaliges Auftreten zeigten eine Assoziation zu Notfall-Kolektomien, aber nicht zu Mortalität. (Falvey et al., 2010; Winther et al., 2003)

1.1.4 Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die primäre, unmittelbare Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bislang, trotz enormer Fortschritte hinsichtlich des Verständnisses bezüglich Umweltrisikofaktoren und der dem inflammatorischen Prozess zugrundeliegenden immunologischen und genetischen Faktoren, nicht vollständig geklärt. (Korzenik, 2005)

Generell werden Umwelt-, genetische, mikrobielle und immunologische Faktoren als zur Krankheit führende Komponenten diskutiert (siehe Abbildung 9). Nicht eine dieser Komponenten alleine, sondern vielmehr die Interaktion zwischen ihnen führt zu einem chronisch-inflammatorischen Prozess, welcher dem Darm Schaden zufügt und klinische Symptome triggert. Aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung der Einzelkomponenten in jedem Individuum kommt es zu der Vielfalt der klinischen Manifestationen und des Therapieansprechens, was eine individualisierte Herangehensweise mit unterschiedlichem Einsatz von Medikamenten für jeden einzelnen Krankheitsfall erforderlich macht. (Fiocchi, 2009; Schirbel & Fiocchi, 2010)

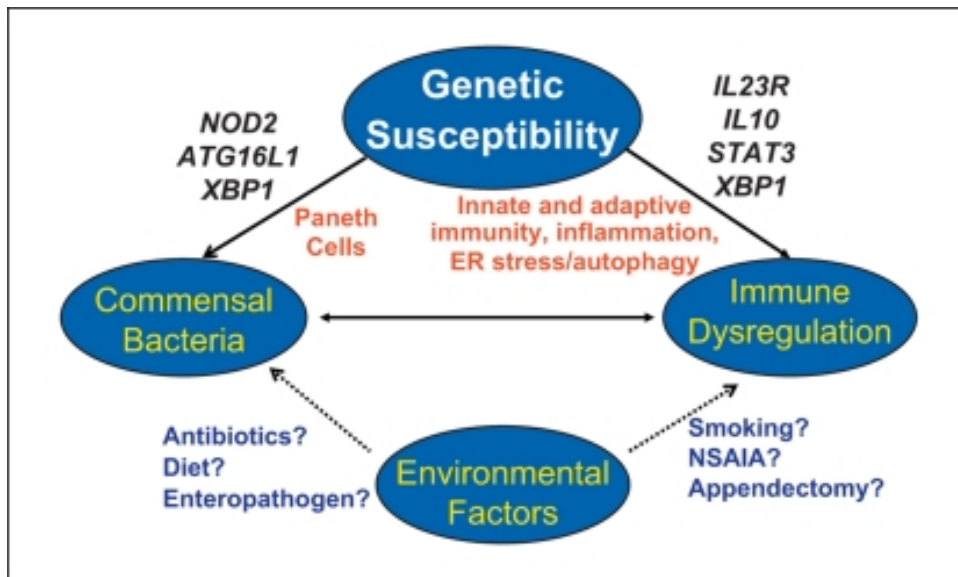


Abbildung 9: Zwei-Faktoren-Modell für die Pathogenese von CED. (Kaser et al., 2010, p. 397)

Eine „Zwei-Faktoren“-Hypothese für die Pathogenese von CED. Umwelt- und genetische Faktoren sind Risikofaktoren für CED, da sie die Zusammensetzung und Funktion der intestinalen Mikrobiota sowie die Immunantwort des Wirtsorganismus auf mikrobielle Faktoren determinieren. (Abk. NSAIA von engl. *nonsteroidal anti-inflammatory agents*) (Kaser et al., 2010)

1.1.4.1 Umweltfaktoren

Die weltweit kontinuierlich wachsende Inzidenz und Prävalenz von CED, insbesondere in den westlichen Ländern, sowie ihr Aufkommen in den Entwicklungsländern, lässt keine Zweifel daran, dass Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen. Es kann allerdings nicht davon ausgegangen werden, dass diese allein für die eigentliche Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Umweltfaktoren, welche laut epidemiologischer Studien von Populationen mit Migrationshintergrund ähnlich wie genetische Faktoren bereits in frühen Lebensstadien das Entstehungsrisiko für CED determinieren, veranlassen vielmehr das Immunsystem, proinflammatorisch zu reagieren bzw. beeinflussen indirekt diejenigen Gene, welche normalerweise für die Homöostase des Immun- und Verdauungssystems sorgen. (Cosnes et al., 2011; Fiocchi, 2009)

Zu diesen Umweltfaktoren im Sinne von Risikofaktoren gehören unter anderen Rauchen, die Appendektomie, Bewegungsmangel, Übergewicht, bestimmte

Ernährungsweisen, orale Kontrazeptiva, Drogen, Infektionen und Impfungen, geographische und soziale Gegebenheiten, Stress, sowie Mikroorganismen innerhalb und außerhalb des Darms. (Cosnes, 2010; Fiocchi, 2009; Schirbel & Fiocchi, 2010)

Rauchen nimmt einen besonderen Stellenwert ein, da Nikotinkarenz im Falle des M. Crohn einen positiven, allerdings im Falle der C. ulcerosa einen negativen Effekt bzgl. Entstehungsrisiko, Verlauf und Therapieerfolg nach sich zieht. Allerdings sollten diese Effekte im Falle der C. ulcerosa der schädlichen Wirkungen des Rauchens hinsichtlich des respiratorischen und kardiovaskulären Systems gegenübergestellt werden; trotz des positiven Effektes auf diese Erkrankung sollte somit jedem Patienten abgeraten werden, zu rauchen. (Cosnes, 2010; Schirbel & Fiocchi, 2010)

Auch die Appendektomie zeigt eine signifikante negative Assoziation zu C. ulcerosa, da die Entfernung eines entzündeten Blinddarms in frühen Lebensjahren mit einer verringerten Inzidenz für C. ulcerosa assoziiert ist. Interessanterweise ist das Gegenteil für M. Crohn der Fall. (Danese & Fiocchi, 2011; López-Serrano et al., 2010)

Im Jahre 1989 wurde zudem erstmalig die sogenannte Hygiene-Hypothese durch Strachan beschrieben. (Strachan, 1989) Diese entstand aufgrund der weltweit kontinuierlich steigenden Inzidenz der CED, insbesondere in den Teilen der Erde, wo sich mit der Zeit deutlich gebesserte Hygienebedingungen fanden, beispielsweise optimierte Sanitärbedingungen, verringertes Aufkommen von infektiösen und parasitären Erkrankungen, Impfungen, sicherere Nahrungsmittel und Trinkwasserbestände. Außerdem wurde hier die Aneignung von Ernährungs- und anderen Gewohnheiten westlicher Gesellschaften, in denen CED gehäuft auftreten, beobachtet. Die Hygiene-Hypothese besagt, dass eine gesteigerte Exposition gegenüber häufiger Infektionserreger in der Kindheit die Entwicklung des Immunsystems positiv beeinflusst und somit als Schutz vor diesen Krankheiten später im Leben dient. (López-Serrano et al., 2010; Schirbel & Fiocchi, 2010) Vor Kurzem konnte dies tierexperimentell bestätigt werden. (Olszak et al., 2012) Dies würde CED zu einer Erkrankung des modernen Lebens machen, ähnlich wie andere chronische,

immunvermittelte Krankheiten allergischer oder entzündlicher Art, so z.B. Asthma, Psoriasis, Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis. (Schirbel & Fiocchi, 2010)

1.1.4.2 Genetische Faktoren

Die Rolle von Genen bei der Krankheitsentstehung konnte durch epidemiologische Studien belegt werden, welche das gehäufte Auftreten der Erkrankung bei eineiigen Zwillingen (36%ige Übereinstimmung bei M. Crohn, 16%ige Übereinstimmung bei C. ulcerosa) im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen (4%ige Übereinstimmung bei sowohl M. Crohn als auch C. ulcerosa) demonstrierten. (Johan Van Limbergen et al., 2007) Das erhöhte Risiko eines Verwandten ersten Grades, eine CED zu entwickeln, wenn bei dem Probanden M. Crohn vorliegt (relatives Risiko 5-35; C. ulcerosa 10-15), sowie die hohe Rate an CED in der Familienanamnese (bis zu 30%, insbesondere bei M. Crohn) liefern weitere epidemiologische Evidenz für einen genetischen Beitrag zur „Suszeptibilität“ für M. Crohn. (Johan Van Limbergen et al., 2009) Der Beweis hierzu gelang im Jahre 2001, als das erste Suszeptibilitäts-gen für M. Crohn, *NOD2* (von engl. *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) / *CARD15* (Abk. CARD von engl. *caspase recruitment domain*), auf Chromosom 16 entdeckt wurde, nachdem 1996 diese Region bereits erstmalig durch Jean-Pierre Hugot, einem französischen pädiatrischen Gastroenterologen, identifiziert worden war. (Hugot et al., 1996; Rogler, 2011; Johan Van Limbergen et al., 2007)

Der Wildtyp dieses Gens hat die Funktion eines Rezeptors, der bakterielles Muramyldipeptid erkennt und NF- κ B aktiviert. In mutierten Varianten von *NOD2*, welche mit einer M. Crohn-Suszeptibilität assoziiert wurden, geschah dies nicht. (Rogler, 2011; Zanello et al., 2013)

Da *NOD2* in weniger als 40% der M. Crohn-Fälle eine Rolle spielt, begann die Suche nach weiteren möglichen Suszeptibilitäts-genen mittels sogenannter genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) durch nationale und internationale Forscherzusammenschlüsse, welche sich gewaltiger kombinierter Datenbanken bedienen, die tausende gut phänotypisierte M. Crohn- und C. ulcerosa-Patienten

umfassen. Diese GWAS konnten außerordentliche Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Kohorten herausarbeiten und somit die Anzahl an gesicherten genetischen Assoziationen bei CED deutlich erhöhen. Kürzlich durchgeführte GWAS haben wertvolle Einblicke in die genetische Architektur von CED gewährt, indem mehr als 163 CED-Suszeptibilitätsgenvarianten identifiziert wurden, darunter die signifikantesten Ergebnisse für M. Crohn in den Genregionen von *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*. (Anderson et al., 2011; Barrett et al., 2008; Duerr et al., 2006; Franke et al., 2010; Hampe et al., 2007; Jostins et al., 2012)

Zu den 110 identifizierten, M. Crohn und *C. ulcerosa* gemeinsamen Loci, darunter *IL23R*, *JAK2*, *STAT3*, *BSN-MST1*, *CCNY-CREM*, *KIF21B*, *NKX2-3*, *IL12B*, *ORMDL3*, *ICOSLG*, *LOC441108*, *CCR6*, *TNFSF15*, 5p13, 6p21, 7p12 und 21q21, zählt auch *IRGM*, das den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt. (Jostins et al., 2012; Umeno et al., 2011)

Genetische Analysen konnten der Autophagie eine unerwartet wichtige Rolle im Rahmen der angeborenen Immunität und CED (insbesondere bei M. Crohn) zuschreiben, wobei eine Verwicklung zweier an der Pathogenese von CED beteiligten Genen, *IRGM* und dem zuvor genannten *ATG16L1*, aufgezeigt werden konnte. Grundsätzlich ist Autophagie an der intrazellulären Homöostase beteiligt, indem sie am Abbau und an der Wiederverwertung zytosolischer Inhalte und Organellen beteiligt ist. Autophagie ist aber auch wichtige Voraussetzung für den Widerstand gegen Infektion sowie für die Entfernung intrazellulärer Mikroben. *ATG16L1*, das „*autophagy-related 16-like 1 gene*“, welches ein Protein des Autophagosomen-Signalwegs kodiert, bei dem es um die Prozessierung intrazellulärer Bakterien geht, ist essentiell für alle Formen der Autophagie. (Khor et al., 2011)

Bei einem Polymorphismus dieses Gens (*ATG16L1* p.Thr300Ala) konnte gezeigt werden, dass diese Variante mit einer beeinträchtigten und inadäquaten Immunantwort auf Darmbakterien assoziiert ist und Träger dieser Mutation ein erhöhtes Risiko für M. Crohn haben. Die angeborenen Immunzellen wiesen hier eine verminderte Fähigkeit

auf, Autophagie zu induzieren, nachdem sie spezifischen mikrobiellen Strukturen, z.B. Peptidoglykanen, einem Bestandteil der Bakterienzellwand, ausgesetzt waren. Diese Pathogenitäts-assoziierten Oberflächen werden spezifisch mittels des intrazellulären Oberflächen-Erkennungsrezeptors (Abk. PRR von engl. *pattern recognition receptor*) NOD2 erkannt. NOD2 initiiert Autophagie, indem es ATG16L1 an die Oberfläche der Zellmembran – genau an den Ort, an dem das bakterielle Eindringen stattfindet – rekrutiert. (Khor et al., 2011; Lees et al., 2011; Plantinga et al., 2011)

Für viele genetische Varianten sind ausgeprägte Assoziationen mit CED in der westlichen Welt beschrieben, so z.B. bei Kaukasiern und Juden, darunter die bereits beschriebene *NOD2*- oder andere mit Autophagie assoziierte Genvarianten. Diese Assoziationen existieren allerdings im asiatischen Raum, z.B. bei der chinesischen oder japanischen Bevölkerung, nicht. Tatsächlich bestehen derartige Unterschiede zwischen den westlichen und asiatischen genetischen Grundlagen, dass bisher lediglich ein gemeinsames Suszeptibilitätsgen, nämlich *TNFSF15*, beschrieben wurde, welches in unterschiedlichen Völkern und Ethnien gleichermaßen mit CED assoziiert ist. (Schirbel & Fiocchi, 2010)

NOD2 und *ATG16L1* sind Beispiele für die Interaktion der intestinalen Mikrobiota sowie pathogener Keime mit Zellen der Mukosa, und weisen somit eine Verschmelzung des „genetischen Ansatzes“ und des „Umweltfaktoren-Ansatzes“ hinsichtlich Ätiologie und Pathogenese der CED auf. Neben vielen anderen betreffen einige der pathophysiologisch relevantesten bisher beschriebenen Assoziationen für *M. Crohn* und *C. ulcerosa* das angeborene Immunsystem, Autophagie, Apoptose, aber auch Th1- und Th17-Antworten, T-Zell-Aktivierung und Immunsuppression, ohne jedoch für alle Subpopulationen dieser Erde gleichermaßen relevant zu sein. (Fiocchi, 2009; Rogler, 2011; Schirbel & Fiocchi, 2010)

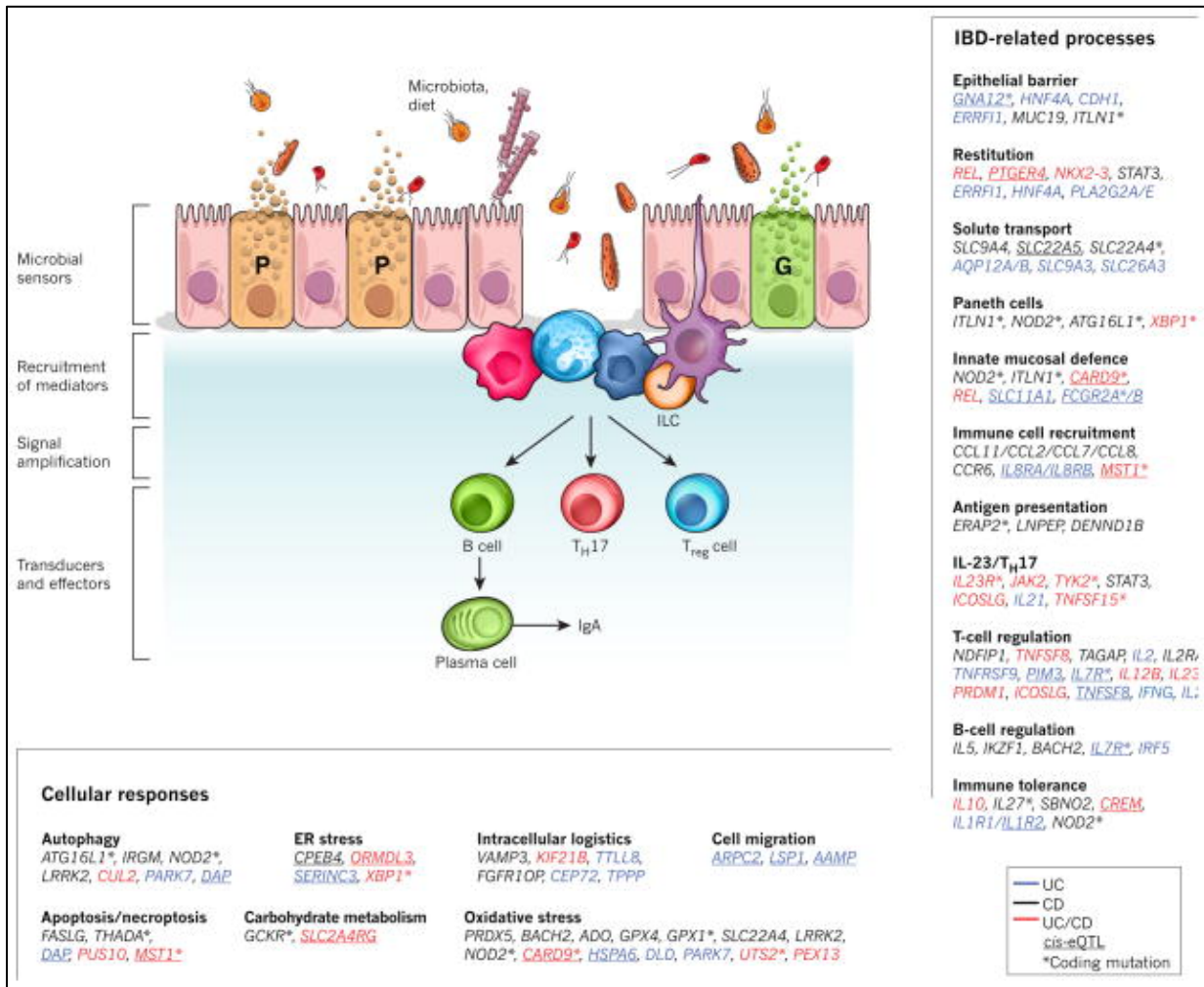


Abbildung 10: Modell für die Pathogenese von CED basierend auf GWAS. (Khor et al., 2011, p. 309)

Gene, die in einem Kopplungsungleichgewicht zu CED-assoziierten Einzelnukleotidpolymorphismen standen ($r^2 > 0.8$), wurden manuell ausgewählt und entsprechend ihrer Funktion(en) im Zusammenhang mit der intestinalen Homöostase und dem Immunsystem klassifiziert. Die Schriftfarbe gibt an, ob die Gene mit Risiko-Loci, die mit M. Crohn (schwarz), C. ulcerosa (blau) oder mit beiden (rot) assoziiert sind, verbunden sind. Sternchen kennzeichnen entsprechende Kodierungsmutationen; cis-eQTL-Effekte sind unterstrichen (Abk. eQTL von engl. *expression quantitative trait loci*). Abk. G von engl. *goblet cell*: Becherzelle; Abk. P von engl. *Paneth cell*: Panethsche Körnerzelle. (Khor et al., 2011)

Der Erhalt der intestinalen Homöostase setzt ein intaktes Zusammenspiel von Epithelzellen mit Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems voraus, siehe Abbildung 10. Eine Durchlässigkeit der Schutzbarriere macht das Eindringen von Mikroorganismen möglich, was wiederum durch das angeborene Immunsystem erkannt wird. Dieses initiiert sodann geeignete sowohl tolerierende, inflammatorische als auch restitutive Immunantworten, zum Teil indem es extrazelluläre Mediatoren

freisetzt, welche andere zelluläre Bestandteile rekrutieren, darunter auch Zellen der erworbenen Immunität. Genetische Varianten, die intestinale Mikrobiota und immunologische Faktoren beeinflussen dieses Signalgleichgewicht. (Khor et al., 2011)

Wahrscheinlich werden bestimmte Genmarker in der Zukunft helfen, eine bessere, sogenannte personalisierte Therapie im Sinne einer *precision medicine* bei CED-Patienten durchzuführen. (Dolsten & Søgaard, 2012)

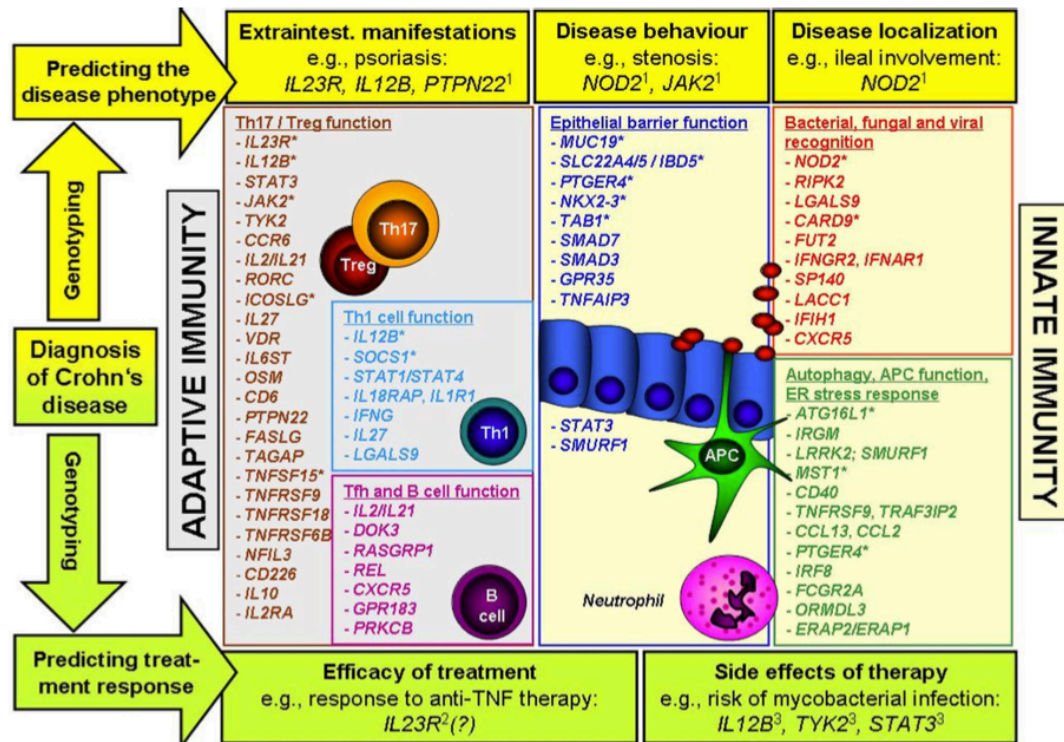


Abbildung 11: Die Hauptsuszeptibilitätsgene für M. Crohn und deren Rolle bei der Vorhersage des Krankheitsphänotyps und des Behandlungserfolgs. (Brand, 2013, p. 1532)

Aktuell sind die detaillierten funktionellen Mechanismen, mit denen Risikovarianten die M. Crohn-Suszeptibilität modulieren, für die meisten der hier dargestellten Gene unbekannt; daher basiert die Gruppierung weitestgehend auf dem Boden der bisher für diese Gene beschriebenen biologischen Eigenschaften. Die Gene können aktivierende oder inhibierende Effekte auf die Zellen haben, unter denen sie aufgelistet sind. Die Gene, denen eine wichtigere Rolle in der angeborenen Immunität nachgesagt wird, sind in den hellgelben Kästen aufgelistet, während die Gene, denen eine wichtigere Rolle in der erworbenen Immunität nachgesagt wird, in den grauen Kästen aufgelistet sind. *Gene, die mit einem Sternchen markiert sind, sind Hauptrisikovarianten für M. Crohn, welche mehr als 1% der Gesamtvarianz ausmachen, welche von allen Loci für M. Crohn ausgemacht wird, basierend auf der Studie von Jostins et al. (Jostins et al., 2012) (1) Diese Assoziationen mit dem M. Crohn-Phänotyp

wurden in der Studie von Cleynen et al. gezeigt. (Cleynen et al., 2013) (2) In der Studie von Jürgens et al. konnte gezeigt werden, dass *IL23R*-Varianten als Prädiktoren für das Ansprechen auf eine anti-TNF-Therapie bei *C. Ulcerosa* fungieren; dies muss jedoch bei *M. Crohn* noch bestätigt werden. (Jürgens, Brand, et al., 2010) (3) Die Assoziationen mit einer Suszeptibilität hinsichtlich mykobakteriellen Infektionen werden in der Studie von Jostins et al. deutlich. (Jostins et al., 2012)

Abk. APC von engl. *antigen presenting cell*, Abk. ER von engl. *endoplasmatic reticulum*, Abk. NKT von engl. *natural killer cells*, Abk. Th von engl. *T helper cell*, Abk. Tfh von engl. *follicular helper T cell*, Abk. Treg von engl. *regulatory T cell*. (Brand, 2013)

1.1.4.3 Mikrobielle und immunologische Faktoren

Der menschliche Gastrointestinaltrakt enthält nicht weniger als 10¹⁴ einzelne Bakterien; insgesamt setzt sich die intestinale Mikrobiota aus 500 verschiedenen Bakterienspezies zusammen. In engem Kontakt zu diesem Mikrobiom des Menschen steht die intestinale Mukosa, die eine primäre Barrierefunktion zwischen Immunsystem und äußerer Umwelt einnimmt. (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011)

Studien belegen inzwischen die Hypothese, dass es sich bei einer CED um eine überschießende Immunreaktion des Körpers auf luminale bakterielle Antigene und andere Stoffe im Rahmen einer genetischen Suszeptibilität des Betroffenen handelt, wobei die zur chronisch wiederkehrenden Darmentzündung führende Fehlregulation der mukosalen Immunantwort auf kommensale Darmbakterien eine der Gemeinsamkeiten in der Pathogenese von *M. Crohn* und *C. ulcerosa* darstellt. (Umeno et al., 2011) Das genetische Risiko stellt also einen wichtigen Faktor bei CED dar und kann auch die Zusammensetzung der intestinalen Mukosa beeinflussen; ausreichend, um die Erkrankung auszulösen, ist es allerdings nicht. Die Rolle von Genen wird auch bei der hohen Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen deutlich. Dennoch deutet die Tatsache, dass die Penetranz nicht 100% beträgt, darauf hin, dass auch andere, nicht-genetische Faktoren an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Zu diesen Faktoren gehören Umweltfaktoren, im Laufe des Lebens erworbene epigenetische Modifikationen und die intestinale Mikrobiota, welche alle potentiell den Beginn der Erkrankung, ihren Phänotyp und den klinischen Verlauf modifizieren können, siehe Abbildung 12. (Dalal & Chang, 2014)

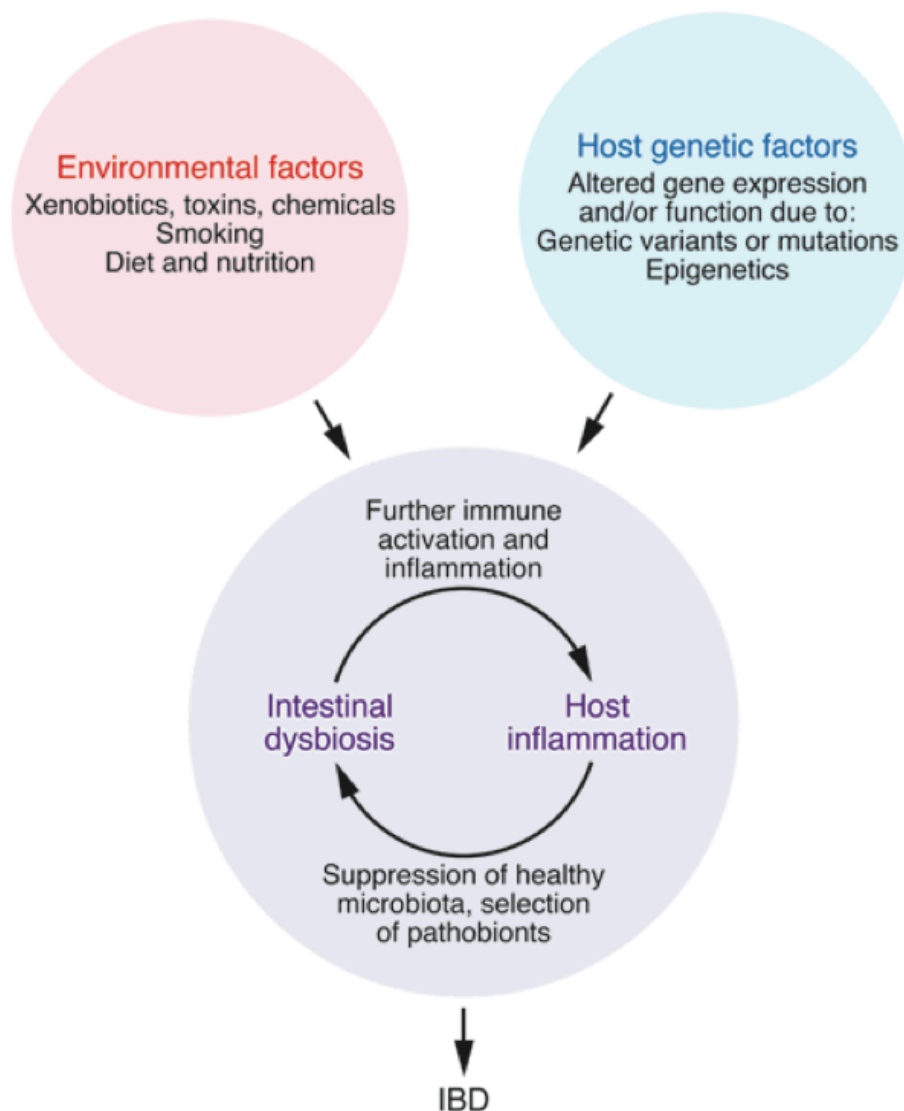


Abbildung 12: CED entstehen durch das Zusammenspiel von Faktoren, die das Gleichgewicht zwischen Umwelt, Darmkeimen und dem Wirt stören. (Dalal & Chang, 2014, p. 4193)

CED entstehen aus dem Zusammenspiel zwischen Umwelt- und genetischen Faktoren, welche das Gleichgewicht zwischen immunologischen Faktoren des Wirtsorganismus und intestinalen mikrobiellen Faktoren kippen lässt. Somit kommt es zur Entstehung einer solchen Erkrankung in einem genetisch suszeptiblen Individuum. Die Aufrechterhaltung von CED wird im Sinne eines Teufelskreises durch pathophysiologische Prozesse und Ereignisse des Wirtsorganismus gewährleistet, welche eine dysbiotische Mikrobiota fördern, die wiederum eine Inflammation aggravierend kann. (Dalal & Chang, 2014)

Bei Individuen, welche Träger der *ATG16L1*-Variante p.Thr300Ala (rs2241880) sind, kommt es aufgrund einer gestörten Autophagie-Induktion zu einer reduzierten

Ausbildung von Phagosomen und nachfolgend zu einer verminderten Präsentation von Antigenen durch den „Haupthistokompatibilitätskomplex“ oder „Hauptgewebeverträglichkeitskomplex“ (Abk. *MHC* von engl. *major histocompatibility complex*), und folglich zu einer herabgesetzten Aktivierung des Immunsystems. Diese Forschungsergebnisse wiederum, welche Rückschlüsse auf fehlerhafte Verteidigungsmechanismen in der Immunantwort mit konsekutiver Bakterienpersistenz in der Darmmukosa ziehen lassen, liefern kein schlüssiges Ergebnis für die überschießende Inflammationsreaktion des Darmes bei CED, da viele Individuen in der Allgemeinbevölkerung diese Variante tragen und gesund bleiben. (Dalal & Chang, 2014; Glas et al., 2008; Plantinga et al., 2011) Tatsächlich ist es sogar so, dass diese Variante das Erkrankungsrisiko nicht einmal um das Zweifache erhöht, was ein Hinweis darauf ist, dass andere Faktoren mit dem Gen interagieren, um diesem ein Risikopotential zu verleihen. (Dalal & Chang, 2014)

Die Entzündungsreaktion bei CED findet ohne klar identifizierte mikrobielle Antigene statt, wobei immunologische, mikrobiologische und genetische Studien eine veränderte intestinale Mikrobiota, eine sogenannte Dysbiose, mit abweichenden mikrobiellen Interaktionen und einer verminderten Komplexität belegen konnten. Hierbei ist jedoch nicht klar, ob diese Dysbiose bei der Entwicklung einer CED mitwirkt oder lediglich die Folge der Erkrankung ist. (Chassaing & Darfeuille-Michaud, 2011; Wouters, 2011) Eigenschaften der intestinalen Dysbiose bei aktiver humaner CED sowie bei experimenteller Kolitis konnten bisher recht gut beschrieben werden; hierbei zeigte sich sowohl bei *M. Crohn* als auch bei *C. ulcerosa* eine Verminderung von Bacteroidetes- und Lachnospiraceae-Arten, eine herabgesetzte Artenvielfalt mit einem niedrigeren Anteil an Firmicutes und einer erhöhten Anzahl an Gammaproteobacteria und Enterobacteriaceae. (Dalal & Chang, 2014; Frank et al., 2007) *C. ulcerosa*-Patienten weisen zudem eine Zunahme der sulfitreduzierenden Deltaproteobacteria auf, während bei *M. Crohn*-Patienten eine Reduktion des *Faecalibacterium prausnitzii* beschrieben wurde, dessen Metabolite antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. (Dalal & Chang, 2014) Neben dieser

allgemeinen Reduktion des *Faecalibacterium prausnitzii* bei M. Crohn-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, konnte eine Studie zudem zeigen, dass eine Verringerung dieses Bakteriums mit einem erhöhten postoperativen Rezidivrisiko bei ilealem M. Crohn einhergeht. (Sokol et al., 2008) Bei pädiatrischen M. Crohn-Patienten konnte eine Studie kürzlich eine Zunahme an Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae, Veillonellaceae und Fusobacteriaceae sowie eine Abnahme an Erysipelotrichales, Bacteroidales und Clostridiales nachweisen. (Gevers et al., 2014)

Charakteristisch für den gesunden Darm ist ein niedriger Sauerstoffgehalt und konsekutiv die Anwesenheit einer Vielzahl an obligaten Anaerobiern. Im Rahmen der Dysbiose der intestinalen Mikrobiota, wie wir sie bei CED-Patienten sehen, wurden ein Rückgang der obligaten Anaerobier und eine Zunahme der fakultativen Anaerobier beobachtet. Diese Verschiebung der bakteriellen Gemeinschaften von obligat anaerob zu fakultativ anaerob deutet stark auf eine Störung der Anaerobiose und somit auf die Funktion des Sauerstoffs im Rahmen der intestinalen Dysbiose hin; würde diese Hypothese bestätigt werden, so könnten sich neue Präventions- bzw. Therapiestrategien mithilfe einer Senkung des intestinalen Sauerstoffgehalts entwickeln. (Rigottier-Gois, 2013)

Sowohl die Epithelzellen als auch die Leukozyten des Darms verfügen über ein beträchtliches Ausmaß an angeborenen Immunrezeptoren, welche Bestandteile der Darmbakterien erkennen können und somit eine wichtige Rolle im Schutz vor pathogenen Keimen spielen, wobei bis heute nicht verstanden wurde, wie der Organismus zwischen kommensaler intestinaler Mikrobiota und pathogenen Bakterien unterscheiden kann. Sicher ist jedoch, dass eine ausgewogene Interaktion zwischen der bakteriellen Flora und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems notwendige Grundlage ist, um die Homöostase im Darm zu erhalten. Ist diese gestört, kommt es zur intestinalen Entzündung. (Harrison & Maloy, 2011)

Ungeklärt bleibt auch weiterhin, ob CED durch das Hinzukommen von pathologischen Keimen und/oder durch die Abwesenheit von Symbionten entstehen, oder ob der

Grund für die Entwicklung einer CED die aberrante Immunantwort des Wirtsorganismus auf kommensale Darmbakterien ist. Zu klären gilt es außerdem, ob die Veränderungen der intestinalen Mukosa konstant sind oder sich im weiteren Verlauf der Erkrankung ändern, welche Rolle Umweltfaktoren bei der Risikoentstehung und dem Verlauf einer CED spielen, und ob es Möglichkeiten der Prävention oder Therapie gibt, indem man die Dysbiose „korrigiert“? (Dalal & Chang, 2014)

Wie schon die Hygiene-Hypothese besagt, kann eine in der Kindheit verminderte mikrobielle Exposition die Entstehung einer CED begünstigen. (Koloski et al., 2008) Aufgrund optimierter hygienischer Bedingungen ist das frühkindliche Immunsystem hierbei häufigen Infektionserregern der Umwelt nicht ausgesetzt. Kommt das Kind später im Leben mit pathogenen Infektionserregern in Kontakt (verzögerte Exposition), so führt dies zu einer inadäquaten Immunantwort. Folge hiervon könnte die Entwicklung eines abnormalen oder ineffektiven inflammatorischen Prozesses bis hin zur CED sein. (Bloomfield et al., 2006; Koloski et al., 2008) Zu den vielversprechendsten Faktoren, die diese Hypothese hinsichtlich CED stützen, zählen die helminthische Infektion (Weinstock et al., 2002), die *Helicobacter pylori*-Exposition (Halme et al., 1996; Sonnenberg & Genta, 2012; Wagtmans et al., 1997), die Verwendung von Antibiotika (Card et al., 2004; Ekblom & Montgomery, 2004; Gilat et al., 1987; Wurzelmann et al., 1994) und das Stillen (Bergstrand & Hellers, 1983; Klement et al., 2004), wobei es hier noch weiterer, prospektiver Studien bedarf. Auch die historische Entwicklung in den Industrieländern mit deutlich gefallener Inzidenz für viele Infektionserkrankungen und stark gestiegener Inzidenz für Autoimmunerkrankungen unterstützt die Hygiene-Hypothese, siehe Abbildung 13. (Bach, 2002) Doch selbst wenn heute noch keine praktischen Auswirkungen aus der Hygiene-Hypothese abgeleitet werden können, so liefert sie dennoch ein großes Potential für die Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Strategien für die Zukunft. (von Mutius, 2007)

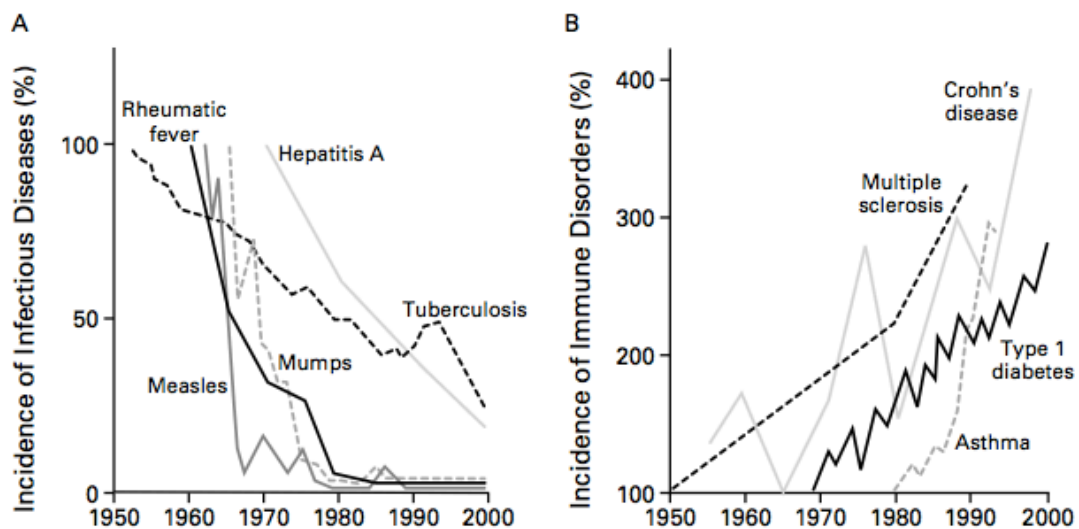


Abbildung 13: Inverse Relation zwischen der Inzidenz prototypischer Infektionskrankheiten (Abbildung A) und der Inzidenz von Autoimmunerkrankungen (Abbildung B) zwischen 1950 und 2000. (Bach, 2002, p. 912)

Studien an steril aufgezogenen, in Isolation lebenden Hasen, konnten aufzeigen, dass diese ein unterentwickeltes darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (Abk. GALT von engl. *gut associated lymphoid tissue*) und eine substantielle Reduktion der Mannigfaltigkeit des Antikörperbestandes aufwiesen. (Nagalingam & Lynch, 2011) Ähnlich wurde auch an gnotobiotischen Mäusen eine abnormale Entwicklung des Immunsystems beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass es bei keimfreien Mäusen zu einer Anhäufung invarianter natürlicher T-Killerzellen in der Lamina propria des Kolons und in der Lunge kommt, was bei den Mausmodellen für CED und allergisches Asthma zu einer erhöhten Mortalität im Vergleich zu den spezifiziert pathogenfreien Mäusen führte. Die Kolonisation neonataler, jedoch nicht erwachsener keimfreier Mäuse mit einer konventionellen mikrobiellen Flora konnte diese Tiere vor solch einer Anhäufung invarianter natürlicher T-Killerzellen und der damit verbundenen Pathologie schützen. (Olszak et al., 2012)

Mikrobielle Kolonisation ist somit Voraussetzung für die Entwicklung eines gut funktionierenden Immunsystems; allerdings kann auch das „reife“, erwachsene Immunsystem mikrobieller Manipulation zum Opfer fallen. In einigen Fällen wurde beobachtet, dass spezifische Darmbakterien die Immunreaktionen des Wirtsorganismus eigennützig zur Optimierung der eigenen Überlebenschancen nutzen, beispielsweise im Sinne von Induktion einer Inflammationsreaktion, um potentiell um Lebensraum konkurrierende Organismen, darunter auch Pathogene, zu eliminieren. Ein Beispiel für solch ein opportunistisches Bakterium wäre *Salmonella typhimurium*. Die intestinale Mikroflora kann demnach an der Krankheitsentstehung beteiligt sein, allerdings spielt sie eine große Rolle insbesondere in der Aufrechterhaltung der Gesundheit des Wirtsorganismus. (Ferreira et al., 2011; Nagalingam & Lynch, 2011)

1.1.4.4 Besonderheiten der Pathogenese bei Morbus Crohn

Die Entzündungsreaktion bei M. Crohn ist mit einem Defizit des antimikrobiellen Schutzschildes in der ilealen Mukosa assoziiert, welches anhand der reduzierten Expression und Sekretion der alpha-Defensine HD5 und HD6 (Abk. HD von engl. *human enteric defensin*) der Panethschen Körnerzellen sichtbar wird. (Gersemann et al., 2011; Jan Wehkamp et al., 2005) Dies wiederum ist Folge eines Differenzierungsfehlers bei den Panethschen Zellen, der auf eine eingeschränkte Expression des Wnt-Transkriptionsfaktors TCF4 (Abk. TCF von engl. *transcription factor*) zurückgeführt werden kann. (Gersemann et al., 2011) Teilweise ist diese „Defensin-Hypothese“ jedoch umstritten: andere Studien konnten aufzeigen, dass die reduzierte alpha-Defensin-Expression vom Grad der Gewebsentzündung abhängt und somit am ehesten auf den Epithelienverlust zurückzuführen ist, welcher Folge sekundärer Veränderungen ist. Im Rahmen dessen käme es zu einer Suszeptibilität der Dünndarmkrypten gegenüber bakterieller Invasion aufgrund der verringerten Anzahl antimikrobieller Peptide, darunter die alpha-Defensine. Somit würde es sich bei der reduzierten alpha-Defensin-Expression nicht um ein Erstereignis bei der Entzündung handeln, sondern vielmehr um eine Folge des Verlustes von Oberflächen-Epithelien. (Simms et al., 2008)

Die Mukosa von M. Crohn-Patienten wird außerdem von CD4+-Lymphozyten (Abk. CD von engl. *cluster of differentiation*) dominiert, welche einen Typ 1 T-Helferzell-(Th1)- und Th17-Phänotyp aufweisen. Charakteristisch hierfür ist die Produktion von TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2), IL-12, IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-23, siehe Abbildung 14. (Brand, 2009; Fuss et al., 1996; Heller et al., 2002; Miossec, 2009; Podolsky, 2002)

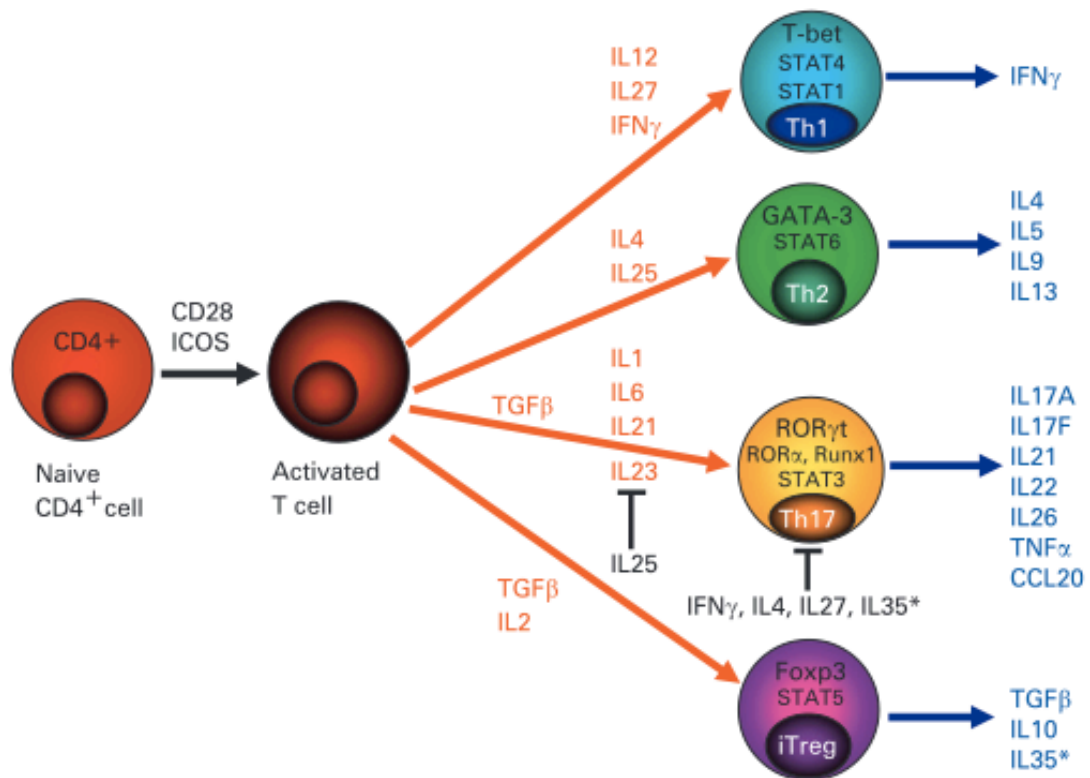


Abbildung 14: Entwicklung von Th1-, Th2-, Th17- und iTreg-Zellen (Abk. iTreg von engl. *induced regulatory t cells*) aus naiven CD4+-T-Zellen. (Brand, 2009, p. 1153)

Zytokine, welche die Entwicklung von Th1-, Th2-, Th17- und iTreg-Zellen induzieren, sind rot markiert. Die Haupt-Effektorzytokine dieser vier Zelllinien sind blau markiert. Zytokine, welche die Entwicklung von Th17-Zellen inhibieren, sind schwarz markiert. Obwohl IL23 und Interferon- γ (IFN- γ) durch IL6 und TGF- β (Abk. TGF- β von engl. *transforming growth factor beta*) fast komplett die Generation von Th17-Zellen unterdrücken, inhibieren diese Zytokine nur partiell die Expression von ROR γ t (Abk. ROR γ t von engl. *retinoid-related orphan receptor γ t*) durch IL6 und TGF- β .

*Murine Treg-Zellen, aber nicht humane Treg-Zellen exprimieren konstitutiv IL35, welches antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und die Expansion von Th17-Zellen limitiert.

Abk. FOXP von engl. *forkhead box P3*, Abk. GATA von engl. *GATA binding protein*, Abk. ICOS von engl. *inducible co-stimulatory molecule*, Abk. RUNX von engl. *runt-related transcription factor*, Abk. STAT von engl. *signal transducer and activator of transcription*, Abk. T-bet von engl. *T box expressed in T cells*. (Brand, 2009)

1.1.4.5 Besonderheiten der Pathogenese bei Colitis ulcerosa

Im Gegenzug zu M. Crohn zeigt sich bei C. ulcerosa-Patienten eine von CD4+-Lymphozyten dominierte Mukosa mit atypischem Typ 2 T-Helferzell-Phänotyp (Th2), charakterisiert durch TGF- β -Produktion (Abk. TGF- β von engl. *transforming growth factor beta*) und IL-5, jedoch nicht IL-4, wie in einer üblichen Th2-Immunreaktion zu erwarten wäre. (Fuss et al., 1996; Podolsky, 2002)

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Zellen der Lamina propria von C. ulcerosa-Patienten neben IL-5 und IL-10 auch signifikant größere Mengen von IL-13 im Vergleich zu Kontrollzellen produzieren, sowie wenig IFN- γ (im Vergleich zeigte sich bei M. Crohn-Patienten eine große Menge an IFN- γ und wenig IL-13). (Fuss et al., 2004; Heller et al., 2002) Wie 2004 durch eine Studie nachgewiesen werden konnte, stammt dieses IL-13 von atypischen natürlichen T-Killerzellen, welchen ein zytotoxisches Potential gegenüber Epithelzellen nachgesagt wird. (Fuss et al., 2004) Eine aktuelle Pilotstudie zur IL-13-Hemmung als zusätzliche Therapieoption bei der Colitis ulcerosa zeigte allerdings eine nur eingeschränkte Wirksamkeit, so dass weitere Studien notwendig sind, um für diese Therapie geeignete Patienten zu identifizieren. (Danese et al., 2014)

Die sowohl physikalisch als auch chemisch als Schutzbarriere zwischen Epithel und im Lumen befindlichen Mikroorganismen fungierende Schleimschicht weist bei der Colitis ulcerosa im Vergleich zu Kontrollgruppen streckenweise Ausdünnungen sowie erosive Veränderungen auf. Dies kann auf unreife Becherzellen zurückgeführt werden, welche durch fehlende Induktion durch die Becherzell-Differenzierungsfaktoren (Hath1 und KLF4) entstehen. (Gersemann et al., 2011)

1.1.4.6 Zusammenfassende Aspekte der Pathogenese

Immunologisch gesehen basiert M. Crohn also auf einer überschießenden Th1- und Th17-Zell-Reaktion gegen die intestinale Mikrobiota mit Erhöhung des Th1- und Th17-Zytokin-Profiles. Im Gegensatz dazu die Vorgänge bei *C. ulcerosa*: hier wird die Immunantwort durch Th2-Zellen vermittelt, welche durch natürliche T-Killerzellen aktiviert werden. Hieraus resultiert ein eigenes Zytokin-Profil, welches u.a. IL-13 beinhaltet. Dieses Zytokin wiederum besitzt die Eigenschaft, die von den natürlichen T-Killerzellen ausgehende Zytotoxizität gegenüber Epithelzellen zu verstärken. (Brand, 2009; Fuss et al., 2004; Waterman et al., 2011). Allerdings spielen auch bei der *C. ulcerosa* Th17-Zellen und Th17-Zytokine wie IL-17A und IL-17F eine wichtige pathogenetische Rolle. (Bogaert et al., 2010)

Während die genauen molekularen Mechanismen, die zu M. Crohn und *C. ulcerosa* führen, nicht ausreichend geklärt sind, ist doch immerhin die fehlende Ausdifferenzierung der Panethschen Körner- und der Becherzellen ein Hinweis für eine Barriereerkrankung, die das Eindringen der im Lumen befindlichen Mikroorganismen und die Auslösung einer Inflammation erleichtert. Hinweise auf eine Barriereerkrankung ergeben sich auch aus der gestörten Tight Junction-Funktion bei CED-Patienten. Dies wiederum könnte Anstoß für neue Therapiekonzepte sein, die die Stimulation des protektiven, angeborenen Immunsystems zum Ziel haben. (Gersemann et al., 2011; McCole, 2014) Ein erster erfolgreicher Ansatz dazu zeigte sich für die Anwendung von mukosaprotektivem Phosphatidylcholin bei *C. ulcerosa*-Patienten. (Stremmel & Gauss, 2013)

1.2 Autophagie und das Autophagie-Gen *IRGM*

1.2.1 Autophagie

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sich drei fundamentale zellbiologische Signalwege in der Pathogenese von CED kreuzen. Zu diesen gehören 1.) die Autophagie, was anhand der Entdeckung von *ATG16L1* und *IRGM* deutlich wurde, 2.) das intrazelluläre Erkennen von Bakterien, was an der Bedeutung von *NOD2*

offenkundig wurde, sowie 3.) die „unfolded protein response“, eine hochkomplexe zelluläre Stressreaktion, welche nach Stresseinwirkung auf das endoplasmatische Retikulum (ER) aufgrund einer Anreicherung pathologisch gefalteter Proteine initiiert wird, welche genetisch mit M. Crohn und C. ulcerosa in Zusammenhang steht, z.B. durch das X-box binding protein 1, XBP1. (Kaser & Blumberg, 2011)

Bislang wurde Autophagie primär als Signalweg zur Kontrolle der Qualität und Quantität metabolischer und intrazellulärer Biomasse und Organellen betrachtet, doch inzwischen ist erkannt worden, dass sie einen soliden immunologischen Prozess mit einem breiten Spektrum an Funktionen in der angeborenen und erworbenen Immunität darstellt. Diese Funktionen reichen von einzigartigen, manchmal auch hochspezialisierten Effektor- und Regulatoraufgaben bis zu allgemeinem homöostatischem Einfluss auf Immunzellen, ähnlich wie Effekte auf das Überleben und die Homöostase anderer Zelltypen des Körpers. (Deretic, 2011)

Wirtszellen haben Prozesse entwickelt, mit denen sie die Verfügbarkeit von intrazellulären permissiven Nischen für Mikroben einschränken können. Durch das Erkennen von Mikroorganismen durch Oberflächen-Erkennungsrezeptoren wie NOD-Proteinen und Toll-like Rezeptoren werden unmittelbare Schlüsselreaktionen aktiviert, die zu einer polarisierten Sekretion proinflammatorischer Mediatoren führen (die entweder gegen die luminaire oder die basolaterale Oberfläche gerichtet sind). Bakterien können entweder in subzellulären Kompartimenten, z.B. Mikroorganismen-enthaltende Vakuolen, aufbewahrt werden, oder in das Zytoplasma entkommen, wo sie für den gezielten Abbau ubiquitiniert werden können. Beide Unterformen können Ziel des Autophagie-Signalwegs sein, welcher auch durch andere Verteidigungsmechanismen des Wirtsorganismus reguliert wird, so z.B. durch oxidativen Stress und Inflammasomen-Aktivierung, siehe Abbildung 15. (Khor et al., 2011)

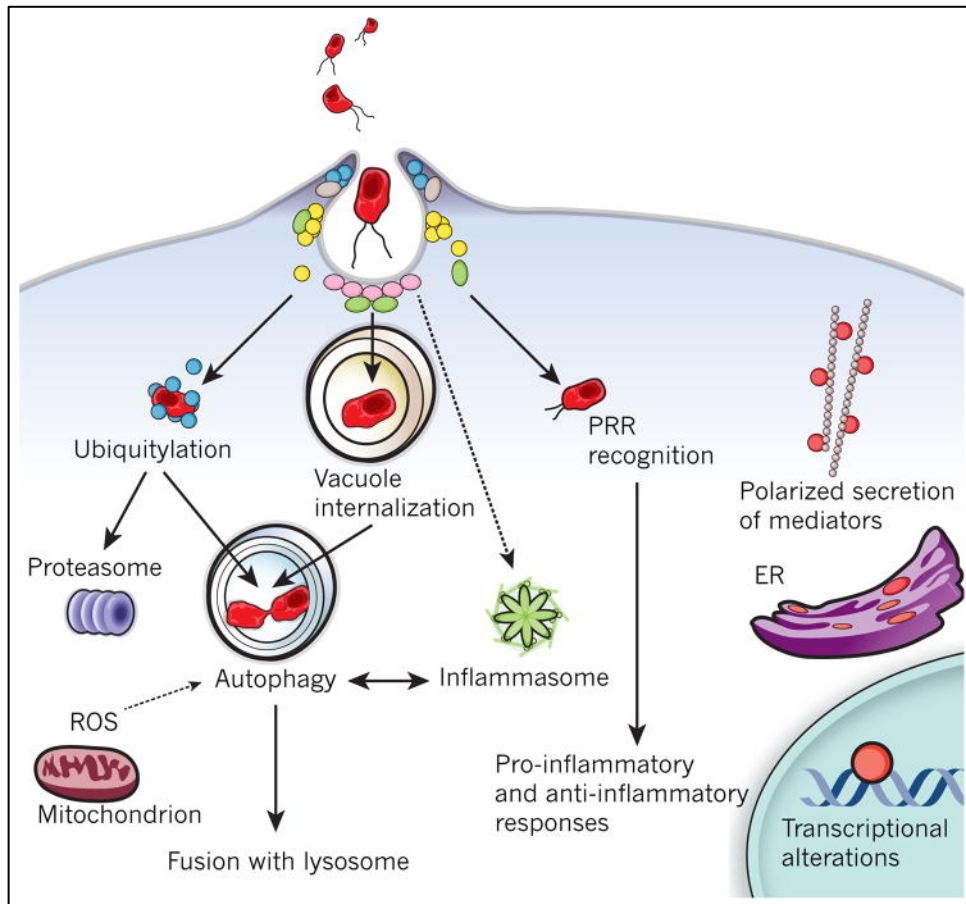


Abbildung 15: Intrazelluläre Abwehrprogramme zur Erkennung von Mikroorganismen. (Khor et al., 2011, p. 314)

ROS: Reaktive Sauerstoffspezies (Abk. ROS von engl. *reactive oxygen species*) (Khor et al., 2011)

Während eine Basisaktivität an Autophagie notwendigerweise in allen Zellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Rahmen des Organellen- und Proteinumsatzes stattfindet, kommt es z.B. in Hungerphasen zu einer wesentlichen Hochregulation, wenn die Zellen intrazelluläre Nährstoffe und Energie bereitstellen müssen. Auch wenn ein struktureller Umbau notwendig wird, kommt es vermehrt zur Autophagie, so z.B. während der Entwicklung. Aber auch wenn Zellen schädliche zytoplasmatische Komponenten entfernen müssen, wie beispielsweise im Rahmen einer intrazellulären Infektion, bei Ausbildung von Proteinaggregaten, bei Ansammlung fehlgefalteter Proteine oder bei oxidativem Stress, kommt es zu einer Hochregulation der Autophagie-Aktivität. (Fritz et al., 2011)

Bei der Autophagie wird zytoplasmatisches Material, also beispielsweise Organellen, Proteinaggregate oder Bakterien, von Autophagosomen, welche durch eine Doppelmembran umgeben sind, phagozytiert. Durch Verschmelzung mit Endosomen und Lysosomen entstehen daraus Autolysosomen, in denen anschließend der Abbau des Inhaltes erfolgt. (Fritz et al., 2011)

Schrittweise entwickelte sich das Verständnis, dass es sich bei Autophagie nicht lediglich um einen alt-evolutionären Säuberungsmechanismus zur Verteidigung der eukaryotischen Zelle von intrazellulären Pathogenen handelt. Vielmehr stellt Autophagie neben einer zellautonomen Immunantwort auf Mikroorganismen auch ein komplexes, aber geordnetes Netz aus Schnittstellen zwischen angeborenen und erworbenen Immunprozessen dar. Die Verbindung zwischen Autophagie und konventionellen Immunvorgängen stellen Toll-like Rezeptoren, Nod-like Rezeptoren und andere Rezeptoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems, ebenso wie Zytokine, angeborene und erworbene Funktionen von Makrophagen und dendritischen Zellen, differentielle Effekte auf die Entwicklung und Homöostase von T- und B-Lymphozyten-Untergruppen, sowie die *immunity-related GTPase* IRGM, dar. (Deretic, 2011)

1.2.2 „Immunity-related GTPasen“

Das humane *IRGM*-Gen befindet sich auf Chromosom 5q33.1 und kodiert für ein Autophagie-induzierendes Protein, welches zur Familie der p47 *immunity-related GTPasen* (IRG) gehört. Diese sind eine Familie von Proteinen, welche durch IFN- γ induziert werden und eine entscheidende Rolle in der angeborenen Widerstandsfähigkeit gegen intrazelluläre Pathogene, insbesondere grampositive und gramnegative Bakterien, Mykobakterien und Protozoen, spielen. Hierbei ist die M-Unterfamilie der IRG-Proteine (IRGM) in diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben, weil ihre Mitglieder in der Lage sind, Lokalisation und Expression anderer IRG-Proteine zu bestimmen. (Brest, Lapaquette, Mograbi, et al., 2011; Meggyesi et al., 2010; Traver et al., 2011)

Humanes *IRGM* selbst wird IFN- γ -unabhängig exprimiert, allerdings bleiben diese beiden funktionell miteinander verbunden, da *IRGM* bei der IFN- γ -vermittelten Autophagie menschlicher Zellen notwendig ist. (Singh et al., 2010)

1.2.3 Bedeutung von *IRGM*

Seit der Entdeckung von *IRGM* als M. Crohn-Suszeptibilitäts-gen, wurde die Rolle von *IRGM*-Genvarianten in weiteren Studien sowohl bei M. Crohn bei Erwachsenen als auch bei Kindern (Amre et al., 2009; Brest, Lapaquette, Souidi, et al., 2011; Fisher et al., 2008; McCarroll et al., 2008; Palomino-Morales et al., 2009; Prescott et al., 2010; Roberts et al., 2008; J Van Limbergen et al., 2009; Weersma et al., 2009) und bei *C. ulcerosa* (Palomino-Morales et al., 2009) untersucht, wobei dessen Rolle in der Pathogenese des M. Crohn bestätigt werden konnte. Die Rolle von *IRGM* bei der Suszeptibilität für *C. ulcerosa* ist allerdings weniger klar.

Genetische Varianten des *IRGM*-Gens, welche innerhalb der kodierenden Region liegen oder dieser vorgeschaltet sind, modifizieren dessen Expression und tragen somit zur Krankheitssuszeptibilität von M. Crohn bei. (McCarroll et al., 2008; Parkes et al., 2007)

Anders als bei *ATG16L1* ist der genaue Mechanismus, über den *IRGM* die Autophagie moduliert, noch unbekannt, jedoch ist sicher, dass das Expressionsniveau von *IRGM* eine kritische Rolle bei der Regulierung der Einkapselung von Bakterien durch Autophagosomen spielt. (Ballal et al., 2011)

Neben dem M. Crohn-Suszeptibilitäts-gen *ATG16L1* konnten GWAS vor Kurzem eine starke Assoziation mit M. Crohn für den Einzelnukleotid-Polymorphismus (Abk. SNP von engl. *single nucleotide polymorphism*) rs13361189, einem SNP, der dem Autophagie-Gen *IRGM* direkt vorgeschaltet ist, sowie auch für andere *IRGM*-SNPs, aufzeigen. (Glas et al., 2008; Hampe et al., 2007; Parkes et al., 2007; Rioux et al., 2007; The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007)

Eine funktionelle Studie wies auf einen gemeinsamen, dem *IRGM*-Gen vorgeschalteten 20 kb Deletionspolymorphismus, welcher in perfektem Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 steht, als mögliche kausale Variante hin, da das Deletionsallel die Expression von *IRGM* in transformierten Zellen modulierte, siehe Abbildung 16. (McCarroll et al., 2008)

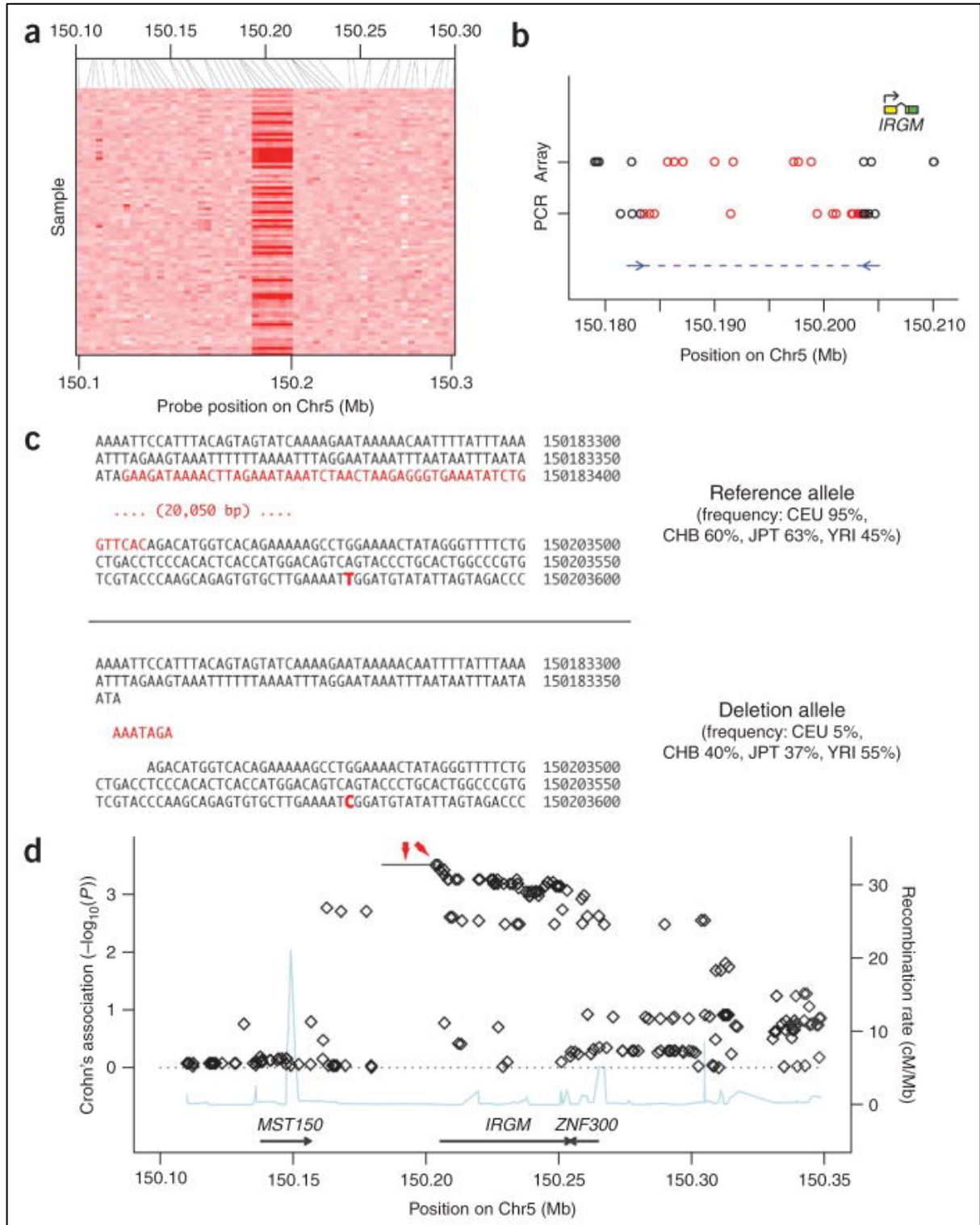


Abbildung 16: Ein gemeinsamer, *IRGM* vorgeschalteter 20 kb Deletionspolymorphismus. (McCarroll et al., 2008, p. 1108)

(a) Hybridisierung von DNA von 90 YRI-HapMap-Proben (YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria; eine Population, aus der DNA-Proben für die Phase III des Internationalen HapMap-Projektes stammen)

auf dem Affymetrix SNP 6.0-Array zeigt ein korreliertes Muster an Intensitäts-Varianten quer durch sechs Kopienzahl-Proben, welche die Region umfassen, die *IRGM* vorgeschaltet ist, was somit nahe legt, dass ein gemeinsamer Kopienzahl-Polymorphismus existiert. (Dunklere Rot-Töne repräsentieren reduzierte Hybridisierungsintensität.) Mittels quantitativer PCR stellte sich heraus, dass es sich bei der Kopienzahl-variablen Region um eine Insertion/Deletion handelte.

(b) Mapping der Deletionsbruchpunkte mittels Mikroarray und PCR. Rot kennzeichnet den Nachweis einer Deletion; schwarz kennzeichnet den Nachweis des Gegenteils; blaue Pfeile kennzeichnen die Lokalisation flankierender PCR-Primer, die in der Lage sind, ein PCR-Produkt bei denjenigen Individuen zu generieren, die mindestens eine Deletionsallel besitzen.

(c) Sequenzen der Referenz- und Deletionsallele. Der mit M. Crohn assoziierte SNP rs13361189 ist rot dargestellt. Physische Koordinaten befinden sich auf dem Referenz-Humangenom (build 35/36); Allelfrequenzen sind für erweiterte HapMap-Analyse-Gremien dargestellt und beinhalten 540 Proben.

(d) M. Crohn-Assoziation für typisierte und zugerechnete Polymorphismen der *IRGM*-Region des NIDDK IBDGC-Genomscans. (Abk. NIDDK von engl. *National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney diseases*; Abk. IBDGC von engl. *Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium*)

Die blaue Kurve kennzeichnet die Rekombinationskarte. Der Deletionspolymorphismus und rs13361189 sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet. rs13361189 (welches in perfektem Kopplungsungleichgewicht zu der Deletion steht, $r^2=1.0$) war ebenfalls der am stärksten assoziierte SNP in der kombinierten WTCCC-Genomscan- und Replikationsstudie (Abk. WTCCC von engl. *Wellcome Trust Case Control Consortium*). (McCarroll et al., 2008)

Eine weitere, kürzlich durchgeführte Studie verwies auf eine unabhängige Assoziation mit M. Crohn für eine Variante in der 5'-nichttranslatierten Region (-308(GTTT)5) (Prescott et al., 2010), während die sehr aktuelle Studie von Brest et al. (2011) funktionale Effekte des synonymen SNP rs10065172 (c.313C>T), welches ebenfalls in Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 und dem Deletionspolymorphismus steht, demonstrierte. Diese exonische, synonyme Variante rs10065172 in *IRGM* verändert eine Bindungsstelle für bestimmte microRNAs (miR-196) und verursacht eine Deregulierung von *IRGM*-abhängiger Xenophagie von Bakterien bei Patienten mit M. Crohn (Brest, Lapaquette, Souidi, et al., 2011), was schlussfolgern lässt, dass es sich bei rs10065172 um eine krankheitsverursachende Variante handelt.

Diese Studien implizieren, dass Autophagie durch direkte Elimination intrazellulärer Bakterien und Aktivierung von Oberflächen-Erkennungsrezeptor-Signalwegen, welche in die Darmhomöostase und Pathogenese von M. Crohn eingebunden sind, eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen des Menschen spielt. (Rioux et al., 2007; Singh et al., 2006)

So konnten Studien auch belegen, dass IRGM-Proteine eine breite Wirkung auf immunitätsverbundene Faktoren haben. Sie wirken sich mitunter auf die Lokalisation von Guanylat-bindenden Proteinen (GBPs) aus. Diese gehören einer zweiten Interferon-induzierten, GTP-bindenden Proteinfamilie an, die eine Funktion im angeborenen Immunsystem hat. In Abwesenheit von IRGM-Proteinen hat sich gezeigt, dass der autophagische Fluss deutlich beeinträchtigt wird. (Traver et al., 2011)

IRGM ist außerdem in der Initiationsphase der Autophagie erforderlich, wenn es um die Lokalisation autophagischer Vakuolen geht, welche Bakterien enthalten. Die mit M. Crohn assoziierte *IRGM*-Variante beeinflusst vermutlich die autophagische Kontrolle von *Salmonella typhimurium* und *Mycobacterium bovis*, zudem ist IRGM an der Autophagie-vermittelten Entfernung von *Mycobacterium tuberculosis* beteiligt; eine Überlappung zwischen CED und mykobakterieller Erkrankungen konnte eine Metaanalyse auch für weitere CED-Suszeptibilitätsgene aufweisen. (Ballal et al., 2011; Fritz et al., 2011; Jostins et al., 2012; Singh et al., 2006)

Eine wegweisende Studie konnte 1998 aufzeigen, dass die Mukosa von M. Crohn-Patienten außerdem eine besonders hohe Zahl des gramnegativen Stäbchens *Escherichia coli* (*E. coli*) aufweist. Es wurde beobachtet, dass dieses Bakterium eine ausgeprägte Fähigkeit besitzt, sich an gastrointestinale Epithelzellen anzuheften, sowie in der Lage ist, potentiell die intestinale Barrierefunktion zu beeinträchtigen, indem es ein Alpha-Hämolyisin produziert. (Darfeuille-Michaud et al., 1998) Diese besondere Art von *E. coli* war außerdem dazu fähig, ähnlich wie Salmonellen, in Epithelzellen einzudringen und in diesen zu überleben. Um diese Art von *E. coli* zu beschreiben, wurde ein neuer Pathotyp vorgeschlagen: *AIEC*, *adherent-invasive Escherichia coli*. (Friswell et al., 2010)

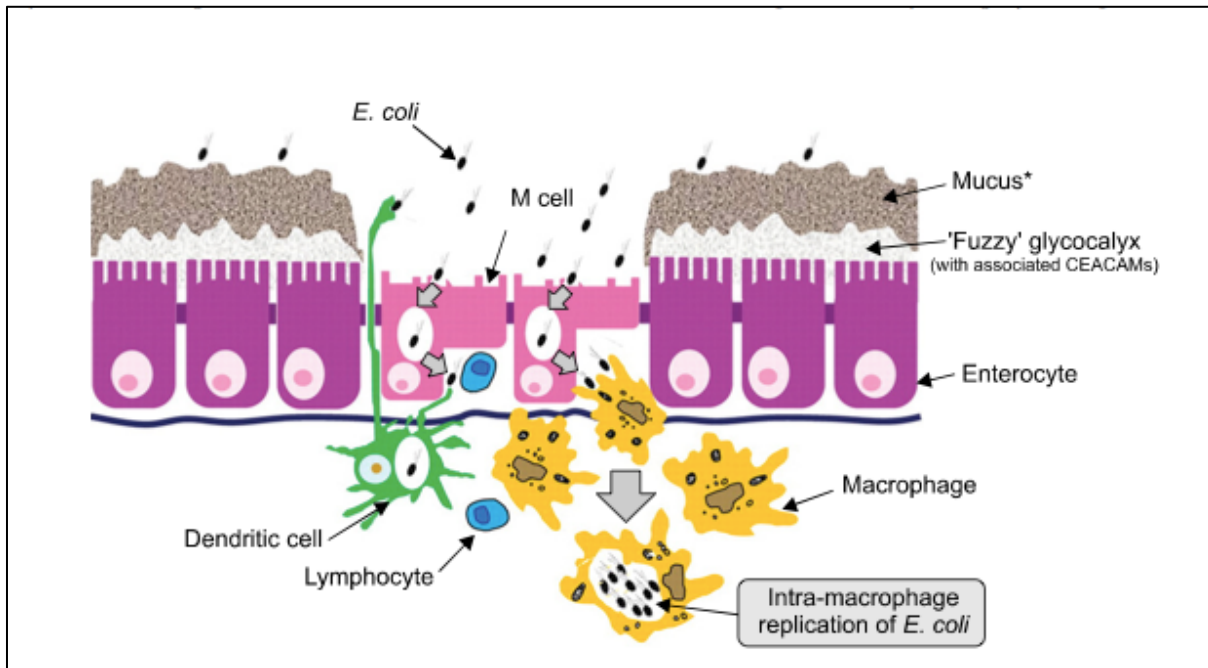


Abbildung 17: Bakterien-Epithel-Interaktion. (Friswell et al., 2010, p. 296)

Es ist wahrscheinlich, dass die Eintrittspforte von *E. coli*, welches häufig bei CED-Patienten isoliert werden kann, durch sogenannte „M-Zellen“ verläuft (Abk. M von engl. *microfold*), welche im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) vorkommen. Sowohl die Abwesenheit von aufliegendem Schleim (es existieren keine Becherzellen im FAE) als auch die verminderte Glykokalyx, die sich auf den M-Zellen befindet, erleichtert Interaktionen mit dem luminalen Inhalt, und somit die Antigenpräsentation. In dieser Abbildung wird auch die Replikation von *E. coli* innerhalb von Makrophagen dargestellt. Auch dendritische Zellen nehmen teil, möglicherweise durch direkte Antigenpräsentation aus dem Lumen, aber auch durch den Erhalt von Bakterien durch die M-Zellen.

Nicht maßstabsgetreu: Die Schleimschicht ist mit $>100\mu\text{m}$ erheblich dicker als die Glykokalyx mit $<1\mu\text{m}$. (Friswell et al., 2010)

Ähnlich wie bei der Variante *ATG16L1* p.Thr300Ala weisen Zellen, welche mit M. Crohn assoziierte genetische Varianten von *IRGM* exprimieren, einen gezielten Vorteil gegenüber der Replikation von *AIEC* auf, dem Keim, der inzwischen neben anderen Pathogenen als möglicher auslösender Erreger bei CED genannt wird. Weiter wachsende Bedeutung wird diesem Bakterium zugesprochen, seitdem Studien beweisen konnten, dass die Prävalenz von *AIEC* in M. Crohn-Patienten höher ist als bei den gesunden Kontrollen. (Ballal et al., 2011; Lapaquette et al., 2010; Martinez-Medina et al., 2009)

In weiteren Studien konnte ein neuer, unerwarteter Wirkmechanismus von *IRGM* beobachtet werden: *IRGM* zeigte eine differentielle Affinität zu Cardiolipin, einem

Bestandteil der mitochondrialen Membran, heftete sich an Mitochondrien an, bewirkte mitochondriale Spaltung und induzierte Autophagie. Im Falle von intrazellulären Mykobakterien war dies für die Kontrolle der Autophagie durch *IRGM* notwendig. Generell ist diese mitochondriale Spaltung ein wichtiger zugrundeliegender Mechanismus für die Induktion von Autophagie zur Elimination intrazellulärer Pathogene oder, wenn diese autophagische Beseitigung nicht gelingt, zur Elimination infizierter Zellen durch Zelltod, um ein weiteres Ausbreiten der Infektion zu verhindern. Durch Überexpression bestimmter Spleiß-Isoformen zeigt *IRGM* Einfluss auf die Polarisation der mitochondrialen Membran und den Zelltod, wobei es Hinweise gibt, dass nicht alle Isoformen eine gleiche Funktionsweise besitzen, da Überexpression bestimmter Formen der Zelle maßgeblichen Schaden zufügen und andere nicht. Durch seine Wirkung auf Mitochondrien kommt es durch *IRGM* also entweder zu einer Autophagie-vermittelten Schutzreaktion oder zum Zelltod, was sein Wirken sowohl in der Abwehr gegen Tuberkulose als auch in der schädlichen Inflammationsreaktion durch M. Crohn verdeutlicht. Demnach hat *IRGM* eine doppelte Wirkungsweise: Schutz gegen eindringende Bakterien mittels Autophagie bei moderater Expression, aber Ursache von Zelltod und Inflammation bei Überexpression bestimmter Isoformen des Gens. (Singh et al., 2010)

2 Zielsetzung der Arbeit

M. Crohn und C. ulcerosa sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen, welche aus einer inadäquaten Immunantwort gegenüber mikrobieller Antigene in genetisch suszeptiblen Individuen resultieren. (Abraham & Cho, 2009b; Brand, 2009; Danese & Fiocchi, 2011; Khor et al., 2011) Die bisherigen genetischen Entdeckungen bestätigen, dass die angeborene Immunität, proinflammatorische IL-23-/Th17-Immunantworten sowie Autophagie eine wichtige Rolle für die Homöostase im Darm, aber auch für die Entwicklung einer chronischen Inflammationsreaktion im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, spielen. (Anderson et al., 2011; Barrett et al., 2008; Duerr et al., 2006; Franke et al., 2010; Hampe et al., 2007)

Ziele unserer Arbeit waren:

- 1.) Der Nachweis einer Suszeptibilität der *IRGM*-Genvarianten für M. Crohn und C. ulcerosa.
- 2.) Die Untersuchung der Rolle von *IRGM*-Haplotypen hinsichtlich M. Crohn- und C. ulcerosa-Suszeptibilität.
- 3.) Die Charakterisierung der phänotypischen Auswirkungen.
- 4.) Die Analyse hinsichtlich einer möglichen Epistasis von *IRGM* mit den drei Hauptsuszeptibilitätsgenen für M. Crohn, *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*.

Durch eine GWAS konnte 2007 eine britische Arbeitsgruppe das Autophagie-induzierende Gen *IRGM* als neues M. Crohn-Suszeptibilitätsgen identifizieren. (Parkes et al., 2007) Um tiefere Einblicke in die Pathogenese von M. Crohn und C. ulcerosa zu erhalten und zu klären, ob *IRGM* auch mit der Krankheitssuszeptibilität in der deutschen CED-Population assoziiert ist und um Rückschlüsse auf potentielle

Konsequenzen für Diagnostik und Therapie schließen zu können, ist diese Identifikation CED-assoziiierter Suszeptibilitätsgene von großer Bedeutung.

Aus diesem Grunde führten wir eine Genotypisierung von CED-Patienten zur Identifizierung des *IRGM*-Locus als potentielles Suszeptibilitätsgen in einer großen deutschen Kohorte durch, wobei die genomische DNA von insgesamt 1099 Patienten mit CED und 961 gesunden Teilnehmern europäischer Abstammung („caucasian“) verwendet wurde. Wir untersuchten hierbei 6 wesentliche *IRGM*-SNPs (rs13361189, rs10065172, rs4958847, rs1000113, rs931058 und rs11747270), für welche Assoziationen mit M. Crohn in vorangegangenen Studien gezeigt worden waren (für Details siehe „4.4 Genotypisierung der *IRGM*-Varianten“) hinsichtlich ihrer Auftrettsfrequenz in Patienten und Kontrollen. Anschließend führten wir eine detaillierte Haplotypen- und eine Genotyp-Phänotyp-Analyse, sowie eine Epistasis-Analyse von *IRGM* mit den drei Hauptsuszeptibilitätsgenen für M. Crohn, *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*, durch.

Während mehrere GWAS und Replikationsstudien *IRGM* als ein M. Crohn-Suszeptibilitätsgen etabliert haben, ist dessen Bedeutung für *C. ulcerosa* bisher weniger eindeutig beschrieben, weshalb wir dies zusätzlich in unserer Studie untersuchten.

3 Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus insgesamt 2060 Teilnehmern. Die Studienprotokolle gründeten auf den ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung am Menschen der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki. (“WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects,” 2008)

Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt und vor Beginn von jedem Patienten eine schriftliche Einwilligungserklärung eingeholt.

3.1 Patientenkollektiv

Die Patientengruppe bestand aus insgesamt 1099 CED-Patienten, darunter befanden sich 817 Patienten mit M. Crohn und 282 Patienten mit C. ulcerosa. Alle Studienpatienten waren europäischer Herkunft und befanden sich in ambulanter oder stationärer Betreuung in einer der folgenden Kliniken:

Medizinische Klinik und Poliklinik II, Standort Großhadern, Klinikum der Universität München

Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Standort Innenstadt, Klinikum der Universität München

3.2 Kontrollkollektiv

Als Kontrollkollektiv dienten 961 gesunde, unverwandte Blutspender. Diese wurden vom Blutspendedienst der Stadt München zur Verfügung gestellt.

3.3 Phänotyp-Definition

Demographische und klinische Parameter (Verhalten und Lokalisation der CED, krankheitsbedingte Komplikationen, chirurgische Anamnese oder immunsuppressive Therapie der Patienten) wurden anhand retrospektiver Analyse von Krankenakten und

Auswertung eines detaillierten Anamnesefragebogens zum Zeitpunkt der Aufnahme der Patienten in die CED-Ambulanz erfasst.

Die Diagnose M. Crohn oder C. ulcerosa wurde anhand etablierter Leitlinien festgelegt, welche auf klinischen, endoskopischen, radiologischen und histopathologischen Kriterien beruhen. (Lennard-Jones, 1989)

Die Patienten wurden mithilfe der Montreal-Klassifikation eingestuft, welche das klinische Muster der CED besonders genau zu charakterisieren vermag. (Mowat et al., 2011) Hierbei wird M. Crohn anhand von Erkrankungsalter (Abk. A für engl. *age*), Lokalisation (Abk. L für engl. *location*) und Verhalten (Abk. B für engl. *behaviour*), im Sinne von strikturierend vs. nicht-strikturierend, penetrierend vs. nicht-penetrierend, klassifiziert. (Mowat et al., 2011; Silverberg et al., 2005) Die Einteilung der C. ulcerosa erfolgt unter Zuhilfenahme der in der Koloskopie sichtbaren Ausdehnung der Entzündung: Proktitis (E1) vs. linksseitig, bis zur linken Kolonflexur reichend (distale C. ulcerosa; E2) vs. ausgedehnte Erkrankung (Pankolitis; E3). (Mowat et al., 2011; Silverberg et al., 2005) Diese einheitliche Klassifikation erleichtert die Datensammlung für ein CED-Register und verbessert die Voraussetzungen für die klinische Forschung. (Mowat et al., 2011)

Patienten mit Colitis indeterminata wurden von der Studie ausgeschlossen.

Die demographischen Basischarakteristika der Studienpopulation wurden hinsichtlich der genotypischen Ergebnisse verblindet gesammelt und sind in der folgenden Tabelle (1) zusammengefasst.

Tabelle 1: Demographische Charakteristika der CED-Studienpopulation.

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Kontrollen
	<i>n=817</i>	<i>n=282</i>	<i>n=961</i>
Geschlecht			
Männlich (%)	46.0	53.0	63.6
Weiblich (%)	54.0	47.0	36.4
Alter (Jahre)			
Durchschnitt + SA	40.7 ± 13.3	43.8 ± 14.4	47.3 ± 9.06
Bereich	15-81	16-88	19-68
Body Mass Index			
Durchschnitt + SA	23.0 ± 4.2	23.9 ± 4.5	
Bereich	13-41	15-54	
Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Jahre)			
Durchschnitt + SA	27.9 ± 12.0	31.3 ± 13.7	
Bereich	6-78	4-81	
Erkrankungsdauer (Jahre)			
Durchschnitt + SA	13.1 ± 8.8	11.9 ± 8.4	
Bereich	0-46	1-50	
Positive Familienanamnese für CED (%)			
	16.7	17.4	

4 Methoden

4.1 DNA-Extraktion

Von allen Studienteilnehmern wurde Blut abgenommen und genomische DNA aus den peripheren Leukozyten mittels dem „DNA Blood Mini Kit“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) entsprechend den Richtlinien des Herstellers isoliert.

4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die zu analysierende DNA musste vorab auf 100 ng/ml verdünnt und auf 96-Well-Platten für die sich anschließende Polymerase-Kettenreaktion (Abk. PCR von engl. *polymerase chain reaction*, siehe Kapitel 4.4.1) verteilt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch. Hierbei werden Konzentrationen in Lösungen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mithilfe eines Photometers bestimmt.

Da der Extinktionskoeffizient ε von DNA und RNA, und somit deren Absorptionsverhalten, durch den pH-Wert und die Ionenstärke des Puffers beeinflusst werden und der Einsatz von Wasser als Messmedium häufig zu schwankenden Messergebnissen führt, können genaue Konzentrationen nur unter kontrollierten pH-Bedingungen und mit Lösungen geringer Ionenstärke bestimmt werden. (Wilfinger et al., 1997)

Die zu analysierende DNA wurde daher mittels TE-Puffer (Tris- und EDTA-Puffer) verdünnt. Zur Messung dieser DNA-Konzentration wurde die optische Dichte (OD) der Probe mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA, RNA) entspricht. Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Es lässt sich mittels Berechnung des Quotienten beider Extinktionen (OD_{260}/OD_{280}) ein Rückschluss auf den Reinheitsgrad der DNA ziehen. Ein $OD_{260}/OD_{280} < 1.8$ kann demnach auf eine Proteinkontamination hinweisen.

4.3 Gelelektrophorese von PCR-Produkten

Im Rahmen der Austestung der optimalen Primerkombinationen und deren Verhältnis zueinander mit dem Ziel einer maximalen Primerspezifität führten wir zur Bestimmung der Größe unserer PCR-Fragmente eine Agarose-Gelelektrophorese durch, welche in Ethidiumbromid-haltigem Agarose-Gel sowie hinzugefügtem TBE-Puffer (Tris-, Borat- und EDTA-Puffer) bei 120 Volt für 90 Minuten erfolgte. Ein DNA-Größenstandard als Marker zur Größenbestimmung der DNA wurde jedem Lauf beigelegt. Die Banden wurden nach Anfärbung mit Ethidiumbromid durch Transillumination mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer UV-CCD-Kamera (Ultraviolett-Charge-coupled-device-Kamera) festgehalten.

4.4 Genotypisierung der *IRGM*-Varianten

Die oben genannten 6 *IRGM*-SNPs rs13361189, rs10065172=p.Leu105Leu, rs4958847, rs1000113, rs931058 und rs11747270 wurden mittels PCR und Schmelzkurvenanalyse genotypisiert.

Die Auswahl dieser 6 *IRGM*-SNPs basierte auf vorangegangenen Studien, welche Assoziationen für diese SNPs in großen Fall-Kontroll-Kohorten aufzeigten.

Die SNPs rs13361189, rs10065172=p.Leu105Leu und rs4958847 wurden aus der Studie von Parkes et al. ausgesucht (Parkes et al., 2007), während die SNPs rs1000113 und rs931058 in der Studie des „Wellcome Trust Case Control Consortium“ (WTCCC) getestet wurden. (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007)

Die SNPs rs13361189 und rs10065172=p.Leu105Leu dienen zudem auch als sog. „Proxies“ für einen gemeinsamen, dem *IRGM*-Gen vorgeschalteten 20 kb Deletionspolymorphismus, nachdem sie in perfektem Kopplungsungleichgewicht ($r^2=1.0$) zu diesem Deletionspolymorphismus stehen. (McCarroll et al., 2008)

Zuletzt wurde rs11747270 eingeschlossen, der SNP innerhalb der *IRGM*-Region, der laut der Metaanalyse von Barrett et al. (2008) am stärksten mit M. Crohn assoziiert war.

4.4.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, in einer einfachen, schnellen, automatisierten Reaktion Kopien eines spezifischen DNA-Abschnittes millionenfach zu vervielfältigen und ist somit in der Lage, eine sehr große Anzahl an definierten DNA-Fragmenten aus einer sehr kleinen Menge einer komplexen Vorlage zu produzieren. (Erlich, 1989)

Hierzu werden zwei Oligonukleotid-Primer (ein „Forward“ und ein „Backward Primer“) benötigt, welche sich an die beiden komplementären DNA-Abschnitte anlagern (einer am 5'-, der andere am 3'-Ende) und somit die „region of interest“ der Ziel-DNA flankieren.

Insgesamt besteht die PCR aus drei Hauptschritten, welche in 30-40 Zyklen wiederholt werden, wobei die DNA-Menge exponentiell zunimmt:

Denaturierung: Hierbei wird der DNA-Doppelstrang bei 94°C getrennt, es entstehen zwei Einzelstränge;

Primeranlagerung: Bei 54°C entstehen nun lockere, ionische Verbindungen zwischen der einzelsträngigen DNA und den Primern. Kommt es zu einer stabileren Bindung aufgrund der exakten Basenabfolge bei passendem Primer, welcher komplementär zum gesuchten DNA-Abschnitt ist, so bleibt der Doppelstrang bestehen und die DNA-Polymerase kann sich anlagern.

Extension: Die hitzestabile Polymerase kann nun bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C mit der Amplifikation beginnen.

DNA-Polymerasen sind Enzyme, die einen neuen DNA-Strang aus einem Einzelstrang, der ihnen als Vorlage (Matrize) dient, synthetisieren können. Hierzu benötigen sie eine endständige 3'-Hydroxygruppe, welche sich am Primer befindet und als Startpunkt der Reaktion dient.

Die Gewinnung der Polymerase I, welche zur Amplifikation verwendet wird, erfolgt aus einem Bakterium, welches in heißen Quellen lebt: *Thermus aquaticus*, daher der Begriff Taq-Polymerase. Sie ist ein thermostabiles Enzym und wird daher durch die Temperaturerhöhung am Anfang eines jeden Zyklus nicht denaturiert. (Buselmaier, 2003; Delidow et al., 1993; Erlich, 1989)

Generell kann ein PCR-Lauf in drei Phasen unterteilt werden:

Die exponentielle Phase: der früheste Abschnitt der PCR, in welchem das Produkt exponentiell vervielfältigt wird, da die Reagenzien in unlimitierter Menge vorliegen.

Die lineare Phase: langsames Produktwachstum, da die Reaktionskomponenten verbraucht werden.

Die Plateau-Phase: keine weitere Änderung der Produktmenge, da einige Reaktionskomponenten nun verbraucht sind.

(Yuan et al., 2006)

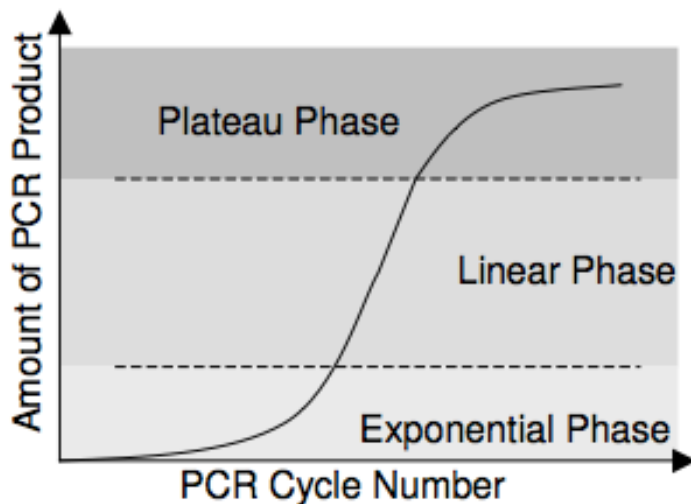


Abbildung 18: PCR-Phasen. (Yuan et al., 2006, p. 2)

Die Abbildung 18 zeigt die drei Phasen der PCR. Der finale Schritt beinhaltet die Detektion und Quantifizierung der Amplifikationsprodukte. Die beiden Haupttechniken der Produktdetektion sind die traditionellen „End-Point“-Messungen des Produktes sowie die Beobachtung der Produktentstehung in Echtzeit (engl. *real-time quantitative PCR*). „End-Point“-Ermittlungen analysieren die Reaktion nach deren Vollendung, hingegen beobachten „Real-Time“-Messungen die Reaktion während ihres Fortschreitens. (Freeman et al., 1999)

Bei der traditionellen Endpunktanalyse werden also Zielregionen der DNA mittels PCR amplifiziert und das Produkt anschließend durch einen separaten Schritt analysiert; dies erfolgt in der Regel durch Hybridisierungsanalyse mittels Western blots, Gelelektrophoresen oder Mikrotiterplatten mit anschließender Visualisierung durch radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierte Sonden bzw. chemilumineszierende Techniken. Diese Methoden sind nicht nur zeitaufwändig, sie beinhalten durch die vielen einzelnen Arbeitsschritte auch ein erhöhtes Risiko der Endproduktkontamination und Fehler bei der Probenanalyse. (Reiser et al., 1998)

Die quantitative Realtime-PCR ermöglicht verbesserte Quantifizierungsmöglichkeiten. Sie gehört zu den leistungsstärksten und sensitivsten derzeit verfügbaren Gen-Analyse-Techniken und ist weniger fehleranfällig als die Endpunkt-Detektion; sie basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA in Echtzeit (daher der Name „Real-time“). sie macht es sich zunutze, dass unter optimalen Bedingungen die Menge an PCR-Produkten in der exponentiellen Phase proportional zur Menge des Ausgangsproduktes ist. Während der exponentiellen Phase kommt es im Idealfall innerhalb eines Zyklus zu einer Verdoppelung des PCR-Produktes (bei 100%iger Effizienz). Fast 100%ige Effizienz kann in dieser Phase bei optimalen PCR-Konditionen, Primer-Charaktereigenschaften, Matrizenreinheit und Fragmentlängen erzielt werden. (Freeman et al., 1999; Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996; Yuan et al., 2006)

Sowohl genomische als auch revers transkribierte Komplementär-DNA (Abk. cDNA von engl. *complementary DNA*) können als Matrize für die Realtime-PCR verwendet werden; klassischerweise wird dann die Dynamik der PCR mithilfe von DNA-bindenden Farbstoffen oder Hybridisierungs sonden beobachtet, wobei die Basis der Realtime-PCR die direkt positive Assoziation zwischen Farbstoff und der Anzahl der Fragmente ist. Die Daten der Realtime-PCR werden absolut und relativ quantifiziert; die absolute Quantifizierung ist dann von Bedeutung, wenn die exakte Zahl der Transkriptionseinheiten ermittelt werden muss. Für die meisten physiologischen und pathologischen Studien jedoch ist die relative Quantifizierung ausreichend. Diese beruht auf dem Vergleich zwischen Expression eines Zielgens versus eines Referenzgens sowie zwischen Expression des gleichen Gens in der Zielprobe versus der Referenzproben. (Yuan et al., 2006)

Die Genotypisierung der 6 *IRGM*-SNPs durch die Polymerase-Kettenreaktion mit anschließender Schmelzkurvenanalyse entsprach einer quantitativen Realtime-PCR und fand in einem Thermocycler (LightCycler® 480, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) statt. Ein Thermocycler ist ein Instrument zur qualitativen und quantitativen Detektion von Nukleinsäuren, Genotypisierung und Mutationsanalyse; er

kombiniert die Rapid-Cycle-PCR mit der Echtzeit-Fluoreszenz-Analyse. Das plattenbasierte Modell LightCycler® 480 arbeitet mit 384-Well-Platten und erlaubt somit die Genotypisierung großer Mengen von DNA in kurzer Zeit. Diese Methode wurde auch in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach erfolgreich angewandt. (Glas, Seiderer, Fischer, et al., 2011; Glas, Seiderer, Fries, et al., 2011; Glas, Seiderer, Nagy, et al., 2010; Glas, Seiderer, et al., 2009; Glas, Stallhofer, et al., 2009; Reiser et al., 1998)

Sequenzspezifische Hybridisierungssonden ermöglichen die Detektion und Analyse der PCR-Produkte im LightCycler®, ohne dass hierfür eine Manipulation der Proben im Anschluss an die PCR erfolgen muss. Dies ermöglicht eine Hochdurchsatz-Genotypisierung und Produktquantifizierung. Die Quantifizierung der PCR-Produkte wird mithilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden und durch den Einsatz von FRET-Sonden (Abk. FRET von engl. *fluorescence resonance energy transfer*) erfolgen. (Heid et al., 1996)

4.4.2 Fluorescence resonance energy transfer (FRET) -Sonden

Fluoreszenz bietet viele Vorteile gegenüber anderen Techniken, insbesondere durch lineare Reaktion über einen großen dynamischen Bereich. Fluoreszenzanalyse mittels Hybridisierungssonden basiert auf einem Fluoreszenzsignal, welches zwischen zwei benachbarten Fluorophoren entsteht, sollte es zum sog. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) kommen. FRET beruht auf einer entfernungsabhängigen Übertragung von Energie von einem Donor-Fluorophor, welches durch einfallendes Licht angeregt wird, auf ein Akzeptor-Fluorophor, wenn dieses sich in unmittelbarer Nähe befindet, siehe Abbildungen 19, 20 und 21. (Reiser et al., 1998; Selvin, 2000)

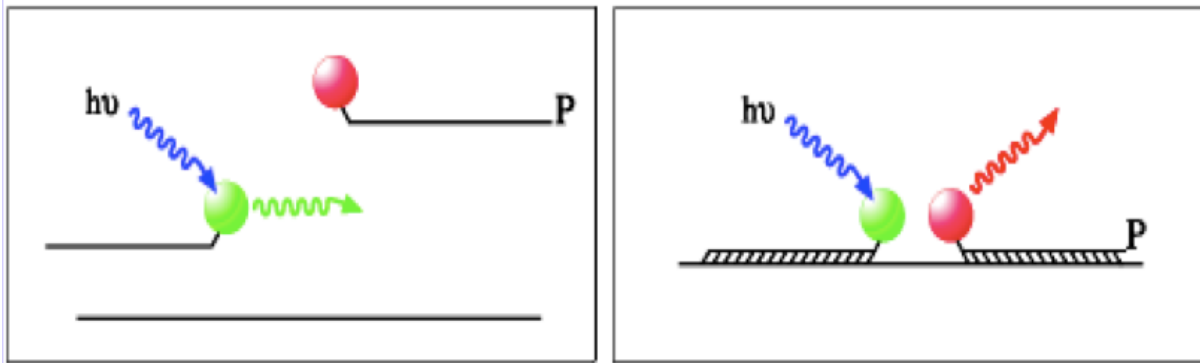


Abbildung 19: FRET zwischen Hybridisierungssonden. (Reiser et al., 1998, p. 13)

Eine graphische Darstellung des Energietransfers zwischen einem Donor-Fluorophor und einem Akzeptor-Fluorophor auf angrenzenden Hybridisierungssonden. Die Überwachung der Fluoreszenz-Emission von dem Akzeptor-Fluorophor nach Exzitation des Donor-Fluorophors erlaubt hochsensitive Produktquantifizierung und Genotypisierung. (Reiser et al., 1998)

Das FRET-Prinzip ist somit abhängig von der räumlichen Nähe beider Farbstoffe; befinden sie sich in unmittelbarer Nähe zueinander, so kann die Energie des Donors, der sich in einem angeregten Zustand befindet, übertragen werden. Dies wiederum führt zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität des Donors sowie der Dauer seines angeregten Zustandes, während die Emissionsintensität des Akzeptors ansteigt. (Selvin, 2000)

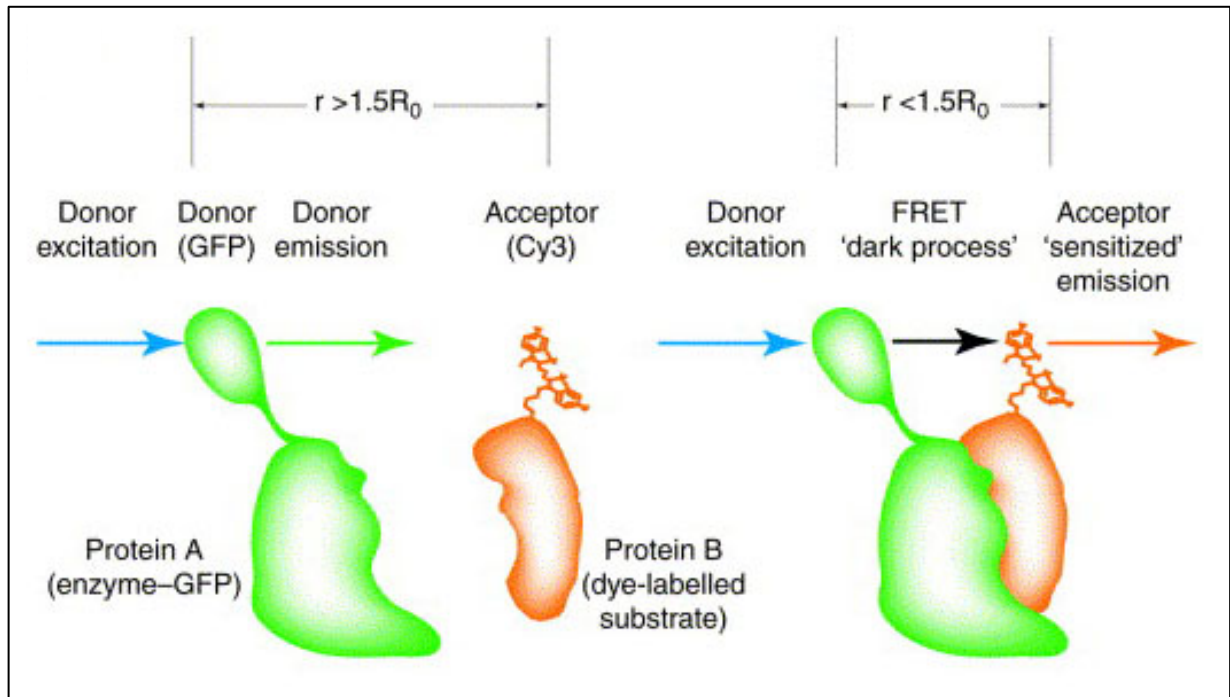


Abbildung 20: Das FRET-Prinzip. (Bastiaens & Pepperkok, 2000, p. 634)

FRET ist ein strahlungsloser Prozess, bei dem Energie von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen wird, wenn dieses sich im Nanometerbereich zu ihm befindet (die Akzeptor- und Donor-Fluorophore müssen näher als ~ 10 nm zueinander sein, damit der Energietransfer stattfinden kann). (Bastiaens & Pepperkok, 2000)

Die von uns verwendeten LightCycler® Sonden bestehen aus einem Sondenpaar, welches benachbart auf der Zielsequenz bindet. In Abwesenheit des Targets, also der DNA-Zielsequenz, kann der Energietransfer nicht stattfinden. Die Menge hybridisierter Sondenpaare steigt mit der Menge des PCR Produktes, das Signal ist somit proportional zur Menge des akkumulierten Amplikons. Das am 3'-Ende der Sensorsonde befindliche fluoreszierende Donormolekül, Fluorescein, wird bei seiner spezifischen Fluoreszenz-Exzitationswellenlänge, 533 nm, angeregt. Anschließend kommt es zur Energieübertragung auf das fluoreszierende Akzeptormolekül am 5'-Ende der Ankersonde (LightCycler® Red 610, 640 oder 670). Das dann vom Akzeptormolekül abgegebene spezifische Fluoreszenzsignal wird durch die optische Einheit des LightCycler® 480-Instruments detektiert. (Reiser et al., 1998)

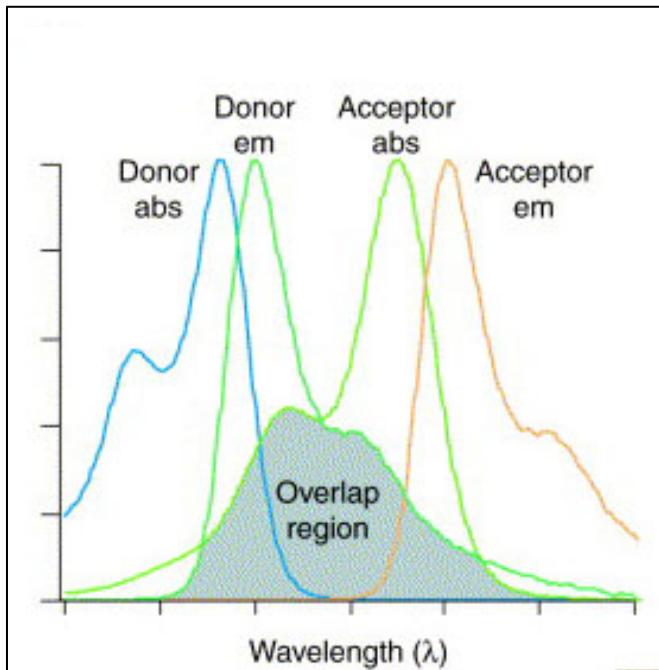


Abbildung 21: Voraussetzung für FRET. (Bastiaens & Pepperkok, 2000, p. 634)

Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Exzitationsspektrum des Akzeptors überlappen. (Bastiaens & Pepperkok, 2000)

4.4.3 Schmelzkurvenanalyse

Mit der sich anschließenden Schmelzkurvenanalyse (siehe Abbildung 22) ist neben der Quantifizierung der Zielsequenz auch eine Mutationsanalyse möglich. Hierbei werden die hybridisierten PCR-Produkte langsam erhitzt, was in einem Abfall der Fluoreszenz resultiert, da die doppelsträngige DNA mit steigender Temperatur dissoziiert, und somit eine Entfernung der Anker- von der Sensorsonde stattfindet. Dies geschieht jeweils bei der probenspezifischen Schmelztemperatur. (Klaschik et al., 2004)

Die Sensorsonde passt genau zu einem Allel eines jeden SNPs, vorzugsweise zum selteneren Allel, sodass es im Falle des anderen Allels zu einem „Mismatch“ kommt, was aufgrund der instabileren Verbindung in einer niedrigeren Schmelztemperatur resultiert. Dieser Unterschied bzgl. der Schmelztemperatur kann mittels eines DNA-bindenden Farbstoffs detektiert werden, wobei verschiedene „Probencluster“ identifiziert werden können, z.B. homozygoter Wildtyp, homozygoter Mutant, sowie heterozygot, siehe Abbildung 22. (Bennett et al., 2003; Roche - Firmenschrift, n.d.)

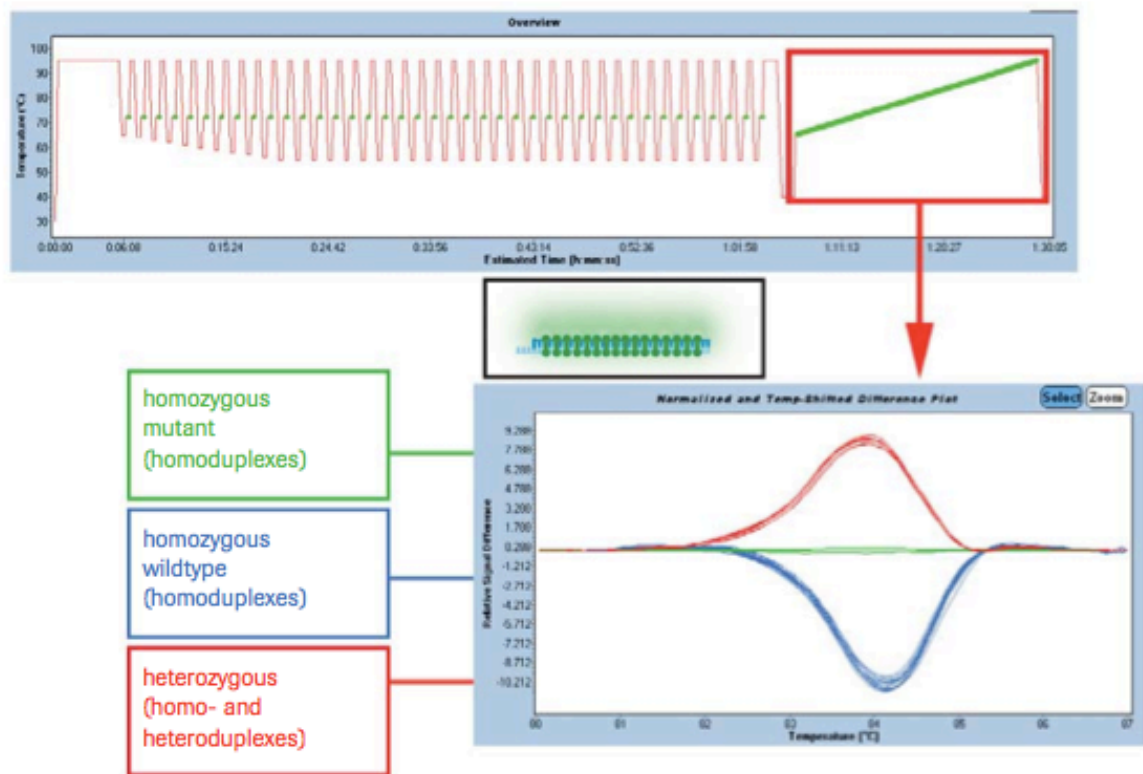


Abbildung 22: Beispiel einer Schmelzkurvenanalyse. (Roche - Firmenschrift, n.d., p. 50)

4.4.4 Praktische Durchführung

Das Volumen für die PCR betrug insgesamt 5 μ l, welches 25 ng genomische DNA, 1x LightCycler® 480 Genotyping Master (Roche Diagnostics), 2.5 pmol jeweils eines Primers und 0.75 pmol jeweils einer FRET-Sonde (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) beinhaltet. Im Falle von rs11747270 wurde die Menge des Forward Primers auf ein Fünftel, im Falle von rs4958847 der Backward Primer auf die Hälfte, im Falle von rs10065172 der Backward Primer auf ein Drittel und im Falle von rs931058 der Forward Primer auf ein Drittel reduziert. Die optimalen Primermengen wurden zuvor in mehreren Testreihen ermittelt. Dieser Genotypisierungs-Ansatz wurde mithilfe des Pipettierrobotors „TECAN Freedom EVO 150“ (TECAN, Männedorf, Schweiz) in eine 386-well-Platte gefüllt.

Die PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt (95°C für 10 Minuten) und anschließenden 45 Zyklen (95°C für 10 Sekunden, 60°C für 10 Sek., 72°C für 15 Sek.). Im Falle von rs10065172 umfasste sie 50 Zyklen anstatt 45 und 55°C anstatt 60°C im zweiten Schritt. Die Schmelzkurvenanalyse enthielt einen initialen Denaturierungsschritt (95°C für 1 Min.), einen anschließenden Schritt, bei dem die Temperatur rapide auf 40°C gesenkt und für 2 Min. konstant gehalten wurde, und einen letzten Schritt, bei dem die Temperatur langsam wieder bis auf 95°C erhöht und während dem die Fluoreszenzintensität fortlaufend gemessen wurde.

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse wurden bestätigt, indem 2 Patientenproben für jeden möglichen Genotyp mittels Sequenzanalyse untersucht wurden. Für diese Sequenzierung bestand das Volumen der PCR aus 100 µl, welche 250 ng genomischer DNA, 1 x PCR-Buffer (Qiagen, Hilden, Deutschland), eine endgültige MgCl₂-Konzentration von 2 mmol, 0.5 mmol eines dNTP-Mix (Sigma, Steinheim, Deutschland), 2.5 Einheiten einer „HotStar Plus Taq™ DNA Polymerase“ (Qiagen) und 10 pmol eines jeden Primers (TIB MOLBIOL) beinhaltete. Die PCR bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt (95°C für 5 Min.), 35 Zyklen (Denaturierung bei 94°C für 30 Sek., Primeranlagerung bei 60°C für 30 Sek., Extension bei 72°C für 30 Sek.) und einem finalen Extensionsschritt (72°C für 10 Min.). Die PCR-Produkte wurden mithilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) gereinigt und durch eine Sequenzierungsfirma sequenziert (Sequiserie, Vaterstetten, Deutschland).

Alle Sequenzen der Primer und der FRET-Sonden, sowie die Primeranlagerungstemperaturen, welche für die Genotypisierung und Sequenzanalyse verwendet wurden, sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Zur Analyse der Schmelzkurve im LightCycler®-Instrument wurde die “LightCycler® 480 Genotyping Software” der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Datenorganisation und –prozessierung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel®.

Tabelle 2: Primersequenzen und FRET-Probensequenzen, welche für die Genotypisierung von *IRGM*-Varianten verwendet wurden.

Polymorphismus	Primersequenzen	FRET-Probensequenz
rs13361189	F: GCTGAGCACGGGGTCTAC	LC640-CTTGAAAAT+CGGAT+GTAT+ATTAG
	R: GCTGACCTCCCACACTCAC	GGCCCGTGTCTGTACCCAAGCAGAGTGT-FL
rs10065172	F: TTGGCAAGCATCACATGATT	GGAGAACTACCTGATGGAAATGC-FL
	R: TCACCTCCTACTGAGCTGGTAA	LC670-GTTCAACCGGTATGACTTCATCATGGTTGC
rs4958847	F: AAGGTACAAAAATGTTATAGGAGACG	CACCTCTCACTGGGAGAAGCTTTATAGATTTC-FL
	R: TCGGTGGTGATATCCCCTT	LC670-TTGCCCAATATAGCTAAATAATGC
rs1000113	F: GTGTGATGCAGAGGCACTAAG	TACAAAATAACAGCATACACATGG-FL
	R: GGTGTTTTCTTGGCACTGATG	LC610-CATTGCAATCAAGTATATTGGAGTTATTAGGAT
rs11747270	F: GCTGAGATGGATGTCAGTGTTAG	TAGATGAGGTCTGTGTTACATAAATG-FL
	R: TGGCCAGACTAAGTACTTGCC	LC670-GCATTGAAACACCAAGTGTCAATCAGAAAAAT
rs931058	F: CTAATAAGTTACTGGTGGCATGA	GTACAAAAATGTATGCATTTCAGAAAT-FL
	R: GGGCTCAAGCAATCCTCTAGC	LC670-TAGTCCAGGCATGGTGGCTTATGCCT

Hinweis: (Abk. F von engl. *forward primer*, R: von engl. *reverse primer*); FL: Fluorescein, LC610: LightCycler-Red 610; LC640: LightCycler-Red 640. Die in der Sensorprobe enthaltene polymorphe Position ist unterstrichen. Ein Phosphatmolekül ist an das 3'-Ende der Akzeptorprobe gebunden, um eine Elongation durch die DNA-Polymerase während der PCR zu verhindern. T+ weist auf „LNA-Modifikation“ (Abk. LNA von engl. *locked nucleic acid*) zur Erhöhung der Schmelztemperatur hin.

Tabelle 3: Primersequenzen, die für die Sequenzanalyse von *IRGM*-Varianten verwendet wurden.

Polymorphismus	Primersequenzen
rs13361189	CATTAAACTCTTTACCATTGTACTCCT
	AGCAGACAGGTTTGAAGATGC
rs10065172	CAATGTAGAACTTCTTTCCCATGTC
	TCACCTCCTACTGAGCTGGTAA
rs4958847	AAGGTACAAAAATGTTATAGGAGACG
	TCGGTGGTGATATCCCCTT
rs1000113	GTGTGATGCAGAGGCACTAAG
	GGTGTTTTTCTTGGCACTGATG
rs11747270	GCTGAGATGGATGTCAGTGTTAG
	AATTACCAATAAATGCAAAGAGAATC
rs931058	GTGGTTTATGTAACTGCTGTGA
	GGGCTCAAGCAATCCTCTAGC

4.4.5 Genotypisierung der *NOD2*-, *IL23R*- und *ATG16L1*-Varianten

Für die Analyse von Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis) standen die Genotypen aller analysierter Patienten und Kontrollen für Genvarianten von *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* aus vorangegangenen Studien zur Verfügung. (Glas et al., 2008, 2007; Glas, Seiderer, Fries, et al., 2011; Glas, Seiderer, Tillack, et al., 2010; Jürgens, Laubender, et al., 2010; Seiderer, Brand, et al., 2006; Seiderer, Schnitzler, et al., 2006)

Die Genotypisierung der *NOD2*-Varianten p.Arg702Trp (rs2066844), p.Gly908Arg (rs2066847), und p.Leu1007fsX1008 (rs2066847) wurde wie oben beschrieben durchgeführt. (Glas, Seiderer, Tillack, et al., 2010) Ebenso erfolgte die Genotypisierung der 10 *IL23R*-SNPs (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026 = p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965) und 9 *ATG16L1*-SNPs (rs13412102, rs12471449, rs6431660, rs1441090, rs2289472, rs2241880 (p.Thr300Ala), rs2241879, rs3792106, rs4663396) mittels PCR und Schmelzkurvenanalyse wie oben beschrieben. (Glas et al., 2008, 2007)

4.4.6 Statistische Analysen

Zur Datenauswertung wurde die SPSS 13.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) sowie R-2.13.1 (<http://cran.r-project.org>) verwendet. Jeder genetische Marker wurde in der Kontrollgruppe auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet. Der Fisher's exact-Test wurde für den Vergleich zwischen den kategorischen Variablen und die studentische t-Verteilung für quantitative Variablen angewandt. Alle Hypothesen wurden zweiseitig getestet und p-Werte < 0.05 als signifikant eingestuft. Odd ratios wurden für das untergeordnete Allel eines jeden SNPs berechnet. Korrigieren für multiples Testen wurde nach der Bonferroni-Korrektur durchgeführt, sofern angebracht. Haplotypenanalyse wurde unter Verwendung des „--hap-logistic“-Befehls in PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink>), Epistasisanalyse mittels der “-epistasis“-Option durchgeführt. Kopplungsungleichgewicht zwischen SNPs wurde mithilfe der “R-Library genetics” evaluiert. Genotyp-Phänotyp-Assoziationen wurden ebenfalls in R unter Zuhilfenahme der logistischen Regression getestet.

5 Material

Folgende Materialien verwendeten wir für die PCR sowie zur Reinigung der Endprodukte:

Tabelle 4: Materialien für die PCR und Reinigung der PCR-Produkte.

Produkt	Hersteller
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Deoxynukleotid-Mix	Sigma, Steinheim
HotStarTaq® DNAPolymerase	Qiagen, Hilden
Qiaquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Materialien benötigten wir für die Bestimmung der Größe unserer PCR-Fragmente im Rahmen der Austestung der optimalen Primerkombinationen:

Tabelle 5: Materialien für die Agarosegelelektrophorese.

Produkt	Zusammensetzung	Hersteller
Agarose, Typ I-A		Sigma, Steinheim
DNA Molekulargrößenstandart		Cambrex, Charles City, IA, USA
Ethidiumbromid		Sigma, Steinheim
Polaroidfilm Typ 667		Polaroid, Minnetonka, MN, USA
DNA-Auftragspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8	
	2 mM EDTA	
	20 % Ficoll 400	
	0,25 % Orange G	
10 x TBE -Puffer	890 mM Tris	
	890 mM Borsäure	
	20 mM EDTA pH	

Die eigentliche Genotypisierung erfolgte mit folgendem Material:

Tabelle 6: Materialien für die Genotypisierung mittels Hybridisierungs sonden im LightCycler®.

Produkt	Hersteller
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
384-well Platten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Folien	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler® 480 Genotyping Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Abschließend noch eine Auflistung der verwendeten Geräte:

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Produkt	Hersteller
Deionisiergerät	NANOpure Typ Diamond Life Science	Wilhelm Werner GmbH, Leverkusen
Eismaschine		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Feinwaage	AQT Compact Balances	Adam Equipment Co Ltd, Milton Keynes, GB
Gelelektrophoresekammer	Sub Cell GT	Biorad, München
Heißsiegelmaschine	MiniSealer	Axygen, Union City, CA, USA
Kühlzentrifuge	Allegra®25R	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Laborabzug		Waldner Laboreinrichtungen, Wangen
Magnetrührer	Variomag Monotherm	Neolab, Heidelberg
Mehrkanalpipette (12,5 µl)	Matrix Electronic Multichannel Pipette	Thermo Scientific, New Hampshire, USA
Mikrowelle		Braun, Kronberg
Pipetten (2,5/10/20/100/200/1000µl)	Research®	Eppendorf, Hamburg
Pipettierroboter	Freedom EVO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Rüttelmischer	Vortex	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Spannungsquelle	Power Pac	Biorad, München
Spectrophotometer	NanoDrop®-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sterilbank	LaminAir Model 1,8	Holten, Allerød, Dänemark
Thermocycler	Light Cycler®480 Instrument 384 SN 1003	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Thermocycler	DNA Engine DYADTM	MJ Research, Waltham, MA, USA
Tischzentrifuge	Microfuge®18	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
UV-Fluoreszenzsystem	FUSION-SL	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Videodokumentationssystem	CN-3000 Infinity	Vilber Lourmat, Eberhardzell

6 Ergebnisse

6.1 Suszeptibilitätsanalyse

Die Allelfrequenzen der SNPs rs13361189, rs10065172=p.Leu105Leu, rs4958847, rs1000113, rs931058 und rs11747270 aller drei Subgruppen (M. Crohn, C. ulcerosa und Kontrollen) stimmten mit dem vorhergesagten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überein und sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Insgesamt konnten unsere Analysen eine Assoziation der *IRGM*-SNPs rs13361189 ($p=0.02$, OR 1.31 [95 % CI 1.05-1.65]), rs10065172=p.Leu105Leu ($p=0.016$, OR 1.33 [95 % CI 1.06-1.66]) und rs1000113 ($p=0.047$, OR 1.27 [95 % CI 1.01-1.61]) mit der Suszeptibilität für M. Crohn aufdecken.

Mit Ausnahme von rs11747270 konnte keinerlei Assoziation mit C. ulcerosa für alle der untersuchten *IRGM*-SNPs beobachtet werden, siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Assoziationen von IRGM-Genmarkern in M. Crohn- und C. ulcerosa-Fall-Kontroll-Assoziationsstudien.

IRGM-SNP	Genotyp / Allel	Morbus Crohn <i>n</i> =815			Colitis ulcerosa <i>n</i> =283			Kontrollen <i>n</i> =961
		Genotyp-/ Allelfrequenz	p-Wert	OR [95 % KI]	Genotyp-/ Allelfrequenz	p-Wert	OR [95 % KI]	
rs13361189	TT	0.799	0.048		0.833	0.06		0.84
	TC	0.191		1.29 [1.00-1.67]	0.149		0.97 [0.65-1.41]	0.156
	CC	0.01		2.47 [0.66-11.27]	0.018		4.28 [0.91 -21.7]	0.004
	T	0.895			0.908			0.918
	C	0.105	0.02	1.31 [1.05-1.65]	0.092	0.44	1.13 [0.82-1.57]	0.082
rs10065172 =p.Leu105Leu	CC	0.799	0.05		0.834	0.125		0.842
	CT	0.191		1.32 [1.02-1.70]	0.148		0.98 [0.65-1.43]	0.153
	TT	0.01		2.44 [0.65-11.14]	0.018		4.20 [0.90-21.36]	0.005
	C	0.894			0.908			0.918
	T	0.106	0.017	1.33 [1.06-1.66]	0.092	0.438	1.14 [0.82-1.58]	0.082
rs4958847	GG	0.745	0.205		0.791	0.774		0.778
	GA	0.235		1.23 [0.97-1.55]	0.184		0.90 [0.63-1.28]	0.201
	AA	0.02		0.98 [0.47-2.01]	0.025		1.16 [0.41-2.91]	0.021
	G	0.863			0.883			0.879
	A	0.137	0.159	1.16 [0.95-1.41]	0.117	0.825	0.96 [0.72-1.28]	0.121
rs1000113	CC	0.813	0.119		0.848	0.174		0.849
	CT	0.179		1.27 [0.98-1.65]	0.138		0.94 [0.62-1.39]	0.147
	TT	0.008		1.84 [0.42-8.90]	0.014		3.38 [0.62-18.28]	0.004
	C	0.903			0.917			0.922
	T	0.097	0.048	1.27 [1.01-1.61]	0.083	0.658	1.08 [0.76-1.51]	0.078
rs11747270	AA	0.885	0.643		0.873	0.033		0.899
	AG	0.109		1.14 [0.80-1.60]	0.108		1.14 [0.69-1.82]	0.097
	GG	0.006		1.55 [0.26-10.66]	0.019		5.34 [1.03-34.64]	0.004
	A	0.94			0.927			0.948
	G	0.06	0.385	1.16 [0.85-1.57]	0.073	0.084	1.42 [0.96-2.12]	0.052
rs931058	AA	0.829	0.632		0.865	0.084		0.845
	AT	0.162		1.10 [0.84-1.44]	0.117		0.76 [0.49-1.15]	0.149
	TT	0.009		1.40 [0.40-5.05]	0.018		2.74 [0.66-10.89]	0.006
	A	0.91			0.924			0.919
	T	0.09	8	1.12 [0.88-1.42]	0.076	0.792	0.94 [0.66-1.33]	0.081

Hinweis: Genotyp- und Allelfrequenzen, p-Werte, sowie Odds Ratios (OR, hier für das Minor-Allel) mit 95% Konfidenzintervallen (KI) sind für die Fall-Kontroll-Kohorte sowohl für M. Crohn als auch für C. ulcerosa abgebildet.

Wie in Tabelle 8 ersichtlich, handelt es sich bei den am stärksten mit M. Crohn assoziierten SNPs um rs13361189 (p=0.02, OR 1.31 [95 % CI 1.05-1.65]) und rs10065172=p.Leu105Leu (p=0.016, OR 1.33 [95 % CI 1.06-1.66]). Diese stehen in

perfektem Kopplungsungleichgewicht ($r^2=1.0$) zueinander. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den p-Werten und Odds Ratios zwischen diesen beiden SNPs hängen mit den kleinen Unterschieden hinsichtlich der Genotypisierungs-Erfolgsraten beider SNPs zusammen, was wiederum kleine Unterschiede zwischen den eingeschlossenen Patienten ergibt.

Der Einzige der untersuchten *IRGM*-SNPs, für den eine Assoziation mit *C. ulcerosa* gezeigt werden konnte, war rs11747270 ($p=0.033$, OR 5.34 [95 % CI 1.03-34.64]).

Ähnlich wie in vorangegangenen Studien standen die SNPs rs13361189 und rs10065172=p.Leu105Leu in perfektem Kopplungsungleichgewicht ($r^2=1.0$) in allen drei Subgruppen (M. Crohn, *C. ulcerosa* und Kontrollen) zueinander, siehe Tabellen 9, 10 und 11.

Starkes Kopplungsungleichgewicht zeigte sich auch bei diesen beiden SNPs mit dem dritten M. Crohn-assoziierten *IRGM*-SNP rs1000113, siehe Tabellen 9, 10 und 11.

Tabelle 9: Analyse hinsichtlich eines Kopplungsungleichgewichts für M. Crohn-Patienten. Werte werden als r^2/D' -Messungen angegeben.

	rs13361189	rs10065172	rs4958847	rs1000113	rs11747270	rs931058
rs13361189	*	*	*	*	*	*
rs10065172	0.99/0.99	*	*	*	*	*
rs4958847	0.71/0.98	0.71/0.98	*	*	*	*
rs1000113	0.90/0.99	0.95/0.99	0.67/1.00	*	*	*
rs11747270	0.53/0.99	0.54/1.00	0.38/0.98	0.53/0.94	*	*
rs931058	0.59/0.84	0.60/0.85	0.43/0.84	0.67/0.85	0.38/0.77	*

In Tabelle 9 zeigt sich ein perfektes Kopplungsungleichgewicht zwischen den *IRGM*-SNPs rs13361189 und rs10065172=p.Leu105Leu ($r^2=0.99$) für M. Crohn-Patienten. Starkes Kopplungsungleichgewicht zeigte sich auch bei diesen beiden SNPs mit dem dritten M. Crohn-assoziierten *IRGM*-SNP rs1000113 ($p=0.048$, OR 1.27 [95 % CI

1.01-1.61]): bei M. Crohn-Patienten zwischen rs13361189 und rs1000113 $r^2=0.90$, zwischen rs10065172=p.Leu105Leu und rs1000113 $r^2=0.95$.

Tabelle 10: Analyse hinsichtlich eines Kopplungsungleichgewichts für C. ulcerosa-Patienten. Werte werden als r^2/D' -Messungen angegeben.

	rs13361189	rs10065172	rs4958847	rs1000113	rs11747270	rs931058
rs13361189	*	*	*	*	*	*
rs10065172	0.99/1.00	*	*	*	*	*
rs4958847	0.77/1.00	0.77/1.00	*	*	*	*
rs1000113	0.89/1.00	0.89/1.00	0.68/1.00	*	*	*
rs11747270	0.78/1.00	0.78/1.00	0.60/0.98	0.72/0.91	*	*
rs931058	0.76/0.97	0.73/0.95	0.56/0.95	0.77/0.92	0.64/0.82	*

Tabelle 10 zeigt ein perfektes Kopplungsungleichgewicht zwischen den *IRGM*-SNPs rs13361189 und rs10065172=p.Leu105Leu (auch hier $r^2=0.99$) für C. ulcerosa-Patienten. Bei diesen beiden SNPs konnte bei C. ulcerosa-Patienten ebenfalls ein starkes Kopplungsungleichgewicht mit dem dritten M. Crohn-assoziierten *IRGM*-SNP rs1000113 gezeigt werden: jeweils $r^2=0.89$.

Tabelle 11: Analyse hinsichtlich eines Kopplungsungleichgewichts für Kontrollen. Werte werden als r^2/D' -Messungen angegeben.

	rs13361189	rs10065172	rs4958847	rs1000113	rs11747270	rs931058
rs13361189	*	*	*	*	*	*
rs10065172	0.98/0.99	*	*	*	*	*
rs4958847	0.64/0.99	0.62/0.98	*	*	*	*
rs1000113	0.91/0.98	0.91/0.97	0.61/1.00	*	*	*
rs11747270	0.57/0.96	0.58/0.96	0.36/0.95	0.52/0.89	*	*
rs931058	0.61/0.79	0.61/0.78	0.40/0.79	0.65/0.82	0.33/0.73	*

In Tabelle 11 zeigt sich erneut ein perfektes Kopplungsungleichgewicht zwischen den *IRGM*-SNPs rs13361189 und rs10065172=p.Leu105Leu ($r^2=0.98$) für Kontrollen. Auch hier gab es zwischen diesen beiden SNPs mit dem dritten M. Crohn-assoziierten *IRGM*-SNP rs1000113 starkes Kopplungsungleichgewicht: jeweils $r^2=0.91$.

6.2 Haplotypen-Analyse

Als Nächstes führten wir eine detaillierte Haplotypen-Analyse durch, um die Rolle von *IRGM*-Haplotypen bei der Suszeptibilität für *M. Crohn* und *C. ulcerosa* zu untersuchen.

Wie die Tabellen 12 und 13 zeigen, waren mehrere *IRGM*-Haplotypen mit einer Suszeptibilität für *M. Crohn* und *C. ulcerosa* assoziiert. Bei *M. Crohn* wurden die stärksten Assoziationen bei Haplotypen gefunden, die mindestens einen der am stärksten mit *M. Crohn* assoziierten SNPs (rs13361189 oder rs10065172) enthielten, siehe Tabelle 12. Bei *C. ulcerosa* wurde die stärkste Assoziation bei rs11747270-rs931058 gefunden (Omnibus p-Wert 1.57×10^{-2}), siehe Tabelle 13.

Hinsichtlich der großen Anzahl an untersuchten Haplotypen konnte jedoch keine dieser Assoziationen der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen standhalten.

Tabelle 12: Haplotypen von IRGM-SNPs für die M. Crohn-Fall-Kontroll-Probe und Omnibus p-Werte für die Assoziation mit M. Crohn-Suszeptibilität.

Haplotypenkombination	Haplotyp	Haplotypen- frequenz	p-Wert	OR (95% KI)
rs13361189-rs4958847	CA	0,09	2.36x10⁻²	1.31 [1.04–1.65]
	TA	0,04	3.60x10 ⁻¹	0.85 [0.60–1.20]
	TG	0,87	1.36x10 ⁻¹	0.86 [0.71–1.05]
rs13361189-rs1000113	CT	0,09	2.96x10⁻²	1.30 [1.03–1.65]
	TC	0,91	1.92x10⁻²	0.76 [0.60–0.96]
rs13361189-rs11747270	CG	0,06	2.76x10 ⁻¹	1.19 [0.87–1.63]
	CA	0,02	8.33x10 ⁻¹	0.95 [0.60–1.50]
	TA	0,92	5.31x10 ⁻¹	0.92 [0.71–1.20]
rs13361189-rs931058	CT	0,07	1.55x10 ⁻¹	1.21 [0.93–1.57]
	TT	0,01	4.49x10 ⁻¹	0.80 [0.45–1.42]
	CA	0,02	2.14x10⁻²	1.72 [1.08–2.73]
	TA	0,9	4.90x10⁻²	0.81 [0.65–1.00]
rs4958847-rs1000113	AT	0,09	3.93x10 ⁻¹	1.28 [1.01–1.62]
	AC	0,04	6.27x10 ⁻¹	0.92 [0.67–1.27]
	GC	0,87	1.67x10 ⁻¹	0.87 [0.72–1.06]
rs4958847-rs11747270	AG	0,06	3.13x10 ⁻¹	1.17 [0.86–1.59]
	AA	0,06	5.16x10 ⁻¹	0.91 [0.68–1.21]
	GA	0,88	8.94x10 ⁻¹	0.99 [0.79–1.23]
rs4958847-rs931058	AT	0,07	1.95x10 ⁻¹	1.19 [0.91–1.55]
	GT	0,01	5.22x10 ⁻¹	0.82 [0.45–1.49]
	AA	0,06	4.44x10 ⁻¹	1.12 [0.84–1.50]
	GA	0,86	2.23x10 ⁻¹	0.89 [0.74–1.07]
	TG	0,05	2.87x10 ⁻¹	1.19 [0.86–1.64]
rs1000113-rs11747270	TA	0,02	4.08x10 ⁻¹	0.82 [0.51–1.31]
	CA	0,92	7.81x10 ⁻¹	0.96 [0.74–1.26]
	TT	0,07	1.35x10 ⁻¹	1.22 [0.94–1.58]
rs1000113-rs931058	CT	0,01	2.44x10 ⁻¹	0.71 [0.40–1.26]
	TA	0,02	9.43x10 ⁻¹	1.60 [0.92–2.77]
	CA	0,9	1.39x10 ⁻¹	0.85 [0.68–1.06]
	GT	0,04	4.96x10 ⁻¹	1.13 [0.79–1.61]
rs11747270-rs931058	AT	0,03	7.98x10 ⁻²	0.70 [0.47–1.04]
	GA	0,01	5.42x10 ⁻¹	1.21 [0.66–2.23]
	AA	0,91	6.87x10 ⁻¹	1.05 [0.83–1.33]
	CAT	0,08	2.83x10⁻²	1.31 [1.03–1.67]
rs13361189-rs4958847-rs1000113	TAC	0,04	3.94x10 ⁻¹	0.86 [0.61–1.22]
	TGC	0,87	1.30x10 ⁻¹	0.86 [0.71–1.05]
	CAG	0,06	1.97x10⁻²	1.40 [1.06–1.86]
rs13361189-rs4958847-rs11747270	CAA	0,03	4.42x10 ⁻¹	1.19 [0.76–1.85]
	TAA	0,04	3.61x10 ⁻¹	0.85 [0.60–1.20]
	TGA	0,87	1.58x10 ⁻¹	0.87 [0.72–1.06]

rs13361189-rs4958847-rs931058	CAT	0,07	1.47×10^{-1}	1.21 [0.94–1.57]
	TGT	0,01	4.73×10^{-1}	0.81 [0.45–1.45]
	CAA	0,02	3.48×10^{-2}	1.66 [1.04–2.66]
	TAA	0,04	3.78×10^{-1}	0.86 [0.61–1.21]
	TGA	0,86	2.10×10^{-1}	0.89 [0.74–1.07]
rs13361189-rs1000113-rs11747270	CTG	0,06	1.47×10^{-2}	1.44 [1.07–1.93]
	CTA	0,03	7.54×10^{-1}	1.07 [0.70–1.64]
	TCA	0,91	2.93×10^{-2}	0.78 [0.62–0.97]
rs13361189-rs1000113-rs931058	CTT	0,07	1.49×10^{-1}	1.21 [0.93–1.57]
	TCT	0,01	2.95×10^{-1}	0.73 [0.41–1.31]
	CTA	0,01	4.89×10^{-2}	1.76 [1.00–3.09]
	TCA	0,89	7.37×10^{-1}	0.82 [0.66–1.02]
	CGT	0,05	5.34×10^{-2}	1.37 [1.00–1.89]
	CAT	0,02	7.99×10^{-1}	0.94 [0.57–1.53]
	TAT	0,01	3.43×10^{-1}	0.75 [0.42–1.35]
	CGA	0,02	9.93×10^{-2}	1.62 [0.91–2.87]
	TAA	0,89	7.46×10^{-2}	0.82 [0.67–1.02]
	rs4958847-rs1000113-rs11747270	ATG	0,06	1.66×10^{-2}
ATA		0,03	8.65×10^{-1}	1.04 [0.66–1.63]
ACA		0,04	6.70×10^{-1}	0.93 [0.67–1.30]
GCA		0,87	1.88×10^{-1}	0.88 [0.72–1.07]
rs4958847-rs1000113-rs931058	ATT	0,07	1.34×10^{-1}	1.22 [0.94–1.58]
	GCT	0,01	3.35×10^{-1}	0.75 [0.41–1.35]
	ATA	0,02	9.36×10^{-2}	1.60 [0.92–2.77]
	ACA	0,04	7.23×10^{-1}	0.94 [0.69–1.30]
	GCA	0,86	2.94×10^{-1}	0.91 [0.75–1.09]
	AGT	0,05	4.87×10^{-2}	1.38 [1.00–1.90]
	AAT	0,02	5.87×10^{-1}	0.87 [0.53–1.44]
	GAT	0,01	4.64×10^{-1}	0.80 [0.44–1.45]
	AGA	0,01	3.39×10^{-1}	1.36 [0.72–2.55]
	AAA	0,04	7.02×10^{-1}	1.07 [0.76–1.51]
rs1000113-rs11747270-rs931058	GAA	0,86	2.59×10^{-1}	0.90 [0.75–1.08]
	TGT	0,05	4.38×10^{-2}	1.39 [1.01–1.91]
	TAT	0,02	7.83×10^{-1}	0.93 [0.57–1.53]
	CAT	0,01	2.51×10^{-1}	0.71 [0.40–1.27]
	TGA	0,01	1.51×10^{-1}	1.66 [0.83–3.32]
rs13361189-rs4958847-rs1000113-rs11747270	CAA	0,9	1.77×10^{-1}	0.86 [0.69–1.07]
	CATG	0,06	1.83×10^{-2}	1.42 [1.06–1.90]
	CATA	0,03	7.24×10^{-1}	1.08 [0.70–1.65]
	TACA	0,04	3.95×10^{-1}	0.86 [0.61–1.22]
rs13361189-rs4958847-rs1000113-rs931058	TGCA	0,87	1.69×10^{-1}	0.87 [0.72–1.06]
	CATT	0,07	1.45×10^{-1}	1.21 [0.94–1.56]
	TGCT	0,01	3.49×10^{-1}	0.76 [0.42–1.36]
	CATA	0,01	5.14×10^{-2}	1.75 [1.00–3.07]

Die Rolle des Autophagie-Gens IRGM bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

	TACA	0,04	3.93x10 ⁻¹	0.86 [0.61–1.22]
	TGCA	0,86	2.61x10 ⁻¹	0.90 [0.75–1.08]
	CAGT	0,05	6.44x10 ⁻²	1.35 [0.98–1.86]
	CAAT	0,02	7.99x10 ⁻¹	0.94 [0.57–1.54]
	TGAT	0,01	3.65x10 ⁻¹	0.76 [0.42–1.37]
	CAGA	0,01	1.35x10 ⁻¹	1.58 [0.87–2.88]
	TAAA	0,03	4.22x10 ⁻¹	0.87 [0.61–1.23]
	TGAA	0,86	2.62x10 ⁻¹	0.90 [0.75–1.08]
	CTGT	0,05	5.06x10 ⁻²	1.38 [1.00–1.91]
	CTAT	0,02	8.57x10 ⁻¹	0.96 [0.58–1.57]
	TCAT	0,01	2.87x10 ⁻¹	0.73 [0.41–1.31]
	CTGA	0,01	1.09x10 ⁻¹	1.78 [0.88–3.61]
	TCAA	0,89	9.46x10 ⁻²	0.83 [0.67–1.03]
rs4958847-rs1000113-rs11747270-rs931058	ATGT	0,05	4.74x10⁻²	1.39 [1.00–1.92]
	ATAT	0,02	8.13x10 ⁻¹	0.94 [0.57–1.55]
	GCAT	0,01	2.85x10 ⁻¹	0.73 [0.40–1.31]
	ATGA	0,01	1.58x10 ⁻¹	1.65 [0.82–3.31]
	ACAA	0,04	7.92x10 ⁻¹	0.96 [0.68–1.33]
	GCAA	0,86	3.15x10 ⁻¹	0.91 [0.76–1.09]
rs13361189-rs4958847-rs1000113-rs11747270-rs931058	CATGT	0,05	4.96x10⁻²	1.38 [1.00–1.90]
	CATAT	0,02	8.65x10 ⁻¹	0.96 [0.58–1.57]
	TGCAT	0,01	2.97x10 ⁻¹	0.73 [0.41–1.31]
	CATGA	0,01	1.07x10 ⁻¹	1.79 [0.88–3.64]
	TACAA	0,04	4.04x10 ⁻¹	0.86 [0.61–1.22]
	TGCAA	0,86	3.07x10 ⁻¹	0.91 [0.76–1.09]

Hinweis: p-Werte < 0.05 sind fett gedruckt (nicht korrigierte p-Werte). rs10065172, welches in Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 steht, wurde von der Epistasis-Analyse ausgeschlossen.

In Tabelle 12 zeigt sich, dass bei M. Crohn die stärksten Assoziationen bei Haplotypen gefunden wurden, die mindestens einen der am stärksten mit M. Crohn assoziierten SNPs (rs13361189 oder rs10065172) enthielten. Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen blieb allerdings keine dieser Assoziationen signifikant.

Tabelle 13: Haplotypen von *IRGM*-SNPs für die *C. ulcerosa*-Fall-Kontroll-Probe und Omnibus p-Werte für die Assoziation mit *C. ulcerosa*-Suszeptibilität.

Haplotypenkombination	Haplotyp	Haplotypen- frequenz	p-Wert	OR (95% KI)
rs13361189-rs4958847	CA	0,09	4.14×10^{-1}	1.15 [0.82–1.61]
	TA	0,04	9.62×10^{-2}	0.62 [0.35–1.09]
	TG	0,87	7.46×10^{-1}	1.05 [0.78–1.41]
rs13361189-rs1000113	CT	0,09	5.73×10^{-1}	1.10 [0.79–1.53]
	TC	0,91	5.13×10^{-1}	0.90 [0.65–1.24]
rs13361189-rs11747270	CG	0,06	5.83×10^{-2}	1.45 [0.99–2.13]
	CA	0,02	8.69×10^{-2}	0.49 [0.22–1.11]
	TA	0,92	5.96×10^{-1}	0.91 [0.64–1.29]
rs13361189-rs931058	CT	0,07	5.37×10^{-1}	1.12 [0.78–1.60]
	TT	0,01	3.25×10^{-2}	0.11 [0.02–0.83]
	CA	0,02	6.69×10^{-1}	1.16 [0.59–2.29]
rs13361189-rs931058	TA	0,9	8.13×10^{-1}	1.04 [0.75–1.44]
	AT	0,09	6.51×10^{-1}	1.08 [0.77–1.51]
rs4958847-rs1000113	AC	0,04	2.69×10^{-1}	0.76 [0.46–1.24]
	GC	0,87	7.45×10^{-1}	1.05 [0.78–1.41]
	AG	0,06	6.10×10^{-2}	1.44 [0.98–2.11]
rs4958847-rs11747270	AA	0,06	3.21×10^{-2}	0.59 [0.36–0.96]
	GA	0,88	7.25×10^{-1}	1.06 [0.77–1.47]
	AT	0,07	6.10×10^{-1}	1.10 [0.76–1.59]
rs4958847-rs931058	GT	0,01	5.34×10^{-2}	0.24 [0.06–1.02]
	AA	0,06	3.50×10^{-1}	0.81 [0.52–1.26]
	GA	0,86	3.79×10^{-1}	1.13 [0.86–1.48]
rs1000113-rs11747270	TG	0,05	1.19×10^{-1}	1.38 [0.92–2.07]
	TA	0,02	4.25×10^{-2}	0.41 [0.17–0.97]
	CA	0,92	7.46×10^{-1}	0.94 [0.66–1.34]
rs1000113-rs931058	TT	0,07	6.54×10^{-1}	1.09 [0.75–1.59]
	CT	0,01	5.92×10^{-2}	0.32 [0.10–1.05]
	TA	0,02	9.62×10^{-1}	1.02 [0.45–2.30]
rs1000113-rs931058	CA	0,9	7.00×10^{-1}	1.07 [0.76–1.51]
	GT	0,04	6.56×10^{-2}	1.49 [0.97–2.28]
	AT	0,03	6.38×10^{-3}	0.34 [0.16–0.74]
rs1000113-rs931058	GA	0,01	9.28×10^{-1}	1.04 [1.45–2.42]
	AA	0,91	6.76×10^{-1}	1.08 [0.75–1.55]
	CAT	0,08	5.75×10^{-1}	1.10 [0.79–1.53]
rs13361189-rs4958847-rs1000113	TAC	0,04	1.15×10^{-1}	0.63 [0.36–1.12]
	TGC	0,87	7.18×10^{-1}	1.05 [0.81–1.37]
	CAG	0,06	4.77×10^{-2}	1.45 [1.00–2.09]
rs13361189-rs4958847-rs11747270	CAA	0,03	1.02×10^{-1}	0.52 [0.24–1.14]
	TAA	0,04	1.06×10^{-1}	0.63 [0.35–1.10]

Die Rolle des Autophagie-Gens IRGM bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

	TGA	0,87	6.83×10^{-1}	1.06 [0.80–1.40]
rs13361189-rs4958847-rs931058	CAT	0,07	5.34×10^{-1}	1.12 [0.78–1.60]
	TGT	0,01	4.54×10^{-2}	0.22 [0.05–0.97]
	CAA	0,02	6.01×10^{-1}	1.21 [0.59–2.47]
	TAA	0,04	1.02×10^{-1}	0.62 [0.35–1.10]
	TGA	0,86	3.22×10^{-1}	1.15 [0.87–1.52]
rs13361189-rs1000113-rs11747270	CTG	0,06	7.42×10^{-2}	1.42 [0.97–2.09]
	CTA	0,03	6.98×10^{-2}	0.47 [0.20–1.06]
	TCA	0,91	6.08×10^{-1}	0.92 [0.66–1.27]
rs13361189-rs1000113-rs931058	CTT	0,07	6.34×10^{-1}	1.09 [0.76–1.55]
	TCT	0,01	3.66×10^{-2}	0.21 [0.05–0.91]
	CTA	0,01	7.89×10^{-1}	1.13 [0.46–2.77]
	TCA	0,89	7.94×10^{-1}	1.04 [0.77–1.40]
	CGT	0,05	6.01×10^{-2}	1.48 [0.98–2.23]
	CAT	0,02	9.74×10^{-2}	0.48 [0.20–1.15]
	TAT	0,01	3.18×10^{-2}	0.14 [0.02–0.84]
	CGA	0,02	6.03×10^{-1}	1.25 [0.54–2.90]
	TAA	0,89	7.85×10^{-1}	1.04 [0.78–1.38]
rs4958847-rs1000113-rs11747270	ATG	0,06	8.39×10^{-2}	1.40 [0.96–2.05]
	ATA	0,03	6.18×10^{-2}	0.46 [0.20–1.04]
	ACA	0,04	1.22×10^{-1}	0.65 [0.37–1.12]
	GCA	0,87	6.59×10^{-1}	1.07 [0.79–1.44]
rs4958847-rs1000113-rs931058	ATT	0,07	6.42×10^{-1}	1.09 [0.76–1.57]
	GCT	0,01	3.92×10^{-2}	0.21 [0.05–0.93]
	ATA	0,02	9.58×10^{-1}	1.02 [0.49–2.14]
	ACA	0,04	2.31×10^{-1}	0.73 [0.44–1.22]
	GCA	0,86	3.15×10^{-1}	1.15 [0.88–1.51]
	AGT	0,05	6.18×10^{-2}	1.48 [0.98–2.23]
	AAT	0,02	5.21×10^{-2}	0.40 [0.16–1.01]
	GAT	0,01	4.83×10^{-2}	0.22 [0.05–0.99]
	AGA	0,01	6.52×10^{-1}	1.23 [0.50–3.02]
	AAA	0,04	1.87×10^{-1}	0.70 [0.41–1.19]
	GAA	0,86	3.10×10^{-1}	1.15 [0.88–1.51]
rs1000113-rs11747270-rs931058	TGT	0,05	8.45×10^{-2}	1.44 [0.95–2.18]
	TAT	0,02	6.59×10^{-2}	0.42 [0.17–1.06]
	CAT	0,01	3.44×10^{-2}	0.21 [0.05–0.89]
	TGA	0,01	7.36×10^{-1}	1.19 [0.43–3.27]
	CAA	0,9	7.21×10^{-1}	1.06 [0.77–1.46]
rs13361189-rs4958847-rs1000113-rs11747270	CATG	0,06	7.90×10^{-2}	1.41 [0.96–2.07]
	CATA	0,03	7.66×10^{-2}	0.47 [0.21–1.08]
	TACA	0,04	1.14×10^{-1}	0.63 [0.36–1.12]
	TGCA	0,87	6.60×10^{-1}	1.07 [0.79–1.45]
rs13361189-rs4958847-rs1000113-rs931058	CATT	0,07	6.27×10^{-1}	1.10 [0.75–1.62]
	TGCT	0,01	4.16×10^{-2}	0.22 [0.05–0.94]
	CATA	0,01	8.01×10^{-1}	1.12 [0.46–2.70]

	TACA	0,04	1.15×10^{-1}	0.63 [0.36–1.12]
	TGCA	0,86	2.93×10^{-1}	1.16 [0.88–1.53]
	CAGT	0,05	6.41×10^{-2}	1.47 [0.98–2.21]
	CAAT	0,02	7.22×10^{-2}	0.43 [0.17–1.08]
	TGAT	0,01	4.31×10^{-2}	0.23 [0.05–0.96]
	CAGA	0,01	4.84×10^{-1}	1.35 [0.58–3.13]
	TAAA	0,03	1.18×10^{-1}	0.63 [0.36–1.12]
	TGAA	0,86	2.98×10^{-1}	1.16 [0.88–1.53]
	CTGT	0,05	8.24×10^{-2}	1.45 [0.95–2.20]
	CTAT	0,02	7.52×10^{-2}	0.44 [0.17–1.09]
	TCAT	0,01	3.69×10^{-2}	0.21 [0.05–0.91]
	CTGA	0,01	6.42×10^{-1}	1.28 [0.45–3.63]
	TCAA	0,89	7.23×10^{-1}	1.06 [0.77–1.46]
rs4958847-rs1000113-rs11747270-rs931058	ATGT	0,05	8.41×10^{-2}	1.44 [0.95–2.18]
	ATAT	0,02	7.51×10^{-2}	0.44 [0.17–1.09]
	GCAT	0,01	3.55×10^{-2}	0.21 [0.05–0.90]
	ATGA	0,01	7.47×10^{-1}	1.19 [0.41–3.43]
	ACAA	0,04	1.43×10^{-1}	0.66 [0.38–1.15]
	GCAA	0,86	2.76×10^{-1}	1.17 [0.88–1.55]
rs13361189-rs4958847-rs1000113-rs11747270-rs931058	CATGT	0,05	7.90×10^{-2}	1.45 [0.96–2.19]
	CATAT	0,02	7.67×10^{-2}	0.44 [0.17–1.09]
	TGCAT	0,01	3.76×10^{-2}	0.21 [0.05–0.92]
	CATGA	0,01	6.37×10^{-1}	1.28 [0.46–3.57]
	TACAA	0,04	1.18×10^{-1}	0.64 [0.36–1.12]
	TGCAA	0,86	2.62×10^{-1}	1.17 [0.89–1.54]

Hinweis: p-Werte < 0.05 sind fett gedruckt (nicht korrigierte p-Werte). rs10065172, welches in Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 steht, wurde von der Epistasis-Analyse ausgeschlossen.

Wie Tabelle 13 zeigt, wurde bei *C. ulcerosa* die stärkste Assoziation bei rs11747270-rs931058 gefunden (Omnibus p-Wert 1.57×10^{-2}). Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen blieb auch hier keine Assoziation signifikant.

6.3 Genotyp-Phänotyp-Analyse

Wir untersuchten zusätzlich, ob *IRGM*-SNPs mit bestimmten phänotypischen Charakteristika bei Patienten mit CED assoziiert sind.

Basierend auf der Montreal-Klassifikation wurden die phänotypischen Daten der CED-Patienten anhand der anatomischen Lokalisation ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass die untersuchten *IRGM*-SNPs weder bei M. Crohn noch bei C. ulcerosa mit einer spezifischen Lokalisation der Erkrankung assoziiert waren, siehe Tabelle 14 und 15.

Tabelle 14: p-Werte für Allel-Assoziationen von *IRGM*-Genmarkern mit der anatomischen Lokalisation von M. Crohn entsprechend der Montreal-Klassifikation.

Anatomische Lokalisation	n	rs13361189	rs10065172	rs4958847	rs1000113	rs11747270	rs931058
L1 (Ileum)	113	7.87x10 ⁻¹	2.64x10 ⁻¹	6.93x10 ⁻¹	4.53x10 ⁻¹	9.90x10 ⁻¹	4.95x10 ⁻¹
L2 (Kolon)	98	9.17x10 ⁻¹	3.56x10 ⁻¹	3.83x10 ⁻¹	2.97x10 ⁻¹	3.90x10 ⁻¹	4.94x10 ⁻¹
L3 (Ileokolon)	550	9.90x10 ⁻¹	9.99x10 ⁻¹	8.88x10 ⁻¹	7.78x10 ⁻¹	6.71x10 ⁻¹	9.31x10 ⁻¹
Mitbeteiligung des Ileums (L1+L3)	648	8.22x10 ⁻¹	8.16x10 ⁻¹	6.03x10 ⁻¹	7.44x10 ⁻¹	6.17x10 ⁻¹	6.16x10 ⁻¹

In Tabelle 14 zeigt sich keine Assoziation der untersuchten *IRGM*-SNPs mit einer spezifischen Lokalisation des M. Crohn (Ileum, Kolon, Ileokolon, Mitbeteiligung des Ileums).

Tabelle 15: p-Werte für Allel-Assoziationen von *IRGM*-Genmarkern mit der anatomischen Lokalisation von *C. ulcerosa* entsprechend der Montreal-Klassifikation.

Anatomische Lokalisation	n	rs13361189	rs10065172	rs4958847	rs1000113	rs11747270	rs931058
E1 (ulzerierende Proktitis)	24	3.79x10 ⁻¹	4.34x10 ⁻¹	1.35x10 ⁻¹	2.98x10 ⁻¹	6.66x10 ⁻¹	8.74x10 ⁻²
E2 (linksseitige <i>C. ulcerosa</i>)	96	2.14x10 ⁻¹	2.07x10 ⁻¹	2.28x10 ⁻¹	2.16x10 ⁻¹	7.29x10 ⁻²	1.76x10 ⁻¹
E3 (Pankolitis)	140	1.87x10 ⁻¹	1.95x10 ⁻¹	1.01x10 ⁻¹	2.19x10 ⁻¹	1.12x10 ⁻¹	1.27x10 ⁻¹

Tabelle 15 zeigt, dass es keine Assoziation der untersuchten *IRGM*-SNPs mit einer spezifischen Lokalisation der *C. ulcerosa* (ulzerierende Proktitis, linksseitige *C. ulcerosa*, Pankolitis) gibt.

Zudem konnte eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse bei M. Crohn-Patienten hinsichtlich des exonischen, synonymen SNPs rs10065172=p.Leu105Leu, welches in Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 und dem zuvor identifizierten, *IRGM* direkt vorgeschalteten 20 kb Deletionspolymorphismus stand ($r^2=1.0$), keine signifikanten Assoziationen mit dem M. Crohn-Phänotyp aufzeigen, siehe Tabelle 16.

Tabelle 16: Genotyp-Phänotyp-Analyse des exonischen, synonymen SNP rs10065172=p.Leu105Leu.

rs10065172=p.Leu105Leu	(1) CC (n=650)	(2) CT (n=156)	(3) TT (n=8)	p-Wert	OR [95% KI]
Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Jahre)					
Durchschnitt ± SA	28.15 ± 11.87	26.98 ± 12.13	31.75 ± 19.07	0.067	1,42
Bereich (von - bis)	6-78	7-71	17-73		[0.98-2.07]
Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (n=727)					
<=16 Jahre (A1) (n=81)	65	16	0	0.998	1.00 [0.56-1.80] (A1 vs. A2)
17-40 Jahre (A2) (n=547)	439	102	6	0.406	1.28 [0.72-2.27] (A2 vs. A3)
> 40 Jahre (A3) (n=99)	83	14	2	0.531	1.28 [0.59-2.74]
Lokalisation (n=770)					
Terminales Ileum (L1) (n=113)	89	23	1	0.739	1.09 [0.67-1.77]
Kolon (L2) (n=98)	82	15	1	0.322	0.75 [0.43-1.32]
Ileokolon (L3) (n=549)	439	104	6	0.964	0.99 [0.67-1.46]
Oberer GIT (L4) (n=10)	7	3	0	0.436	1.72 [0.44-6.73]
Eigenschaften¹ (n=692)					
Nicht-strikurierend - Nicht-penetrierend (B1) (n=173)	138	34	1	0.955	1.01 [0.66-1.55]
Strikurierend (B2) (n=188)	144	42	2	0.189	1.31 [0.88-1.94]
Penetrierend (B3) (n=331)	268	59	4	0.524	0.89 [0.62-1.28]
Verwendung von Immunsuppressiva² (n=585)	Nein: 92	14	0		
	Ja: 385	88	6	0.126	1.60 [0.88-2.94]
OP aufgrund von M. Crohn³ (n=723)	Nein: 253	60	2		
	Ja: 327	75	6	0.955	1.01 [0.70-1.46]
Fisteln (n=737)	Nein: 274	73	3		
	Ja: 315	67	5	0.293	0.82 [0.57-1.18]
Stenosen (n=739)	Nein: 214	45	2		
	Ja: 377	95	6	0.311	1.22 [0.83-1.79]

Hinweis: rs10065172=p.Leu105Leu. steht in perfektem Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 und dem zuvor identifizierten, *IRGM* direkt vorgeschalteten 20 kb Deletionspolymorphismus ($r^2=1.0$) und ist somit ein „Proxy“ für diese beiden anderen *IRGM*-SNPs. p-Wert für das Testen von Unterschieden zwischen Trägern und Nicht-Trägern des T-Allels. ORT: Korrespondierende Odds ratios und 95% Konfidenzintervalle (95% KI). Für das Alter bei Diagnosestellung sind die p-Werte basierend auf einem Mediansplit angegeben.

¹ Krankheitseigenschaften wurden anhand der Montreal-Klassifikation definiert. Ein strikurierender Krankheitsphänotyp wurde durch die Anwesenheit einer Stenose ohne penetrierende Erkrankung definiert. Die Diagnose einer Stenose erfolgte operativ, endoskopisch, oder radiologisch (mittels MR-Enteroklysma).

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

³ Lediglich mit M. Crohn-spezifischen Problemen verbundene Operationen (z.B. Fistelektomie, Kolektomie, Ileostomie) wurden eingeschlossen.

Tabelle 16 zeigt, dass es keine signifikanten Assoziationen mit dem M. Crohn-Phänotyp hinsichtlich des exonischen, synonymen SNPs rs10065172=p.Leu105Leu gab; hierbei wurde M. Crohn nach der Montreal-Klassifikation anhand von Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Lokalisation und Eigenschaften (im Sinne von strikturierend vs. nicht-strikturierend, penetrierend vs. nicht-penetrierend), klassifiziert; aber auch die Verwendung von Immunsuppressiva, mit M. Crohn-spezifischen Problemen verbundene Operationen, Fisteln und Stenosen wurden als Phänotyp-Charakteristika verwendet.

6.4 Epistasis-Analyse

Als Nächstes analysierten wir potentielle Gen-Gen-Interaktionen zwischen *IRGM*-Varianten und anderen M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen, wie Varianten im *NOD2*-, *IL23R*- und *ATG16L1*-Gen einschließlich deren Effekt auf die Suszeptibilität für M. Crohn.

Interessanterweise konnte hierbei eine schwache Gen-Gen-Interaktion zwischen einigen SNPs der beiden Autophagie-Gene *IRGM* und *ATG16L1* gezeigt werden (*ATG16L1* rs12471449, *ATG16L1* rs1441090, *ATG16L1* rs4663396), allerdings waren dies schwache Assoziationen, die nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant waren, siehe Tabelle 17.

Tabelle 17: Analyse von Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis) für *IRGM*- mit *NOD2*-, *ATG16L1*- und *IL23R*-Genvarianten hinsichtlich M. Crohn-Suszeptibilität.

	rs13361189	rs4958847	rs1000113	rs11747270	rs931058
<i>NOD2</i> rs2066844=p.Arg702Trp	8.10 x 10 ⁻¹	5.00 x 10 ⁻¹	8.75 x 10 ⁻¹	8.24 x 10 ⁻¹	7.87 x 10 ⁻¹
<i>NOD2</i> rs2066845=p.Gly908Arg	2.07 x 10 ⁻¹	2.37 x 10 ⁻¹	1.55 x 10 ⁻¹	5.97 x 10 ⁻¹	4.33 x 10 ⁻¹
<i>NOD2</i> rs2066847=p.Leu1007fsX1008	9.43 x 10 ⁻¹	9.70 x 10 ⁻¹	9.72 x 10 ⁻¹	6.26 x 10 ⁻¹	8.65 x 10 ⁻¹
<i>ATG16L1</i> rs13412102	4.14 x 10 ⁻¹	3.40 x 10 ⁻¹	6.24 x 10 ⁻¹	7.41 x 10 ⁻¹	4.57 x 10 ⁻¹
<i>ATG16L1</i> rs12471449	2.00 x 10⁻²	6.09 x 10 ⁻²	2.01 x 10⁻²	1.11 x 10 ⁻¹	5.41 x 10⁻³
<i>ATG16L1</i> rs6431660	8.53 x 10 ⁻¹	8.42 x 10 ⁻¹	8.38 x 10 ⁻¹	4.77 x 10 ⁻¹	7.64 x 10 ⁻¹
<i>ATG16L1</i> rs1441090	1.27 x 10 ⁻¹	6.74 x 10 ⁻¹	4.45 x 10⁻²	1.35 x 10 ⁻¹	2.85 x 10⁻⁰
<i>ATG16L1</i> rs2289472	9.53 x 10 ⁻¹	6.58 x 10 ⁻¹	8.63 x 10 ⁻¹	5.34 x 10 ⁻¹	6.79 x 10 ⁻¹
<i>ATG16L1</i> rs2241880	6.15 x 10 ⁻¹	5.88 x 10 ⁻¹	6.01 x 10 ⁻¹	4.72 x 10 ⁻¹	9.62 x 10 ⁻¹
<i>ATG16L1</i> rs2241879	9.24 x 10 ⁻¹	7.94 x 10 ⁻¹	9.71 x 10 ⁻¹	6.19 x 10 ⁻¹	7.13 x 10 ⁻¹
<i>ATG16L1</i> rs3792106	7.19 x 10 ⁻¹	9.08 x 10 ⁻¹	5.54 x 10 ⁻¹	4.53 x 10 ⁻¹	9.29 x 10 ⁻¹
<i>ATG16L1</i> rs4663396	1.19 x 10⁻²	2.89 x 10⁻³	1.91 x 10⁻²	1.94 x 10 ⁻¹	2.16 x 10⁻²
<i>IL23R</i> rs1004819	6.75 x 10 ⁻¹	2.61 x 10 ⁻¹	5.01 x 10 ⁻¹	7.05 x 10 ⁻¹	6.52 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs7517847	1.36 x 10 ⁻¹	3.36 x 10 ⁻¹	1.33 x 10 ⁻¹	4.30 x 10 ⁻¹	8.05 x 10 ⁻²
<i>IL23R</i> rs10489629	6.60 x 10 ⁻¹	9.74 x 10 ⁻¹	9.49 x 10 ⁻¹	8.73 x 10 ⁻²	2.74 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs2201841	2.66 x 10 ⁻¹	5.59 x 10 ⁻²	8.60 x 10 ⁻²	5.72 x 10 ⁻²	2.54 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs11465804	6.04 x 10 ⁻²	1.09 x 10 ⁻¹	1.98 x 10 ⁻¹	9.85 x 10 ⁻¹	1.76 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs11209026=p.Arg381Gln	1.93 x 10 ⁻¹	1.62 x 10 ⁻¹	3.92 x 10 ⁻¹	6.84 x 10 ⁻¹	2.60 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs1343151	7.70 x 10 ⁻¹	3.64 x 10 ⁻¹	9.57 x 10 ⁻¹	3.71 x 10 ⁻¹	9.69 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs10889677	1.63 x 10 ⁻¹	3.56 x 10⁻²	6.47 x 10 ⁻²	3.27 x 10⁻²	1.79 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs11209032	2.66 x 10 ⁻¹	1.80 x 10 ⁻¹	1.92 x 10 ⁻¹	8.23 x 10 ⁻²	2.84 x 10 ⁻¹
<i>IL23R</i> rs1495965	8.54 x 10 ⁻¹	4.66 x 10 ⁻¹	6.00 x 10 ⁻¹	1.79 x 10 ⁻¹	9.86 x 10 ⁻¹

Hinweis: p-Werte für Epistasis zwischen *NOD2*- und *ATG16L1*-SNPs und *IRGM*-SNPs in der M. Crohn-Fall-Kontroll-Probe. p-Werte <0.05 sind fett gedruckt. rs10065172, welches in Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 steht, wurde von der Epistasis-Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 17 zeigt eine schwache Gen-Gen-Interaktion zwischen einigen SNPs der beiden Autophagie-Gene *IRGM* und *ATG16L1*, allerdings blieb keine der fett gedruckten Assoziationen nach Bonferroni-Korrektur signifikant.

Im Gegensatz dazu gab es keinerlei Epistasis zwischen *IRGM* und den anderen beiden Haupt-Suszeptibilitätsgenen für M. Crohn, *NOD2* und *IL23R*.

Die Odds Ratios der Gen-Gen-Interaktionen, welche vor Bonferroni-Korrektur signifikant waren, sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Odds ratios (OR) und 95% KI für die Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis), welche signifikant hinsichtlich einer Suszeptibilität für M. Crohn waren (vor Bonferroni-Korrektur; siehe Tabelle 17).

	rs13361189	rs10065172	rs4958847	rs1000113	rs11747270	rs931058
<i>ATG16L1</i>						
rs12471449	1.87 [1.10-3.17]	1.92 [1.12-3.30]	n.s.	1.91 [1.11-3.29]	n.s.	2.21 [1.26-3.87]
<i>ATG16L1</i>						
rs1441090	n.s.	n.s.	n.s.	2.35 [1.02-5.39]	n.s.	2.42 [2.00-5.33]
<i>ATG16L1</i>						
rs4663396	1.80 [1.14-2.83]	1.76 [1.11-2.78]	1.81 [1.22-2.66]	1.76 [1.10-2.82]	n.s.	1.75 [1.09-2.81]
<i>IL23R</i>						
rs10889677	n.s.	n.s.	0.72 [0.54-0.98]	n.s.	0.58 [0.35-0.96]	n.s.

Hinweis: rs10065172, welches in Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 steht, wurde von der Epistasis-Analyse ausgeschlossen.

n.s.: nicht-signifikante Interaktionen (nicht dargestellt)

Nach Bonferroni-Korrektur konnte keinerlei Signifikanz mehr für sämtliche in Tabelle 18 dargestellten Gen-Gen-Interaktionen aufgezeigt werden.

7 Diskussion

7.1 Aktuelles Verständnis der Pathogenese von CED

Die Pathogenese von M. Crohn und C. ulcerosa bleibt weiterhin komplex und ist auch heute nicht vollständig geklärt. Mittlerweile unumstritten jedoch ist die Rolle von intestinaler Mikrobiota bei der Entstehung von CED, sodass sich der Forschungsfokus von der erworbenen Immunität zur angeborenen Immunität verschoben hat. (Gersemann et al., 2011)

Bei der Entstehung und Pathogenese von CED kommt der dynamischen Balance zwischen Mikroorganismen, insbesondere der kommensalen Flora, und den Abwehrmechanismen der Mukosabarriere eine zentrale Rolle zu. So konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Antibiotika bei einem Teil der CED-Patienten einen therapeutischen Nutzen erzielen konnte; außerdem gibt es Hinweise, dass sog. „gesunde Bakterien“ oder Probiotika zu einer Besserung der CED führen können. (Gionchetti et al., 2003; Sutherland et al., 1991; Xavier & Podolsky, 2007). Bei Patienten mit CED wird zudem eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen häufiger beobachtete Kontamination der Darmwand mit am Epithel anhaftenden oder eindringenden Bakterienstämmen beschrieben, und dieses Auftreten ungewöhnlicher und potentiell pathogener Keime auf eine fehlerhafte Barrierefunktion der Mukosa zurückgeführt. (Xavier & Podolsky, 2007) Die Bedeutung der intestinalen Mikrobiota konnte anhand von tierexperimentellen Studien untermauert werden, in denen gezeigt wurde, dass eine „spontan“ auftretende chronische Kolitis vollständig von der Anwesenheit einer luminalen Flora abhängig ist. Wenn der gnotobiotische Status der verwendeten Mäuse erhalten blieb, so konnte keine Kolitis beobachtet werden; wurden die Mäuse allerdings Bakterien ausgesetzt, die als normale Bestandteile der intestinalen Mikrobiota betrachtet werden, so kam es rasch zu einer Entzündung. (Elson et al., 2005; Onderdonk et al., 1977) Es lässt sich hieraus schlussfolgern, dass vielmehr die Art der Abwehrmechanismen als weniger die biologischen Eigenschaften

einer luminalen Bakterienspezies per se das Ergebnis dieser Interaktion bestimmen. (Xavier & Podolsky, 2007)

Zum Erhalt der immunologischen Homöostase im Darm tragen folgende Faktoren im Sinne von immunologischen Mechanismen zur Abwehr von Mikroorganismen bei: die Produktion bestimmter antimikrobieller Peptide (insbesondere Defensine) durch die an der Basis der Lieberkühn'schen Krypten im Dünndarm gelegenen Panethschen Körnerzellen, die Schleimproduktion durch die Becherzellen, sowie die durch sekretorisches Immunglobulin A (IgA) kontrollierte mikrobielle Anlagerung und Invasion. (Abraham & Medzhitov, 2011; Ayabe et al., 2000; Vandenbroucke et al., 2013) Noch ist nicht klar, ob diese und weitere Mechanismen gleichermaßen alle bakteriellen und viralen Spezies betreffen oder ob es einen höheren Grad an Spezialisierung in der Immunantwort gibt, die es erlaubt, durch die Abwehrmechanismen die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota selbstständig zu kontrollieren. (Abraham & Medzhitov, 2011) Die Abbildung 23 stellt die CED als Endergebnis einer fehlregulierten mukosalen Immunantwort auf normale kommensale Darmbakterien in einem genetisch suszeptiblen Organismus dar. (Blumberg, 2009)

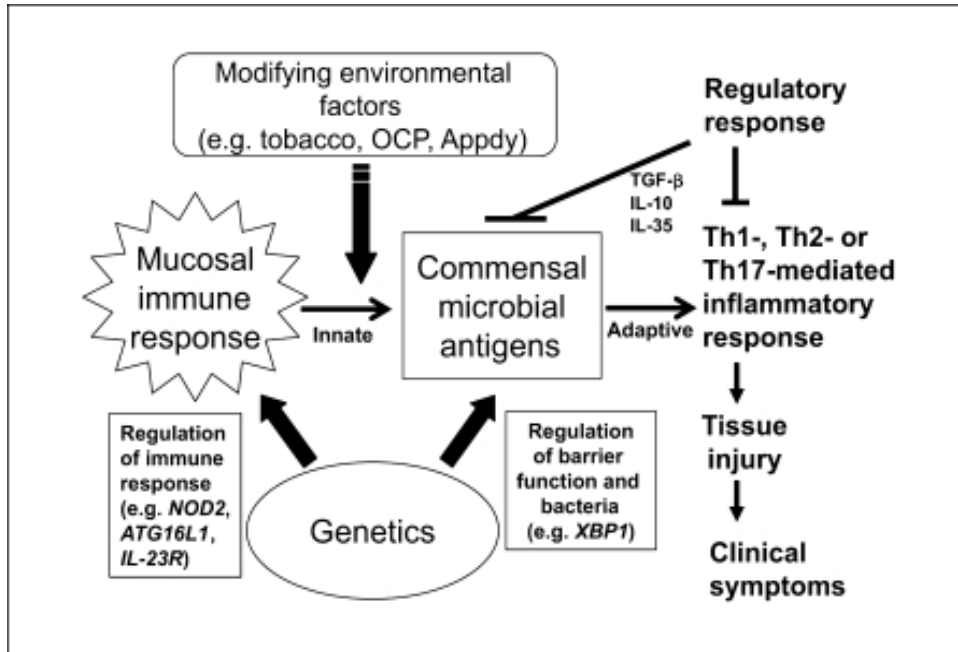


Abbildung 23: Fehlregulation der mukosalen Immunantwort. (Blumberg, 2009, p. 456)

(Abk. OCP von engl. *oral contraceptive pills*, Abk. Appdy von engl. *appendectomy*) (Blumberg, 2009)

Genetisch basiert diese Erkrankung auf Faktoren, welche ihrerseits sowohl die Komponenten der angeborenen und erworbenen Immunantworten (z.B. NOD2 als Oberflächen-Erkennungsrezeptor, ATG16L1 im Rahmen der Autophagie, sowie IL-23R bei der Differenzierung der Th17-Lymphozyten, siehe Abbildung 24), die Barrierefunktion der intestinalen Epithelzellen, sowie die Zusammensetzung der normalen mikrobiellen Flora an sich im Darm regulieren. (Blumberg, 2009; Johan Van Limbergen et al., 2009)

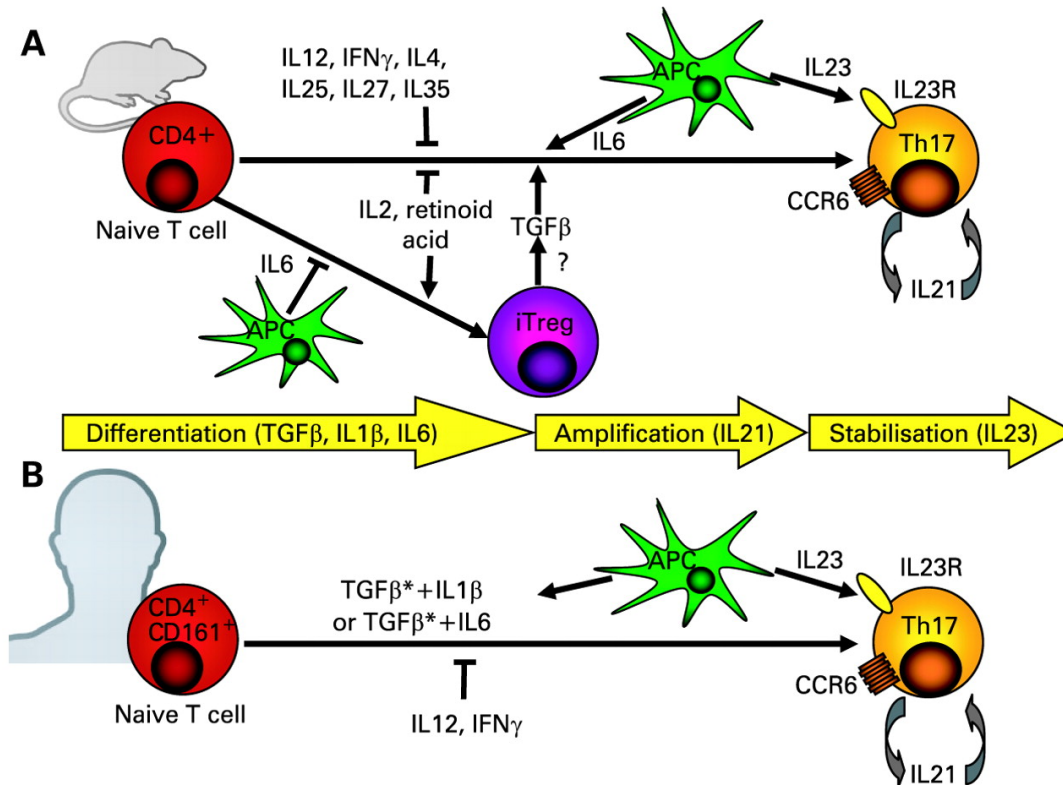


Abbildung 24: Th17-Zell-Differenzierung bei der Maus und beim Menschen. (Brand, 2009, p. 1156)

- (A) Murine Th17-Zellen entstehen aus nativen CD4⁺-T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β (welches wahrscheinlich aus sog. iTregs abgesondert wird) und IL-6 (durch sog. APCs abgesondert). (Abk. iTreg von engl. *induced regulatory t cells*, Abk. APC von engl. *antigen-presenting cell*) Ihre Entwicklung wird dann durch IL-21 verstärkt und durch IL-23 stabilisiert. Th17-Zellen sezernieren und sprechen auf IL-21 auf autokrine Weise an. IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-25, IL-27, IL-35 und Retinsäure inhibieren die Entwicklung der murinen Th17-Zellen, während umgekehrt die Anwesenheit von TGF- β und Retinsäure oder IL-2 die Entwicklung toleranter, antiinflammatorischer iTregs begünstigt.
- (B) Die Entstehung humaner Th17-Zellen scheint eine Folge der kombinierten Aktivität von IL-1 β und IL-6, bzw. von IL-1 β oder IL-6 alleine, zu sein, während für die kombinierte Aktivität von IL-1 β und IL-23 kein additiver oder synergistischer Effekt gezeigt werden konnte. Die Zugabe von TGF- β (*) zu humanen naiven oder Gedächtnis-CD4⁺-T-Zellen inhibierte die Entwicklung humaner TH17-Zellen in einigen früheren Studien. (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Evans et al., 2007; Wilson et al., 2007) Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass TGF- β in Kombination mit IL-1 β , IL-6 oder IL-21 die Differenzierung humaner Th17-Zellen induziert. (Manel et al., 2008; Yang et al., 2008) Dies deutet darauf hin, dass es wahrscheinlich keine großen Unterschiede in der Differenzierung muriner und humaner Th17-Zellen gibt. Ähnlich wie bei murinen Th17-Zellen, amplifizieren und stabilisieren IL-21 und IL-23 die Entwicklung humaner Th17-Zellen. IL-23R und CCR6 sind Oberflächenmerkmale der Th17-Zellen. (Brand, 2009)

Zu diesen an der Homöostase beteiligten Genen gehört außerdem XBP1, das für das X-box binding protein 1 kodiert, welches für den Erhalt der Integrität der Epithelzellbarriere verantwortlich ist. (Johan Van Limbergen et al., 2009)

Ein dieses Gen betreffender Defekt führt im Mausmodell zur spontanen Enteritis, was die entscheidende Rolle der Epithelzelle in der Pathogenese dieser Erkrankung verdeutlicht. (Kaser & Tilg, 2009)

Diese genetisch determinierte Anfälligkeit für die Entwicklung einer CED wird weiterhin modifiziert durch eine Vielzahl an Umweltfaktoren, zu denen Tabak, orale Kontrazeptiva (Abk. OCP von engl. *oral contraceptive pills*) und die Appendektomie (Abk. Appdy von engl. *appendectomy*) gehören. (Blumberg, 2009) Generell wird der Appendektomie hinsichtlich der *C. ulcerosa* ein protektiver Effekt zugerechnet, während sie als Risikofaktor für die Entwicklung eines *M. Crohn* gilt. Der hier zugrundeliegende Mechanismus ist noch unklar. Manche Hypothesen schlagen eine veränderte mukosale Immunantwort mit konsekutiver Appendizitis vor; hingegen könnte genau diese wiederum nach erfolgter Appendektomie negative Auswirkungen auf die Pathogenese einer *C. ulcerosa* haben. (Koutroubakis et al., 2002; Mizoguchi et al., 1996; Ng et al., 2013) Die Appendix selbst könnte zudem als Reservoir für Darmbakterien dienen, welche an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Diese wiederum reguliert die immunologische Antwort auf kommensale Darmbakterien. (Koutroubakis et al., 2002; Ng et al., 2013; Roblin et al., 2012) Dem Rauchen wird ebenfalls ein negativer Effekt hinsichtlich der Entwicklung eines *M. Crohn* zugesprochen (Birrenbach & Böcker, 2004; Higuchi et al., 2012; Lakatos et al., 2007), während es gegenüber der *C. ulcerosa* einen protektiven Effekt zu haben scheint. (Ananthkrishnan, 2013; Cosnes, 2004; Higuchi et al., 2012; Lakatos et al., 2007)

Man geht davon aus, dass diese Umweltfaktoren in der Lage sind, einen Einfluss sowohl auf die Immunantwort des Wirtsorganismus, die physiologischen Funktionen der intestinalen Epithelzellbarriere sowie vermutlich die Zusammensetzung und Funktion der mikrobiellen Flora zu nehmen. Maßgeblicher Faktor für die Entwicklung

einer CED ist also die genetisch definierte, angeborene immunologische Ansprechempfindlichkeit des Darmgewebes auf Bestandteile kommensaler Darmbakterien. Einmal ausgelöst, läuft die Erkrankung auf eine gemeinsame Endstrecke zu, die sich durch eine überschießende erworbene Immunreaktion auszeichnet. Charakterisiert ist diese durch die Eigenschaften aggressiver T- und B-Zellen durch deren Produktion von IgG-Antikörpern, die den Zustand einer chronischen Inflammation antreiben. (Blumberg, 2009) Wichtige Mediatoren der Inflammation beim M. Crohn sind hierbei Th1- und Th17-Zellen; die Inflammation bei C. ulcerosa ist überwiegend Th2-vermittelt, wird aber vermutlich ebenfalls durch Th17-Zellen moduliert. (Brand, 2009)

Trotz vieler Gemeinsamkeiten lassen sich zwischen M. Crohn und C. ulcerosa hinsichtlich Lokalisation, Histologie, endoskopischem und klinischem Erscheinungsbild Unterscheidungen machen; beispielsweise kommt es in ca. 50% der Fälle bei M. Crohn zu Komplikationen im Sinne von Penetrationen und Strikturen, diese treten bei C. ulcerosa nur sehr selten auf. Diese Verschiedenheit lässt vermuten, dass auch die zugrundeliegende Pathophysiologie Unterschiede aufweist. (Ellinghaus et al., 2014; Waterman et al., 2011) Genetische Risikofaktoren spielen hierbei eine große Rolle; inzwischen konnten für 163 Suszeptibilitätsloci eine Assoziation mit M. Crohn und C. ulcerosa nachgewiesen werden. Für M. Crohn konnte diese wichtige Rolle der Gene bei der Krankheitsentstehung bisher klarer dokumentiert werden als für C. ulcerosa. (Ellinghaus et al., 2014)

7.2 Analyse von *IRGM*-Genvarianten bzgl. der M. Crohn-Suszeptibilität

Unsere Studie repräsentiert eine detaillierte Analyse der Rolle von *IRGM* bei der Suszeptibilität für CED in einer großen deutschen Kohorte, welche über 2000 Individuen europäischer Abstammung umfasst. Gemäß vorangegangener GWAS und Replikationsstudien (Amre et al., 2009; Fisher et al., 2008; Palomino-Morales et al., 2009; Parkes et al., 2007; Roberts et al., 2008; The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007; J Van Limbergen et al., 2009; Weersma et al., 2009), bestätigen

unsere Ergebnisse, dass die *IRGM*-Variante rs13361189 mit einer Suszeptibilität für M. Crohn assoziiert ist.

Eine detaillierte funktionelle Studie identifizierte einen dem *IRGM*-Locus direkt vorgeschalteten Deletionspolymorphismus als potentiell verantwortlichen SNP, um eine M. Crohn-Assoziation an diesem Locus zu erklären (McCarroll et al., 2008), da dieser das gewebespezifische Expressionsniveau von *IRGM* beeinflusst. (Huett et al., 2009) Dieser 20 kb Deletionspolymorphismus steht in perfektem Kopplungsungleichgewicht ($r^2=1.0$) zu SNP rs13361189, und impliziert somit, dass rs13361189 als „Proxy“ für diesen Deletionspolymorphismus dient.

Ähnlich wie in der Studie von McCarroll et al. beschrieben (2008), zeigen wir, dass der gemeinsame, exonische, synonyme SNP rs10065172=p.Leu105Leu in Kopplungsungleichgewicht zu rs13361189 steht und demnach ebenfalls zu dem vorher identifizierten 20 kb Deletionspolymorphismus. Der exonische SNP rs10065172 (c.313C>T) wurde zuvor aufgrund des Ausbleibens einer Alteration der *IRGM*-Proteinsequenz oder dessen Spleißstellen als nicht ursächlich klassifiziert, wobei diese Ansicht durch die Ergebnisse einer sehr aktuellen Studie in Frage gestellt wird. (Brest, Lapaquette, Souidi, et al., 2011) Die Studie von Brest et al. demonstrierte, dass eine Familie von microRNAs, miR-196, im entzündeten intestinalen Epithel von M. Crohn-Patienten überexprimiert wird und die protektive *IRGM*-Variante (c.313C), nicht aber das M. Crohn-assoziierte Allel (c.313T) hinabreguliert. (Brest, Lapaquette, Souidi, et al., 2011) Die gleiche Studie konnte beweisen, dass der resultierende Verlust der engmaschigen Regulation der *IRGM*-Expression die Kontrolle der intrazellulären Replikation M. Crohn-assoziiierter *AIEC*, *adherent-invasive Escherichia coli*, kompromittiert, indem die Effektivität der bakteriellen Phagozytose (Xenophagie) beeinträchtigt wird. (Brest, Lapaquette, Souidi, et al., 2011) Demnach schlagen Brest et al. den synonymen SNP rs10065172 (c.313C>T) als mögliche kausale Variante vor. (Brest, Lapaquette, Souidi, et al., 2011)

Für rs10065172 konnte zudem eine Assoziation mit einer Suszeptibilität für Tuberkulose gezeigt werden (K. Y. King et al., 2011), was angesichts der vorliegenden Hinweise, dass bestimmte Mykobakterien eine Rolle in der Pathogenese von M. Crohn spielen könnten, von Interesse ist.

Darüber hinaus konnte eine funktionelle Studie zeigen, dass *IRGM* Autophagie induziert, um intrazelluläre Mykobakterien zu eliminieren. (Singh et al., 2006)

Insgesamt war das Signal für eine Assoziation von *IRGM* mit M. Crohn in unserer Studie erheblich schwächer als das, welches wir für das andere Autophagie-Gen, *ATG16L1*, in einer ähnlich großen Kohorte demonstrieren konnten. (Glas et al., 2008) Ähnlich hierzu zeigten auch die neuesten M. Crohn-Metaanalysen ein stärkeres Signal für eine Assoziation mit *ATG16L1* als mit *IRGM*. (Franke et al., 2010)

Im Gegensatz zu einer kürzlich durchgeführten spanischen Studie und einer Metaanalyse (Palomino-Morales et al., 2009), konnte unsere Untersuchung keine signifikante Assoziation für *IRGM*-Varianten mit einer Suszeptibilität für *C. ulcerosa* replizieren.

7.3 *IRGM*-Haplotypen-Analyse

Insgesamt waren mehrere *IRGM*-Haplotypen mit einer Suszeptibilität für M. Crohn und *C. ulcerosa* assoziiert. Bei M. Crohn wurden die stärksten Assoziationen bei Haplotypen gefunden, die mindestens einen der am stärksten mit M. Crohn assoziierten SNPs (rs13361189 oder rs10065172) enthielten. Hinsichtlich der großen Anzahl an untersuchten Haplotypen konnte jedoch keine dieser Assoziationen der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen standhalten.

Bei *C. ulcerosa* wurde die stärkste Assoziation bei rs11747270-rs931058 gefunden (Omnibus p-Wert 1.57×10^{-2}). Obwohl mehrere *IRGM*-Haplotypen formal signifikante Omnibus p-Werte für eine Assoziation mit *C. ulcerosa*-Suszeptibilität aufwiesen, verloren diese Assoziationen ebenfalls Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer Studie war *IRGM* kein *C. ulcerosa*-Hauptsuszeptibilitäts-gen in einer sehr aktuellen Metaanalyse. (Anderson et al., 2011)

Im Vergleich hierzu konnte eine Studie für einige seltene *pregnane X receptor*-(*PXR/NR1I2*)-Haplotypen eine hochgradige Assoziation mit *M. Crohn*-Suszeptibilität aufzeigen, mit Omnibus p-Werten bis zu 6.50×10^{-15} . (Glas, Seiderer, Fischer, et al., 2011) Auch für zahlreiche *NOD2*-Haplotypen konnten deutlich signifikantere Assoziationen mit *M. Crohn* herausgearbeitet werden, darunter einige Assoziationen mit Omnibus p-Werten unter 10^{-10} . Die stärkste Assoziation eines Haplotypen hatte hierbei den Omnibus p-Werten von 1.14×10^{-23} . (Glas, Seiderer, Tillack, et al., 2010)

7.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Des Weiteren führten wir eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse von *IRGM*-Varianten bei *M. Crohn*- und *C. ulcerosa*-Patienten durch. Im Gegensatz zu einer neueren Studie von Latiano et al. (2009), welche eine Assoziation von *IRGM*-Varianten mit dem Krankheitstyp des fistulierenden *M. Crohn* aufzeigen konnte, deckte unsere Genotyp-Phänotyp-Analyse keine signifikante Assoziation von *IRGM*-Varianten mit einem bestimmten *M. Crohn*-Phänotyp auf.

Ebenso gelang es uns nicht, eine Assoziation mit einem ilealen *M. Crohn*-Befall zu bestätigen, was in einer zuvor durchgeführten Studie für eine kleinere *M. Crohn*-Kohorte aus Neuseeland herausgefunden werden konnte. (Roberts et al., 2008)

Auch *M. Crohn*-assoziierte *NOD2*-Mutationen konnte gezeigt werden, dass sie im Falle von Homozygotie als starker Risikofaktor für ileale Stenosen gelten. (Jürgens, Brand, et al., 2010) Schon das Vorhandensein einer beliebigen Allelvariante des *NOD2*-Gens geht mit einem erhöhten Risiko eines komplizierenden Verlaufs einher; Ähnliches gilt für *JAK2*. Beide gelten als starke Prädiktoren für ilealen Befall und stenosierende Eigenschaften. (Cleynen et al., 2013)

Unsere Ergebnisse sind möglicherweise mit dem relativ schwachen Assoziationssignal, welches für *IRGM* in der deutschen *M. Crohn*-Kohorte gefunden

wurde, verbunden. Allerdings stimmen die Untersuchungsergebnisse dieser Genotyp-Phänotyp-Analyse mit dem Fehlen eines wohldefinierten Phänotyps bei M. Crohn-Patienten, welche Risikoallele des anderen Autophagie-Gens *ATG16L1* tragen, überein. (Glas et al., 2008)

7.5 Epistasis-Analyse für *IRGM* mit anderen M. Crohn-Hauptsuszeptibilitätsgenen

Die Identifikation der beiden M. Crohn-Hauptsuszeptibilitätsgene *ATG16L1* und *IRGM*, welche an der Autophagie beteiligt sind, hat signifikant die Bedeutung von Autophagie und bakterieller Xenophagie in der komplexen und multifaktoriellen Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bestärkt. Dennoch gibt es bisher keine detaillierten Untersuchungen zu potentiellen epistatischen Interaktionen zwischen *ATG16L1* und *IRGM*. Aus diesem Grunde analysierten wir die Epistasis zwischen diesen beiden Genen und konnten hierbei eine schwache Gen-Gen-Interaktion zwischen einigen SNPs der beiden Autophagie-Gene *IRGM* und *ATG16L1* aufzeigen, welche jedoch nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant blieb.

Angesichts deren enger funktionaler Verbindung ist dieses potentielle Epistasis-Signal hochinteressant und sollte in großen Metaanalysen weiter verfolgt werden. Diese Metaanalysen würden sehr große Patientenkohorten erforderlich machen und sind nur mittels großer multizentrischer Ansätze realisierbar, wie sie derzeit durch das „International IBD Genetics Consortium“ organisiert werden.

Es mehren sich die Hinweise, dass es wichtige Schnittstellen zwischen Autophagie und dem intrazellulären Erkennen von Bakterien in der Pathogenese von CED gibt, was anhand der Bedeutung von NOD2 bei der Induktion von Autophagie deutlich wird. (Cooney et al., 2010; Travassos et al., 2010)

Zudem konnten aktuelle Studien einen neuen Pfad identifizieren, welcher eng mit Autophagie und angeborener Immunität verbunden ist und durch eine „unfolded protein response“ (UPR) charakterisiert ist, welche durch Stresseinwirkung auf das

endoplasmatische Retikulum (ER) aufgrund einer Anreicherung fehlgefalteter Proteine getriggert wird.

Einige Gene, die an der Stresseinwirkung auf das ER beteiligt sind, einschließlich XBP1 und ORMDL3, sind mit der Pathogenese von CED auf genetischer Ebene in Verbindung gebracht worden. (Kaser et al., 2008; McGovern et al., 2010)

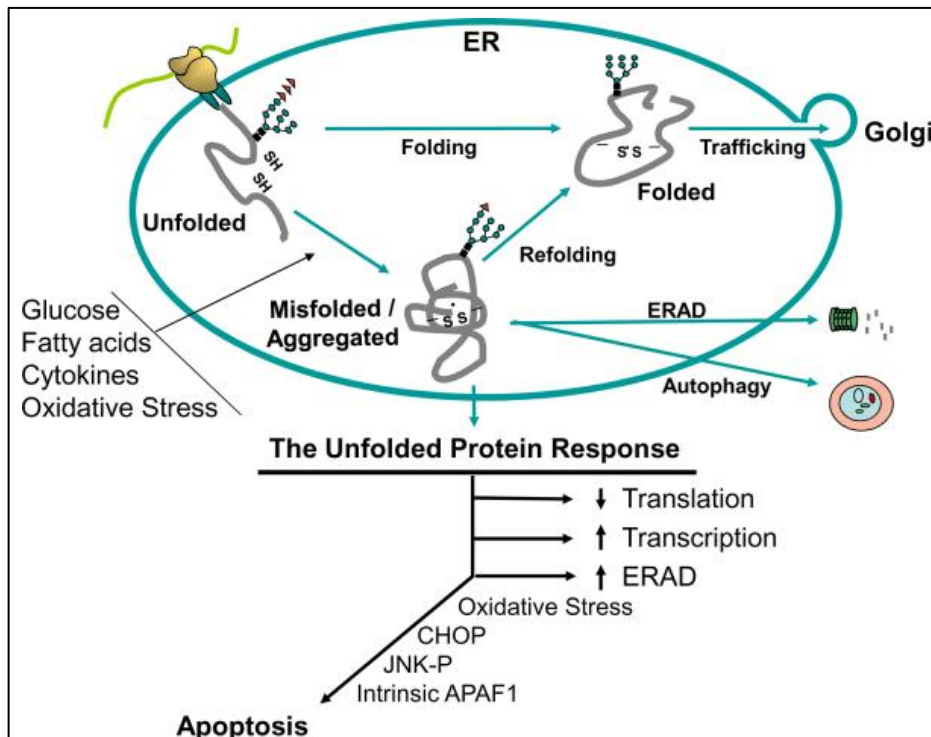


Abbildung 25: Wege, die zu fehlgefalteten Proteinen und Zelltod führen. (Kaufman et al., 2010, p. 100)

(Abk. APAF von engl. *apoptotic protease activating factor 1*)

Im Entstehen begriffene, ungefaltete Polypeptide dringen in das ER ein und interagieren mit Chaperonen und Katalysatoren der Proteinfaltung, um zu kompakten, thermodynamisch günstigen Strukturen heranzureifen. Ein Scheitern dieses Prozesses resultiert in der Persistenz fehlgefalteter Polypeptid-Chaperon-Komplexe oder Extraktion von löslichen, fehlgefalteten Proteinen aus dem ER und Abbau durch ERAD (Abk. ERAD von engl. *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*). Die Ausbildung von unlöslichen Proteinaggregaten erfordert Beseitigung mittels Autophagy. Stress-Stimuli auf das ER beeinträchtigen die Polypeptid-Faltung und führen zu einer angepassten Steigerung von Chaperonen und Katalysatoren innerhalb des ER-Lumens mittels UPR-Sensor-Aktivierung. Chronische oder überwältigende Stimuli rufen mehrere apoptotische Signale hervor, darunter oxidativer Stress, JNK-Aktivierung (Abk. JNK von engl. *c-Jun N-terminal kinases*), CHOP-Expression (Abk. CHOP von engl. *C/EBP-homologous protein*), Spaltung der Caspase 12, sowie Aktivierung des intrinsischen Mitochondrien-abhängigen Zelltod-Signalwegs. Zu physiologischen Stimuli, welche die UPR aktivieren können, zählen z.B. die Expression von

fehlgefaltetem Proinsulin oder IAPP (Abk. IAPP von engl. *islet amyloid polypeptide*) in der Beta-Zelle, oxidativer Stress (ROS), sowie erhöhte Konzentrationen von Glukose, Fettsäuren oder Zytokinen im Extrazellularraum. (Kaufman et al., 2010)

Interessanterweise konnte außerdem bewiesen werden, dass *ATG16L1*, *NOD2* und *XBPI* die Funktion der Panethschen Körnerzellen beeinflussen, was darauf hinweist, dass dieser Zelltyp eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer CED spielt. (Cadwell et al., 2008; Kaser et al., 2008; J Wehkamp et al., 2004)

Diese kürzlich gemachten Entdeckungen entsprechen der steigenden empirischen Beweislage, dass *NOD2* an der Autophagie-Regulation beteiligt ist. Für dendritische Zellen von Patienten mit M. Crohn, welche M. Crohn-assoziierte *NOD2*- oder *ATG16L1*-Varianten exprimieren, konnte gezeigt werden, dass sie bezüglich Induktion von Autophagie, Phagozytose von Bakterien und Antigenpräsentation fehlerhaft waren. (Cooney et al., 2010)

Besonders interessant ist, wie eine aktuelle Studie zeigen konnte, dass die intrazellulären Rezeptoren *NOD1* und *NOD2* für die autophagische Antwort auf invasive Bakterien eine kritische Rolle spielen, indem sie das Autophagie-Protein *ATG16L1* an die Plasmamembran der bakteriellen Eintrittsstelle rekrutieren. (Travassos et al., 2010)

In Zellen, die für die M. Crohn-assoziierte *NOD2*-Leserastermutation (p.Leu1007fsX1008) homozygot sind, war das mutierte *NOD2*-Gen nicht in der Lage, *ATG16L1* an die Plasmamembran zu rekrutieren, was somit die Umhüllung der eindringenden Bakterien durch Autophagosomen beeinträchtigte. (Travassos et al., 2010)

Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, als unsere Arbeitsgruppe bereits zuvor einen besonders schweren, strikturierenden Phänotyp bei M. Crohn-Patienten, welche homozygot für die *NOD2* p.Leu1007fsX1008-Mutation waren, beobachten konnte. Diese Mutation ist mit einem frühen Krankheitsbeginn, ilealer Stenosierung,

rezidivierendem Operationsbedarf und gesteigerter Prävalenz für entero-enterische Fisteln assoziiert. (Seiderer, Brand, et al., 2006; Seiderer, Schnitzler, et al., 2006)

Trotz der zentralen funktionalen Rolle von *NOD2* bei der Induktion von Autophagie-Prozessen, konnte unsere Studie keine Gen-Gen-Interaktionen bzgl. M. Crohn-Suszeptibilität zwischen *NOD2* und *IRGM* aufdecken.

Zudem konnten wir keine signifikanten Gen-Gen-Interaktionen zwischen *IRGM* und *IL23R*, dem wichtigsten an Th17-Antworten beteiligten CED-Suszeptibilitätsgen, identifizieren.

Eine sehr aktuelle Studie stellte interessanterweise *IL23R*-Varianten als Suszeptibilitäts-Varianten für Lepra vor und wies auf eine potentielle Beteiligung von *IL23R* an der Autophagozytose von Mykobakterien hin, welche an der Pathogenese von Lepra beteiligt sind. (Zhang et al., 2011)

8 Zusammenfassung

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) ist auch heute noch unvollständig verstanden. Neben Umweltfaktoren wie eine Dysbiose der intestinalen Mikrobiota tragen insbesondere bestimmte Risikogene zur Fehlregulation der Immunantwort bei CED bei. Insbesondere die Autophagie scheint bei M. Crohn-Patienten dysreguliert zu sein. Aus diesem Grund untersuchten wir das Autophagie-Gen *IRGM* mit folgenden Zielen:

- 1.) Nachweis einer Suszeptibilität der *IRGM*-Genvarianten für M. Crohn und *C. ulcerosa*.
- 2.) Untersuchung der Rolle von *IRGM*-Haplotypen hinsichtlich M. Crohn- und *C. ulcerosa*-Suszeptibilität.
- 3.) Charakterisierung der phänotypischen Auswirkungen.
- 4.) Analyse hinsichtlich einer möglichen Epistasie von *IRGM* mit den drei Hauptsuszeptibilitätsgenen für M. Crohn, *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*.

Wir analysierten daher genomische DNA von insgesamt 2060 Individuen, darunter 817 Patienten mit M. Crohn, 282 Patienten mit *C. ulcerosa* und 961 gesunde, unverwandte Kontrollen (alle europäischer Abstammung, „caucasian“) hinsichtlich 6 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in dem Autophagie-Gen *IRGM* (rs13361189, rs10065172=p.Leu105Leu, rs4958847, rs1000113, rs931058 und rs11747270). Dies erfolgte mittels DNA-Extraktion, photometrischer Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren, Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Genotypisierung in insgesamt 12360 Einzel-PCR-Reaktionen mit anschließender Schmelzkurvenanalyse. Die Auswahl der SNPs erfolgte auf der Grundlage von publizierten Vergleichsstudien anderer Kohorten.

Unsere Analyse konnte eine Assoziation der *IRGM*-SNPs rs13361189 ($p=0.02$, OR 1.31 [95 % CI 1.05-1.65]), rs10065172=p.Leu105Leu ($p=0.016$, OR 1.33 [95 % CI 1.06-1.66]) und rs1000113 ($p=0.047$, OR 1.27 [95 % CI 1.01-1.61]) mit einer Suszeptibilität für M. Crohn aufdecken, allerdings bestand zwischen diesen drei *IRGM*-SNPs Kopplungsungleichgewicht.

Hinsichtlich der *C. ulcerosa* waren keine der untersuchten *IRGM*-SNPs, allerdings einige *IRGM*-Haplotypen schwach mit einer *C. ulcerosa*-Suszeptibilität assoziiert ($p<0.05$), allerdings unterlagen diese Assoziationen der Bonferroni-Korrektur.

Die Genotyp-Phänotyp-Analyse konnte keine signifikanten Assoziationen mit einem spezifischen CED-Phänotyp oder ilealer M. Crohn-Beteiligung aufdecken.

Es gab Beweise für schwache Gen-Gen-Interaktionen zwischen einigen SNPs der Autophagie-Gene *IRGM* und *ATG16L1* ($p<0.05$), welche jedoch ebenfalls nach Bonferroni-Korrektur ihre Signifikanz verloren.

Die stärksten Assoziationssignale für M. Crohn-Suszeptibilität wurden für rs13361189 (ein SNP, welcher als „Proxy“ für einen gemeinsamen, *IRGM* vorgeschalteten 20 kb Deletionspolymorphismus dient), sowie für den exonischen, synonymen SNP rs10065172=p.Leu105Leu gefunden, womit vorangegangene funktionelle Studien bekräftigt werden, dass diese beiden SNPs die möglichen kausalen Varianten darstellen.

Zusammenfassend bestätigen unsere Ergebnisse *IRGM* als Suszeptibilitätsgen für M. Crohn in der deutschen Population, wobei wir keine Assoziation mit einem spezifischen CED-Subphänotypen aufzeigen konnten.

Dennoch war die Stärke des hier beobachteten Assoziationssignals für M. Crohn deutlich schwächer als die Stärke des von uns für das zweite Autophagie-Gen *ATG16L1* demonstrierte Assoziationssignal, was somit für eine wichtigere Rolle für

ATG16L1 (im Vergleich zu *IRGM*) bei der M. Crohn-Pathogenese spricht. (Glas et al., 2008)

Aufgrund der fehlenden Assoziation der *IRGM*-SNPs mit *C. ulcerosa*-Suszeptibilität lässt sich schlussfolgern, dass Autophagie-Gene wie *IRGM* und *ATG16L1* eine wichtigere Rolle bei der Suszeptibilität für M. Crohn als bei der Suszeptibilität für *C. ulcerosa* spielen.

Der in dieser Studie gefundene hochinteressante Hinweis auf eine potentielle Epistasis zwischen *IRGM* und *ATG16L1* hinsichtlich M. Crohn-Suszeptibilität vor dem Hintergrund der engen funktionellen Verbindung dieser beiden Autophagie-Gene benötigt aber eine zusätzliche Bestätigung mittels größerer Metaanalysen, welche allerdings sehr große Patientenkohorten erforderlich machen würden, die nur im Rahmen internationaler Kooperationen durchgeführt werden können.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographische Charakteristika der CED-Studienpopulation.....	56
Tabelle 2: Primersequenzen und FRET-Probensequenzen, welche für die Genotypisierung von <i>IRGM</i> -Varianten verwendet wurden.....	69
Tabelle 3: Primersequenzen, die für die Sequenzanalyse von <i>IRGM</i> -Varianten verwendet wurden.	69
Tabelle 4: Materialien für die PCR und Reinigung der PCR-Produkte.	71
Tabelle 5: Materialien für die Agarosegelelektrophorese.	71
Tabelle 6: Materialien für die Genotypisierung mittels Hybridisierungssonden im LightCycler®.	72
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Geräte.	73
Tabelle 8: Assoziationen von <i>IRGM</i> -Genmarkern in M. Crohn- und C. ulcerosa-Fall-Kontroll-Assoziationsstudien.....	75
Tabelle 9: Analyse hinsichtlich eines Kopplungsungleichgewichts für M. Crohn-Patienten. Werte werden als r^2/D' -Messungen angegeben.....	76
Tabelle 10: Analyse hinsichtlich eines Kopplungsungleichgewichts für C. ulcerosa-Patienten. Werte werden als r^2/D' -Messungen angegeben.....	77
Tabelle 11: Analyse hinsichtlich eines Kopplungsungleichgewichts für Kontrollen. Werte werden als r^2/D' -Messungen angegeben.	77
Tabelle 12: Haplotypen von <i>IRGM</i> -SNPs für die M. Crohn-Fall-Kontroll-Probe und Omnibus p-Werte für die Assoziation mit M. Crohn-Suszeptibilität.	79
Tabelle 13: Haplotypen von <i>IRGM</i> -SNPs für die C. ulcerosa-Fall-Kontroll-Probe und Omnibus p-Werte für die Assoziation mit C. ulcerosa-Suszeptibilität.....	82

Tabelle 14: p-Werte für Allel-Assoziationen von <i>IRGM</i> -Genmarkern mit der anatomischen Lokalisation von M. Crohn entsprechend der Montreal-Klassifikation.....	85
Tabelle 15: p-Werte für Allel-Assoziationen von <i>IRGM</i> -Genmarkern mit der anatomischen Lokalisation von C. ulcerosa entsprechend der Montreal-Klassifikation.	86
Tabelle 16: Genotyp-Phänotyp-Analyse des exonischen, synonymen SNP rs10065172=p.Leu105Leu.	87
Tabelle 17: Analyse von Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis) für <i>IRGM</i> - mit <i>NOD2</i> -, <i>ATG16L1</i> - und <i>IL23R</i> -Genvarianten hinsichtlich M. Crohn-Suszeptibilität.	89
Tabelle 18: Odds ratios (OR) und 95% KI für die Gen-Gen-Interaktionen (Epistasis), welche signifikant hinsichtlich einer Suszeptibilität für M. Crohn waren (vor Bonferroni-Korrektur; siehe Tabelle 17).	90

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Teke et al., 2008, p. 148).....	7
Abbildung 2: Radiologische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Fornasa et al., 2011, p. 5).....	8
Abbildung 3: Extraintestinale Manifestationen von M. Crohn. (Bhat & Dawson, 2007, p. 718).....	10
Abbildung 4: Sonographische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Calabrese, 2011, p. 108).....	11
Abbildung 5: Endoskopische Erscheinungsbilder des Morbus Crohn. (Zezos et al., 2010, p. 2).....	12
Abbildung 6: Endoskopisches Erscheinungsbild der Colitis ulcerosa. (Ji et al., 2007, p. 751).....	19
Abbildung 7: Kolonkontrasteinlauf bei Colitis ulcerosa. (Ji et al., 2007, p. 751).....	20
Abbildung 8: Histopathologische Erscheinungsbilder bei Colitis ulcerosa. (Neumann et al., 2011, p. 3188).....	23
Abbildung 9: Zwei-Faktoren-Modell für die Pathogenese von CED. (Kaser et al., 2010, p. 397).....	25
Abbildung 10: Modell für die Pathogenese von CED basierend auf GWAS. (Khor et al., 2011, p. 309).....	30
Abbildung 11: Die Hauptsuszeptibilitätsgene für M. Crohn und deren Rolle bei der Vorhersage des Krankheitsphänotyps und des Behandlungserfolgs. (Brand, 2013, p. 1532).....	31
Abbildung 12: CED entstehen durch das Zusammenspiel von Faktoren, die das Gleichgewicht zwischen Umwelt, Darmkeimen und dem Wirt stören. (Dalal & Chang, 2014, p. 4193).....	33

Abbildung 13: Inverse Relation zwischen der Inzidenz prototypischer Infektionskrankheiten (Abbildung A) und der Inzidenz von Autoimmunerkrankungen (Abbildung B) zwischen 1950 und 2000. (Bach, 2002, p. 912)	37
Abbildung 14: Entwicklung von Th1-, Th2-, Th17- und iTreg-Zellen (Abk. iTreg von engl. <i>induced regulatory t cells</i>) aus naiven CD4+-T-Zellen. (Brand, 2009, p. 1153).....	39
Abbildung 15: Intrazelluläre Abwehrprogramme zur Erkennung von Mikroorganismen. (Khor et al., 2011, p. 314)	43
Abbildung 16: Ein gemeinsamer, <i>IRGM</i> vorgeschalteter 20 kb Deletionspolymorphismus. (McCarroll et al., 2008, p. 1108).....	47
Abbildung 17: Bakterien-Epithel-Interaktion. (Friswell et al., 2010, p. 296)	50
Abbildung 18: PCR-Phasen. (Yuan et al., 2006, p. 2).....	61
Abbildung 19: FRET zwischen Hybridisierungssonden. (Reiser et al., 1998, p. 13).....	64
Abbildung 20: Das FRET-Prinzip. (Bastiaens & Pepperkok, 2000, p. 634).....	65
Abbildung 21: Voraussetzung für FRET. (Bastiaens & Pepperkok, 2000, p. 634).....	66
Abbildung 22: Beispiel einer Schmelzkurvenanalyse. (Roche - Firmenschrift, n.d., p. 50)	67
Abbildung 23: Fehlregulation der mukosalen Immunantwort. (Blumberg, 2009, p. 456).....	93
Abbildung 24: Th17-Zell-Differenzierung bei der Maus und beim Menschen. (Brand, 2009, p. 1156)	94
Abbildung 25: Wege, die zu fehlgefalteten Proteinen und Zelltod führen. (Kaufman et al., 2010, p. 100)	101

9.3 Literaturverzeichnis

Abraham, C., & Cho, J. H. (2009a). IL-23 and Autoimmunity: New Insights into the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Medicine*, 60(1), 97–110.

Abraham, C., & Cho, J. H. (2009b). Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 361(21), 2066–2078.

Abraham, C., & Medzhitov, R. (2011). Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140(6), 1729–1737.

Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17–producing human T helper cells. *Nature Immunology*, 8(9), 942–949.

Albert, J. G., Martiny, F., Krummenerl, A., Stock, K., Leßke, J., Göbel, C. M., Lotterer, E., Nietsch, H. H., Behrmann, C., & Fleig, W. E. (2005). Diagnosis of small bowel Crohn's disease: a prospective comparison of capsule endoscopy with magnetic resonance imaging and fluoroscopic enteroclysis. *Gut*, 54(12), 1721–1727.

Amre, D. K., Mack, D. R., Morgan, K., Krupoves, A., Costea, I., Lambrette, P., Grimard, G., Dong, J., Feguery, H., Bucionis, V., Deslandres, C., Levy, E., & Seidman, E. G. (2009). Autophagy gene ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Canadian children. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(4), 501–507.

Ananthakrishnan, A. N. (2013). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 9(6), 367–374.

Anderson, C. A., Boucher, G., Lees, C. W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K. D., Lee, J. C., Goyette, P., Imielinski, M., Latiano, A., Lagace, C., Scott, R., Amininejad, L., Bumpstead, S., Baidoo, L., Baldassano, R. N., Barclay, M., Bayless, T. M., Brand, S., Buning, C., Colombel, J.-F., Denson, L. A., De Vos, M., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Fehrmann, R. S. N., Floyd, J. A. B., Florin, T., Franchimont, D., Franke, L., Georges, M., Glas, J., Glazer, N. L., Guthery, S. L., Haritunians, T., Hayward, N. K., Hugot, J.-P., Jobin, G., Laukens, D., Lawrance, I., Lemann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., McGovern, D. P., Milla, M., Montgomery, G. W., Morley, K. I., Mowat, C., Ng, A., Newman, W.,

Ophoff, R. A., Papi, L., Palmieri, O., Peyrin-Biroulet, L., Panes, J., Phillips, A., Prescott, N. J., Proctor, D. D., Roberts, R., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Schumm, P., Seibold, F., Sharma, Y., Simms, L. A., Seielstad, M., Steinhart, A. H., Targan, S. R., van den Berg, L. H., Vatn, M., Verspaget, H., Walters, T., Wijmenga, C., Wilson, D. C., Westra, H.-J., Xavier, R. J., Zhao, Z. Z., Ponsioen, C. Y., Andersen, V., Torkvist, L., Gazouli, M., Anagnou, N. P., Karlsen, T. H., Kupcinkas, L., Sventoraityte, J., Mansfield, J. C., Kugathasan, S., Silverberg, M. S., Halfvarson, J., Rotter, J. I., Mathew, C. G., Griffiths, A. M., Gearry, R., Ahmad, T., Brant, S. R., Chamaillard, M., Satsangi, J., Cho, J. H., Schreiber, S., Daly, M. J., Barrett, J. C., Parkes, M., Annesse, V., Hakonarson, H., Radford-Smith, G., Duerr, R. H., Vermeire, S., Weersma, R. K., & Rioux, J. D. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature Genetics*, *43*(3), 246–252.

Andreani, S. M., Dang, H. H., Grondona, P., Khan, A. Z., & Edwards, D. P. (2007). Rectovaginal fistula in Crohn's disease. *Diseases of the Colon and Rectum*, *50*(12), 2215–2222.

Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E., & Ouellette, A. J. (2000). Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunology*, *1*(2), 113–118.

Bach, J.-F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine*, *347*(12), 911–920.

Ballal, S. A., Gallini, C. A., Segata, N., Huttenhower, C., & Garrett, W. S. (2011). Host and gut microbiota symbiotic factors: lessons from inflammatory bowel disease and successful symbionts. *Cellular Microbiology*, *13*(4), 508–517.

Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, D. L., Cho, J. H., Duerr, R. H., Rioux, J. D., Brant, S. R., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Barmada, M. M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L. W., Green, T., Griffiths, A. M., Kistner, E. O., Murtha, M. T., Regueiro, M. D., Rotter, J. I., Schumm, L. P., Steinhart, A. H., Targan, S. R., Xavier, R. J., 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, J.-P., de Vos, M., Vermeire, S.,

Louis, E., Cardon, L. R., Anderson, C. A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Fisher, S. A., Marchini, J., Ghori, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C. G., Parkes, M., Georges, M., & Daly, M. J. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*, *40*(8), 955–962.

Bastiaens, P. I. H., & Pepperkok, R. (2000). Observing proteins in their natural habitat: the living cell. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(12), 631–637.

Ben-Horin, S., Kopylov, U., & Chowers, Y. (2014). Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews*, *13*(1), 24–30.

Benjamin, J., Makharia, G. K., Kalavani, M., & Joshi, Y. K. (2008). Nutritional status of patients with Crohn's disease. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*, *27*(5), 195–200.

Bennett, C. D., Campbell, M. N., Cook, C. J., Eyre, D. J., Nay, L. M., Nielsen, D. R., Rasmussen, R. P., & Bernard, P. S. (2003). The LightTyper: high-throughput genotyping using fluorescent melting curve analysis. *BioTechniques*, *34*(6), 1288–1292, 1294–1295.

Bergstrand, O., & Hellers, G. (1983). Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *18*(7), 903–906.

Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliever, E., & Wajda, A. (2001). Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, *91*(4), 854–862.

Bernstein, C. N., Fried, M., Krabshuis, J. H., Cohen, H., Eliakim, R., Fedail, S., Garry, R., Goh, K. I., Hamid, S., Khan, A. G., LeMair, A. W., Malfertheiner, Ouyang, Q., Rey, J. F., Sood, A., Steinwurz, F., Thomsen, O. O., Thomson, A., & Watermeyer, G. (2010). World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of IBD in 2010. *Inflammatory Bowel Diseases*, *16*(1), 112–124.

Bhat, M., & Dawson, D. (2007). Wheezes, blisters, bumps and runs: multisystem manifestations of a Crohn's disease flare-up. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, *177*(7), 715–718.

Birrenbach, T., & Böcker, U. (2004). Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflammatory Bowel Diseases*, *10*(6), 848–859.

Bloomfield, S., Stanwell-Smith, R., Crevel, R., & Pickup, J. (2006). Too clean, or not too clean: the Hygiene Hypothesis and home hygiene. *Clinical and Experimental Allergy*, *36*(4), 402–425.

Blumberg, R. S. (2009). Inflammation in the Intestinal Tract: Pathogenesis and Treatment. *Digestive Diseases*, *27*(4), 455–464.

Bogaert, S., Laukens, D., Peeters, H., Melis, L., Olievier, K., Boon, N., Verbruggen, G., Vandesompele, J., Elewaut, D., & De Vos, M. (2010). Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunology*, *11*, 61.

Bouguen, G., Levesque, B. G., Feagan, B. G., Kavanaugh, A., Peyrin-Biroulet, L., Colombel, J.-F., Hanauer, S. B., & Sandborn, W. J. (2013). Treat to Target: A Proposed New Paradigm for the Management of Crohn's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*.

Brand, S. (2009). Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, *58*(8), 1152–1167.

Brand, S. (2013). Moving the genetics of inflammatory bowel diseases from bench to bedside: first steps towards personalised medicine. *Gut*, *62*(11), 1531–1533.

Brest, P., Lapaquette, P., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., & Hofman, P. (2011). Risk predisposition for Crohn disease: a “ménage à trois” combining IRGM allele, miRNA and xenophagy. *Autophagy*, *7*(7), 786–787.

Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.-F., Hebuterne, X., Harel-Bellan, A., Mograbi, B., Darfeuille-Michaud, A., & Hofman, P. (2011). A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196

and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nature Genetics*, 43(3), 242–245.

Burger, D., & Travis, S. (2011). Conventional Medical Management of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 140(6), 1827–1837.e2.

Buselmaier, W. (2003). *Biologie für Mediziner* (9., völlig neubearb. Aufl.). Heidelberg: Springer.

Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C. D., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S., & Virgin IV, H. W. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456(7219), 259–263.

Calabrese, E. (2011). Bowel Ultrasound for the Assessment of Crohn's Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 7(2), 107.

Cameron, F. L., Gerasimidis, K., Papangelou, A., Missiou, D., Garrick, V., Cardigan, T., Buchanan, E., Barclay, A. R., McGrogan, P., & Russell, R. K. (2013). Clinical progress in the two years following a course of exclusive enteral nutrition in 109 paediatric patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 37(6), 622–629.

Caprilli, R., Latella, G., Vernia, P., & Frieri, G. (2000). Multiple organ dysfunction in ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(5), 1258–1262.

Card, T., Logan, R. F. A., Rodrigues, L. C., & Wheeler, J. G. (2004). Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut*, 53(2), 246–250.

Chambers, T. J., & Morson, B. C. (1979). The granuloma in Crohn's disease. *Gut*, 20(4), 269–274.

Chassaing, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2011). The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1720–1728.

Cho, J. H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(6), 458–466.

Cho, J. H., & Gregersen, P. K. (2011). Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *The New England Journal of Medicine*, 365(17), 1612–1623.

Cleynen, I., González, J. R., Figuera, C., Franke, A., McGovern, D., Bortlik, M., Crusius, B. J. A., Vecchi, M., Artieda, M., Szczypiorska, M., Bethge, J., Arteta, D., Ayala, E., Danese, S., van Hogezaand, R. A., Panés, J., Peña, S. A., Lukas, M., Jewell, D. P., Schreiber, S., Vermeire, S., & Sans, M. (2013). Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut*, 62(11), 1556–1565.

Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D. J. P., Campbell, B. J., Jewell, D., & Simmons, A. (2010). NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature Medicine*, 16(1), 90–97.

Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 18(3), 481–496.

Cosnes, J. (2010). Smoking, physical activity, nutrition and lifestyle: environmental factors and their impact on IBD. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 28(3), 411–417.

Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., & Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140(6), 1785–1794.

Dalal, S. R., & Chang, E. B. (2014). The microbial basis of inflammatory bowel diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4190–4196.

Danese, S., & Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis. *The New England Journal of Medicine*, 365(18), 1713–1725.

Danese, S., Rudziński, J., Brandt, W., Dupas, J.-L., Peyrin-Biroulet, L., Bouhnik, Y., Kleczkowski, D., Uebel, P., Lukas, M., Knutsson, M., Erlandsson, F., Hansen, M. B., & Keshav, S. (2014). Tralokinumab for moderate-to-severe UC: a randomised, double-blind,

placebo-controlled, phase IIa study. *Gut*, gutjnl-2014-308004.

Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gambiez, L., Joly, B., Cortot, A., & Colombel, J. F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, *115*(6), 1405–1413.

Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., & White, B. A. (1993). Polymerase chain reaction : basic protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *15*, 1–29.

Deretic, V. (2011). Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunological Reviews*, *240*(1), 92–104.

Dignass, A., Preiß, J., Aust, D., Autschbach, F., Ballauff, A., Barretton, G., Bokemeyer, B., Fichtner-Feigl, S., Hagel, S., Herrlinger, K., Jantschek, G., Kroesen, A., Kruis, W., Kucharzik, T., Langhorst, J., Reinshagen, M., Rogler, G., Schleiermacher, D., Schmidt, C., Schreiber, S., Schulze, H., Stange, E., Zeitz, M., Hoffmann, J., & Stallmach, A. (2011). Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 – Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, *49*(09), 1276–1341.

Dolsten, M., & Søgaard, M. (2012). Precision medicine: an approach to R&D for delivering superior medicines to patients. *Clinical and Translational Medicine*, *1*(1), 7.

Duerr, R. H., Taylor, K. D., Brant, S. R., Rioux, J. D., Silverberg, M. S., Daly, M. J., Steinhardt, A. H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L. W., Kistner, E. O., Schumm, L. P., Lee, A. T., Gregersen, P. K., Barnada, M. M., Rotter, J. I., Nicolae, D. L., & Cho, J. H. (2006). A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science*, *314*(5804), 1461–1463.

Ekbohm, A., & Montgomery, S. M. (2004). Environmental risk factors (excluding tobacco and microorganisms): critical analysis of old and new hypotheses. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, *18*(3), 497–508.

Eliakim, R., Fischer, D., Suissa, A., Yassin, K., Katz, D., Guttman, N., & Migdal, M. (2003). Wireless capsule video endoscopy is a superior diagnostic tool in comparison to barium follow-through and computerized tomography in patients with suspected Crohn's disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, *15*(4), 363–367.

Ellinghaus, D., Bethune, J., Petersen, B.-S., & Franke, A. (2014). The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis – status quo and beyond. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *50*(1), 13–23.

Elson, C. O., Cong, Y., McCracken, V. J., Dimmitt, R. A., Lorenz, R. G., & Weaver, C. T. (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Reviews*, *206*(1), 260–276.

Erlich, H. A. (1989). Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology*, *9*(6), 437–447.

Evans, H. G., Suddason, T., Jackson, I., Taams, L. S., & Lord, G. M. (2007). Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(43), 17034–17039.

Falvey, J., Greenwood, R., Creed, T. J., Smithson, J., Sylvester, P., Fraser, A., & Probert, C. S. (2010). Mortality in ulcerative colitis—what should we tell our patients? Three year mortality following admission for the treatment of ulcerative colitis: a 6 year retrospective case review. *Frontline Gastroenterology*, *1*(1), 35–41.

Farraye, F. A., Odze, R. D., Eaden, J., & Itzkowitz, S. H. (2010). AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *138*(2), 746–774, 774.e1–4; quiz e12–13.

Farraye, F. A., Odze, R. D., Eaden, J., Itzkowitz, S. H., McCabe, R. P., Dassopoulos, T., Lewis, J. D., Ullman, T. A., James, T., McLeod, R., Burgart, L. J., Allen, J., Brill, J. V., & AGA Institute Medical Position Panel on Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. (2010). AGA medical position statement on the diagnosis

and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 138(2), 738–745.

Fauci, A. S. (2008). *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill Medical.

Ferreira, R. B. R., Gill, N., Willing, B. P., Antunes, L. C. M., Russell, S. L., Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2011). The intestinal microbiota plays a role in Salmonella-induced colitis independent of pathogen colonization. *PLoS ONE*, 6(5), e20338.

Fichera, A., & Michelassi, F. (2007). Surgical treatment of Crohn's disease. *Journal of Gastrointestinal Surgery: Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 11(6), 791–803.

Fiocchi, C. (2009). Susceptibility genes and overall pathogenesis of inflammatory bowel disease: where do we stand? *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 27(3), 226–235.

Fisher, S. A., Tremelling, M., Anderson, C. A., Gwilliam, R., Bumpstead, S., Prescott, N. J., Nimmo, E. R., Massey, D., Berzuini, C., Johnson, C., Barrett, J. C., Cummings, F. R., Drummond, H., Lees, C. W., Onnie, C. M., Hanson, C. E., Blaszczyk, K., Inouye, M., Ewels, P., Ravindrarajah, R., Keniry, A., Hunt, S., Carter, M., Watkins, N., Ouwehand, W., Lewis, C. M., Cardon, L., Lobo, A., Forbes, A., Sanderson, J., Jewell, D. P., Mansfield, J. C., Deloukas, P., Mathew, C. G., Parkes, M., & Satsangi, J. (2008). Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nature Genetics*, 40(6), 710–712.

Fornasa, F., Benassuti, C., & Benazzato, L. (2011). Role of Magnetic Resonance Enterography in Differentiating between Fibrotic and Active Inflammatory Small Bowel Stenosis in Patients with Crohn's Disease. *Journal of Clinical Imaging Science*, 1.

Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13780–13785.

Franke, A., McGovern, D. P. B., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., Ahmad, T., Lees, C. W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., Anderson, C. A., Bis, J. C., Bumpstead, S., Ellinghaus, D., Festen, E. M., Georges, M., Green, T., Haritunians, T., Jostins, L., Latiano, A., Mathew, C. G., Montgomery, G. W., Prescott, N. J., Raychaudhuri, S., Rotter, J. I., Schumm, P., Sharma, Y., Simms, L. A., Taylor, K. D., Whiteman, D., Wijmenga, C., Baldassano, R. N., Barclay, M., Bayless, T. M., Brand, S., Buning, C., Cohen, A., Colombel, J.-F., Cottone, M., Stronati, L., Denson, T., De Vos, M., D’Inca, R., Dubinsky, M., Edwards, C., Florin, T., Franchimont, D., Gearry, R., Glas, J., Van Gossum, A., Guthery, S. L., Halfvarson, J., Verspaget, H. W., Hugot, J.-P., Karban, A., Laukens, D., Lawrance, I., Lemann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., Mowat, C., Newman, W., Panes, J., Phillips, A., Proctor, D. D., Regueiro, M., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Seibold, F., Steinhart, A. H., Stokkers, P. C. F., Torkvist, L., Kullak-Ublick, G., Wilson, D., Walters, T., Targan, S. R., Brant, S. R., Rioux, J. D., D’Amato, M., Weersma, R. K., Kugathasan, S., Griffiths, A. M., Mansfield, J. C., Vermeire, S., Duerr, R. H., Silverberg, M. S., Satsangi, J., Schreiber, S., Cho, J. H., Annesse, V., Hakonarson, H., Daly, M. J., & Parkes, M. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’s disease susceptibility loci. *Nature Genetics*, *42*(12), 1118–1125.

Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, *26*(1), 112–122, 124–125.

Friswell, M., Campbell, B., & Rhodes, J. (2010). The Role of Bacteria in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Gut and Liver*, *4*(3), 295–306.

Fritz, T., Niederreiter, L., Adolph, T., Blumberg, R. S., & Kaser, A. (2011). Crohn’s disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut*, *60*(11), 1580–1588.

Fuss, I. J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R. S., Mannon, P., & Strober, W. (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(10), 1490–1497.

Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., Motte, C. de la, Strong, S. A., Fiocchi, C., & Strober, W. (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in

inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *The Journal of Immunology*, 157(3), 1261–1270.

Gersemann, M., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2011). From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 17(27), 3198–3203.

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Kostic, A. D., Luo, C., González, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., Stephens, M., Heyman, M., Markowitz, J., Baldassano, R., Griffiths, A., Sylvester, F., Mack, D., Kim, S., Crandall, W., Hyams, J., Huttenhower, C., Knight, R., & Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host & Microbe*, 15(3), 382–392.

Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995–1001.

Gilat, T., Hacoen, D., Lilos, P., & Langman, M. J. (1987). Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 22(8), 1009–1024.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., & Campieri, M. (2003). Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 124(5), 1202–1209.

Glas, J., Konrad, A., Schmechel, S., Dambacher, J., Seiderer, J., Schroff, F., Wetzke, M., Roeske, D., Torok, H.-P., Tonenchi, L., Pfennig, S., Haller, D., Griga, T., Klein, W., Epplen, J. T., Folwaczny, C., Lohse, P., Goke, B., Ochsenkuhn, T., Mussack, T., Folwaczny, M., Muller-Myhsok, B., & Brand, S. (2008). The ATG16L1 Gene Variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) Are Strongly Associated With Susceptibility to Crohn's Disease in the German Population. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(3), 682–691.

Glas, J., Seiderer, J., Fischer, D., Tengler, B., Pfennig, S., Wetzke, M., Beigel, F., Olszak, T., Weidinger, M., Göke, B., Ochsenkuhn, T., Folwaczny, M., Müller-Myhsok, B., Diegelmann,

J., Czamara, D., & Brand, S. (2011). Pregnane X receptor (PXR/NR1I2) gene haplotypes modulate susceptibility to inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(9), 1917–1924.

Glas, J., Seiderer, J., Fries, C., Tillack, C., Pfennig, S., Weidinger, M., Beigel, F., Olszak, T., Lass, U., Göke, B., Ochsenkühn, T., Wolf, C., Lohse, P., Müller-Myhsok, B., Diegelmann, J., Czamara, D., & Brand, S. (2011). CEACAM6 Gene Variants in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 6(4).

Glas, J., Seiderer, J., Nagy, M., Fries, C., Beigel, F., Weidinger, M., Pfennig, S., Klein, W., Epplen, J. T., Lohse, P., Folwaczny, M., Göke, B., Ochsenkühn, T., Diegelmann, J., Müller-Myhsok, B., Roeske, D., & Brand, S. (2010). Evidence for STAT4 as a Common Autoimmune Gene: rs7574865 Is Associated with Colonic Crohn's Disease and Early Disease Onset. *PLoS ONE*, 5(4).

Glas, J., Seiderer, J., Pasciuto, G., Tillack, C., Diegelmann, J., Pfennig, S., Konrad, A., Schmechel, S., Wetzke, M., Torok, H.-P., Stallhofer, J., Jurgens, M., Griga, T., Klein, W., Epplen, J. T., Schiemann, U., Mussack, T., Lohse, P., Goke, B., Ochsenkuhn, T., Folwaczny, M., Muller-Myhsok, B., & Brand, S. (2009). rs224136 on Chromosome 10q21.1 and Variants in PHOX2B, NCF4, and FAM92B Are Not Major Genetic Risk Factors for Susceptibility to Crohn's Disease in the German Population. *The American Journal of Gastroenterology*, 104(3), 665–672.

Glas, J., Seiderer, J., Tillack, C., Pfennig, S., Beigel, F., Jürgens, M., Olszak, T., Laubender, R. P., Weidinger, M., Müller-Myhsok, B., Göke, B., Ochsenkühn, T., Lohse, P., Diegelmann, J., Czamara, D., & Brand, S. (2010). The NOD2 Single Nucleotide Polymorphisms rs2066843 and rs2076756 Are Novel and Common Crohn's Disease Susceptibility Gene Variants. *PLoS ONE*, 5(12).

Glas, J., Seiderer, J., Wetzke, M., Konrad, A., Török, H.-P., Schmechel, S., Tonenchi, L., Grassl, C., Dambacher, J., Pfennig, S., Maier, K., Griga, T., Klein, W., Epplen, J. T., Schiemann, U., Folwaczny, C., Lohse, P., Göke, B., Ochsenkühn, T., Müller-Myhsok, B., Folwaczny, M., Mussack, T., & Brand, S. (2007). rs1004819 Is the Main Disease-Associated IL23R Variant in German Crohn's Disease Patients: Combined Analysis of IL23R, CARD15,

and OCTN1/2 Variants. *PLoS ONE*, 2(9).

Glas, J., Stallhofer, J., Ripke, S., Wetzke, M., Pfennig, S., Klein, W., Epplen, J. T., Griga, T., Schiemann, U., Lacher, M., Koletzko, S., Folwaczny, M., Lohse, P., Goke, B., Ochsenkuhn, T., Muller-Myhsok, B., & Brand, S. (2009). Novel Genetic Risk Markers for Ulcerative Colitis in the IL2/IL21 Region Are in Epistasis With IL23R and Suggest a Common Genetic Background for Ulcerative Colitis and Celiac Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 104(7), 1737–1744.

Gölder, S. K., Schreyer, A. G., Endlicher, E., Feuerbach, S., Schölmerich, J., Kullmann, F., Seitz, J., Rogler, G., & Herfarth, H. (2006). Comparison of capsule endoscopy and magnetic resonance (MR) enteroclysis in suspected small bowel disease. *International Journal of Colorectal Disease*, 21(2), 97–104.

Greten, H. (2005). *Innere Medizin* (12., komplett überarb. Aufl.). Stuttgart, New York: Thieme.

Halme, L., Rautelin, H., Leidenius, M., & Kosunen, T. U. (1996). Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Pathology*, 49(1), 65–67.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F. M., Briggs, J., Gunther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Hasler, R., Sipos, B., Folsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., Krawczak, M., & Schreiber, S. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics*, 39(2), 207–211.

Harpaz, N., Ward, S. C., Mescoli, C., Itzkowitz, S. H., & Polydorides, A. D. (2013). Precancerous lesions in inflammatory bowel disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(2), 257–267.

Harrison, O. J., & Maloy, K. J. (2011). Innate Immune Activation in Intestinal Homeostasis. *Journal of Innate Immunity*.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real Time Quantitative PCR.

Genome Research, 6(10), 986–994.

Heller, F., Fuss, I. J., Nieuwenhuis, E. E., Blumberg, R. S., & Strober, W. (2002). Oxazolone Colitis, a Th2 Colitis Model Resembling Ulcerative Colitis, Is Mediated by IL-13-Producing NK-T Cells. *Immunity*, 17(5), 629–638.

Herfarth, H. (2013). Update imaging in inflammatory bowel diseases. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 31(3-4), 345–350.

Higuchi, L. M., Khalili, H., Chan, A. T., Richter, J. M., Bousvaros, A., & Fuchs, C. S. (2012). A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(9), 1399–1406.

Hoffmann, J. C., Preiss, J. C., Autschbach, F., Buhr, H. J., Häuser, W., Herrlinger, K., Höhne, W., Koletzko, S., Krieglstein, C. F., Kruis, W., Matthes, H., Moser, G., Reinshagen, M., Rogler, G., Schreiber, S., Schreyer, A. G., Sido, B., Siegmund, B., Stallmach, A., Bokemeyer, B., Stange, E. F., & Zeitz, M. (2008). [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 46(9), 1094–1146.

Holroyd, D. J., Banerjee, S., Beavan, M., Prentice, R., Vijay, V., & Warren, S. J. (2012). Colovaginal and colovesical fistulae: the diagnostic paradigm. *Techniques in Coloproctology*, 16(2), 119–126.

Huett, A., McCarroll, S. A., Daly, M. J., & Xavier, R. J. (2009). On the level: IRGM gene function is all about expression. *Autophagy*, 5(1), 96–100.

Hugot, J.-P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J. M., Lee, J. C., Beaugerie, L., Naom, I., Dupas, J.-L., Van Gossum, A., Orholm, M., Bonaiti-Pellie, C., Weissenbach, J., Mathew, C. G., Lennard-Jones, J. E., Cortot, A., Colombel, J.-F., & Thomas, G. (1996). Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, 379(6568), 821–823.

Ji, J.-S., Kim, H.-K., Kim, S.-S., Cho, Y.-S., Chae, H.-S., Kim, C.-W., Lee, B.-I., Choi, H., Kim, B.-W., & Choi, K.-Y. (2007). Combined Hepatic and Splenic Abscesses in a Patient with Ulcerative Colitis. *Journal of Korean Medical Science*, 22(4), 750–753.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., Lee, J. C., Schumm, L. P., Sharma, Y., Anderson, C. A., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleyne, I., Theatre, E., Spain, S. L., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., Abraham, C., Achkar, J.-P., Ahmad, T., Amininejad, L., Ananthakrishnan, A. N., Andersen, V., Andrews, J. M., Baidoo, L., Balschun, T., Bampton, P. A., Bitton, A., Boucher, G., Brand, S., Büning, C., Cohain, A., Cichon, S., D'Amato, M., Jong, D. D., Devaney, K. L., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Ferguson, L. R., Franchimont, D., Fransen, K., Gearry, R., Georges, M., Gieger, C., Glas, J., Haritunians, T., Hart, A., Hawkey, C., Hedl, M., Hu, X., Karlsen, T. H., Kupcinskis, L., Kugathasan, S., Latiano, A., Laukens, D., Lawrance, I. C., Lees, C. W., Louis, E., Mahy, G., Mansfield, J., Morgan, A. R., Mowat, C., Newman, W., Palmieri, O., Ponsioen, C. Y., Potocnik, U., Prescott, N. J., Regueiro, M., Rotter, J. I., Russell, R. K., Sanderson, J. D., Sans, M., Satsangi, J., Schreiber, S., Simms, L. A., Sventoraityte, J., Targan, S. R., Taylor, K. D., Tremelling, M., Verspaget, H. W., Vos, M. D., Wijmenga, C., Wilson, D. C., Winkelmann, J., Xavier, R. J., Zeissig, S., Zhang, B., Zhang, C. K., Zhao, H., (iibdgc), T. I. I. G. C., Silverberg, M. S., Annesse, V., Hakonarson, H., Brant, S. R., Radford-Smith, G., Mathew, C. G., Rioux, J. D., Schadt, E. E., Daly, M. J., Franke, A., Parkes, M., Vermeire, S., Barrett, J. C., & Cho, J. H. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, *491*(7422), 119–124.

Jürgens, M., Brand, S., Laubender, R. P., Seiderer, J., Glas, J., Wetzke, M., Wagner, J., Pfennig, S., Tillack, C., Beigel, F., Weidinger, M., Schnitzler, F., Kreis, M. E., Göke, B., Lohse, P., Herrmann, K., & Ochsenkühn, T. (2010). The presence of fistulas and NOD2 homozygosity strongly predict intestinal stenosis in Crohn's disease independent of the IL23R genotype. *Journal of Gastroenterology*, *45*(7), 721–731.

Jürgens, M., Laubender, R. P., Hartl, F., Weidinger, M., Seiderer, J., Wagner, J., Wetzke, M., Beigel, F., Pfennig, S., Stallhofer, J., Schnitzler, F., Tillack, C., Lohse, P., Goke, B., Glas, J., Ochsenkühn, T., & Brand, S. (2010). Disease Activity, ANCA, and IL23R Genotype Status Determine Early Response to Infliximab in Patients With Ulcerative Colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, *105*(8), 1811–1819.

Kabi, A., Nickerson, K. P., Homer, C. R., & McDonald, C. (2011). Digesting the genetics of inflammatory bowel disease: Insights from studies of autophagy risk genes. *Inflammatory*

Bowel Diseases.

Kaser, A., & Blumberg, R. S. (2011). Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, *140*(6), 1738–1747.

Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. E. S., Higgins, D. E., Schreiber, S., Glimcher, L. H., & Blumberg, R. S. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*, *134*(5), 743–756.

Kaser, A., & Tilg, H. (2009). Inflammatory bowel diseases: highlights from the United European Gastroenterology Week 2008. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *13*(2), 259–263.

Kaser, A., Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2010). Genes and Environment: How Will Our Concepts on the Pathophysiology of IBD Develop in the Future? *Digestive Diseases*, *28*(3), 395–405.

Kaufman, R. J., Back, S. H., Song, B., Han, J., & Hassler, J. (2010). The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the ER, prevent oxidative stress, and preserve differentiation in β -cells. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *12*(Suppl 2), 99–107.

Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, *474*(7351), 307–317.

King, K. Y., Lew, J. D., Ha, N. P., Lin, J. S., Ma, X., Graviss, E. A., & Goodell, M. A. (2011). Polymorphic Allele of Human IRGM1 Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in African Americans. *PLoS ONE*, *6*(1).

King, R. M., Beart, R. W., & McIlrath, D. C. (1982). Colovesical and rectovesical fistulas. *Archives of Surgery*, *117*(5), 680–683.

Klaschik, S., Lehmann, L. E., Raadts, A., Book, M., Gebel, J., Hoefl, A., & Stuber, F. (2004). Detection and Differentiation of In Vitro-Spiked Bacteria by Real-Time PCR and Melting-Curve Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(2), 512–517.

Klement, E., Cohen, R. V., Boxman, J., Joseph, A., & Reif, S. (2004). Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(5), 1342–1352.

Koloski, N. A., Bret, L., & Radford-Smith, G. (2008). Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(2), 165–173.

Kornbluth, A., & Sachar, D. B. (1997). Ulcerative colitis practice guidelines in adults. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *The American Journal of Gastroenterology*, 92(2), 204–211.

Korzenik, J. R. (2005). Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 39(4 Suppl 2), S59–65.

Koutroubakis, I. E., Vlachonikolis, I. G., & Kouroumalis, E. A. (2002). Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflammatory Bowel Diseases*, 8(4), 277–286.

Kruis, W. (2013). Probiotics. *Digestive Diseases*, 31(3-4), 385–387.

Kulnigg, S., & Gasche, C. (2006). Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 24(11-12), 1507–1523.

Kumar, P., & Clark, M. (2005). *Kumar & Clark clinical medicine* (6th edition.). Edinburgh: Elsevier Saunders.

Laharie, D., Bourreille, A., Branche, J., Allez, M., Bouhnik, Y., Filippi, J., Zerbib, F., Savoye, G., Nachury, M., Moreau, J., Delchier, J.-C., Cosnes, J., Ricart, E., Dewit, O., Lopez-Sanroman, A., Dupas, J.-L., Carbonnel, F., Bommelaer, G., Coffin, B., Roblin, X., Van Assche, G., Esteve, M., Färkkilä, M., Gisbert, J. P., Marteau, P., Nahon, S., de Vos, M., Franchimont, D., Mary, J.-Y., Colombel, J.-F., & Lémann, M. (1). Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial. *The Lancet*, 380(9857), 1909–1915.

Lakatos, P. L., Szamosi, T., & Lakatos, L. (2007). Smoking in inflammatory bowel diseases:

good, bad or ugly? *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(46), 6134–6139.

Lankarani, K. B., Sivandzadeh, G. R., & Hassanpour, S. (2013). Oral manifestation in inflammatory bowel disease: A review. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(46), 8571–8579.

Lapaquette, P., Glasser, A.-L., Huett, A., Xavier, R. J., & Darfeuille-Michaud, A. (2010). Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli are selectively favoured by impaired autophagy to replicate intracellularly. *Cellular Microbiology*, 12(1), 99–113.

Latiano, A., Palmieri, O., Cucchiara, S., Castro, M., D'Inca, R., Guariso, G., Dallapiccola, B., Valvano, M. R., Latiano, T., Andriulli, A., & Annese, V. (2009). Polymorphism of the IRGM Gene Might Predispose to Fistulizing Behavior in Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 104(1), 110–116.

Lee, J., Allen, R., Ashley, S., Becker, S., Cummins, P., Ghadamosi, A., Gooding, O., Huston, J., Le Couteur, J., O'Sullivan, D., Wilson, S., & Lomer, M. C. E. (2013). British Dietetic Association evidence-based guidelines for the dietary management of Crohn's disease in adults. *Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association*.

Lees, C. W., Barrett, J. C., Parkes, M., & Satsangi, J. (2011). New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*, 60(12), 1739–1753.

Lennard-Jones, J. E. (1989). Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 170, 2–6; discussion 16–19.

Levesque, B. G., & Kane, S. V. (2011). Searching for the Delta. *Gastroenterology & Hepatology*, 7(5), 295–301.

Levine, J. S., & Burakoff, R. (2011). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 7(4), 235–241.

Liangpunsakul, S., Chadalawada, V., Rex, D. K., Maglinte, D., & Lappas, J. (2003). Wireless capsule endoscopy detects small bowel ulcers in patients with normal results from state of the art enteroclysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(6), 1295–1298.

Loftus, E. V., Jr. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6), 1504–1517.

López-Serrano, P., Pérez-Calle, J. L., Pérez-Fernández, M. T., Fernández-Font, J. M., Boixeda de Miguel, D., & Fernández-Rodríguez, C. M. (2010). Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 45(12), 1464–1471.

Manel, N., Unutmaz, D., & Littman, D. R. (2008). The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nature Immunology*, 9(6), 641–649.

Martinez-Medina, M., Aldeguer, X., Lopez-Siles, M., González-Huix, F., López-Oliu, C., Dahbi, G., Blanco, J. E., Blanco, J., Garcia-Gil, L. J., & Darfeuille-Michaud, A. (2009). Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(6), 872–882.

Martland, G. T., & Shepherd, N. A. (2007). Indeterminate colitis: definition, diagnosis, implications and a plea for nosological sanity. *Histopathology*, 50(1), 83–96.

Matsukawa, H., Shiraga, N., Tsugu, T., Adachi, M., Miyazawa, M., Kashiwazaki, K., & Hibi, T. (2007). The use of water-soluble contrast enema without pretreatment for the diagnosis of colon disease. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi = The Japanese Journal of Gastroenterology*, 104(9), 1344–1351.

McCarroll, S. A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S. D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M. C., Hall, J. L., Brant, S. R., Cho, J. H., Duerr, R. H., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Rioux, J. D., Altshuler, D., Daly, M. J., & Xavier, R. J. (2008). Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nature Genetics*, 40(9), 1107–1112.

McCole, D. F. (2014). IBD Candidate Genes and Intestinal Barrier Regulation: *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(10), 1829–1849.

McGovern, D. P. B., Gardet, A., Torkvist, L., Goyette, P., Essers, J., Taylor, K. D., Neale, B. M., Ong, R. T. H., Lagace, C., Li, C., Green, T., Stevens, C. R., Beauchamp, C., Fleshner, P. R., Carlson, M., D'Amato, M., Halfvarson, J., Hibberd, M. L., Lordal, M., Padyukov, L., Andriulli, A., Colombo, E., Latiano, A., Palmieri, O., Bernard, E.-J., Deslandres, C., Hommes, D. W., de Jong, D. J., Stokkers, P. C., Weersma, R. K., Sharma, Y., Silverberg, M. S., Cho, J. H., Wu, J., Roeder, K., Brant, S. R., Schumm, L. P., Duerr, R. H., Dubinsky, M. C., Glazer, N. L., Haritunians, T., Ippoliti, A., Melmed, G. Y., Siscovick, D. S., Vasilias, E. A., Targan, S. R., Annese, V., Wijmenga, C., Pettersson, S., Rotter, J. I., Xavier, R. J., Daly, M. J., Rioux, J. D., & Seielstad, M. (2010). Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nature Genetics*, *42*(4), 332–337.

Meggyesi, N., Kiss, L. S., Koszarska, M., Bortlik, M., Duricova, D., Lakatos, L., Molnar, T., Leniček, M., Vitek, L., Altorjay, I., Papp, M., Tulassay, Z., Miheller, P., Papp, J., Tordai, A., Andrikovics, H., Lukas, M., & Lakatos, P. L. (2010). NKX2-3 and IRGM variants are associated with disease susceptibility to IBD in Eastern European patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *16*(41), 5233–5240.

Miossec, P. (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes and Infection*, *11*(5), 625–630.

Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Chiba, C., & Bhan, A. K. (1996). Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *184*(2), 707–715.

Mowat, C., Cole, A., Windsor, A., Ahmad, T., Arnott, I., Driscoll, R., Mitton, S., Orchard, T., Rutter, M., Younge, L., Lees, C., Ho, G.-T., Satsangi, J., & Bloom, S. (2011). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, *60*(5), 571–607.

Nagalingam, N. A., & Lynch, S. V. (2011). Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*.

Narin, B., Sungurlu, F., Balci, A., Arman, A., Kurdas, O. O., & Simsek, M. (2009). Comparison of MR enteroclysis with colonoscopy in Crohn's disease--first locust bean gum study from Turkey. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*, *15*(4), 253–257.

Neumann, H., Vieth, M., Langner, C., Neurath, M. F., & Mudter, J. (2011). Cancer risk in IBD: How to diagnose and how to manage DALM and ALM. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *17*(27), 3184–3191.

Ng, S. C., Bernstein, C. N., Vatn, M. H., Lakatos, P. L., Loftus, E. V., Tysk, C., O'Morain, C., Moum, B., & Colombel, J.-F. (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, *62*(4), 630–649.

Nyhlin, H., Merrick, M. V., & Eastwood, M. A. (1994). Bile acid malabsorption in Crohn's disease and indications for its assessment using SeHCAT. *Gut*, *35*(1), 90–93.

Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J. N., Siebert, R., Baron, R. M., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2012). Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. *Science*, *336*(6080), 489–493.

Onderdonk, A. B., Hermos, J. A., & Bartlett, J. G. (1977). The role of the intestinal microflora in experimental colitis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *30*(11), 1819–1825.

Palomino-Morales, R. J., Oliver, J., Gomez-Garcia, M., Lopez-Nevot, M. A., Rodrigo, L., Nieto, A., Alizadeh, B. Z., & Martin, J. (2009). Association of ATG16L1 and IRGM genes polymorphisms with inflammatory bowel disease: a meta-analysis approach. *Genes and Immunity*, *10*(4), 356–364.

Parkes, M., Barrett, J. C., Prescott, N. J., Tremelling, M., Anderson, C. A., Fisher, S. A., Roberts, R. G., Nimmo, E. R., Cummings, F. R., Soars, D., Drummond, H., Lees, C. W., Khawaja, S. A., Bagnall, R., Burke, D. A., Todhunter, C. E., Ahmad, T., Onnie, C. M., McArdle, W., Strachan, D., Bethel, G., Bryan, C., Lewis, C. M., Deloukas, P., Forbes, A., Sanderson, J., Jewell, D. P., Satsangi, J., Mansfield, J. C., Cardon, L., & Mathew, C. G. (2007). Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature Genetics*, *39*(7), 830–832.

Park, S. C., & Jeen, Y. T. (2015). Current and emerging biologics for ulcerative colitis. *Gut and Liver*, *9*(1), 18–27.

Pellisé, M. (2013). Overcoming Challenges in IBD Management: Management of Colonic

Dysplastic Lesions. *Digestive Diseases*, 31(2), 244–247.

Pineton de Chambrun, G. P., Torres, J., Darfeuille-Michaud, A., & Colombel, J.-F. (2012). The Role of Anti(myco)bacterial Interventions in the Management of IBD: Is There Evidence at All? *Digestive Diseases*, 30(4), 358–367.

Pithadia, A. B., & Jain, S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports: PR*, 63(3), 629–642.

Plantinga, T. S., Joosten, L. A. B., & Netea, M. G. (2011). ATG16L1 polymorphisms are associated with NOD2-induced hyperinflammation. *Autophagy*, 7(9), 1074–1075.

Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*, 347(6), 417–429.

Prescott, N. J., Dominy, K. M., Kubo, M., Lewis, C. M., Fisher, S. A., Redon, R., Huang, N., Stranger, B. E., Blaszczyk, K., Hudspith, B., Parkes, G., Hosono, N., Yamazaki, K., Onnie, C. M., Forbes, A., Dermizakis, E. T., Nakamura, Y., Mansfield, J. C., Sanderson, J., Hurles, M. E., Roberts, R. G., & Mathew, C. G. (2010). Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(9), 1828–1839.

Price, A. B. (1978). Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *Journal of Clinical Pathology*, 31(6), 567–577.

Reiser, A., Herrmann, M., Tabiti, K., Wittwer, C., & Silva, D. D. E. (1998). Rapid Genotyping and Quantification on the LightCycler™ with Hybridization Probes. *North*, (2), 12–15.

Richman, E., & Rhodes, J. M. (2013). Review article: evidence-based dietary advice for patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 38(10), 1156–1171.

Rigottier-Gois, L. (2013). Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *The ISME Journal*, 7(7), 1256–1261.

Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M. M., Datta, L. W., Shugart, Y. Y., Griffiths, A. M., Targan, S. R., Ippoliti, A. F., Bernard, E.-J., Mei, L., Nicolae, D. L., Regueiro, M., Schumm, L. P., Steinhart, A. H., Rotter, J. I., Duerr, R. H., Cho, J. H., Daly, M. J., & Brant, S. R. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genetics*, *39*(5), 596–604.

Roberts, R. L., Hollis-Moffatt, J. E., Gearry, R. B., Kennedy, M. A., Barclay, M. L., & Merriman, T. R. (2008). Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes and Immunity*, *9*(6), 561–565.

Roblin, X., Neut, C., Darfeuille-Michaud, A., & Colombel, J. F. (2012). Local appendiceal dysbiosis: the missing link between the appendix and ulcerative colitis? *Gut*, *61*(4), 635–636.

Roche - Firmenschrift. (n.d.). LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual.

Rogler, G. (2011). Interaction between susceptibility and environment: examples from the digestive tract. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, *29*(2), 136–143.

Schirbel, A., & Fiocchi, C. (2010). Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *Journal of Digestive Diseases*, *11*(5), 266–276.

Seiderer, J., Brand, S., Herrmann, K. A., Schnitzler, F., Hatz, R., Crispin, A., Pfennig, S., Schoenberg, S. O., G??ke, B., Lohse, P., & Ochsenkuhn, T. (2006). Predictive Value of the CARD15 Variant 1007fs for the Diagnosis of Intestinal Stenoses and the Need for Surgery in Crohn's Disease in Clinical Practice. *Inflammatory Bowel Diseases*, *12*(12), 1114–1121.

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. (2006). Homozygosity for the *CARD15* frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis </title>. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *41*(12), 1421–1432.

Selvin, P. R. (2000). The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nature Structural Biology*, 7(9), 730–734.

Silverberg, M. S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I. D., Bernstein, C. N., Brant, S. R., Caprilli, R., Colombel, J.-F., Gasche, C., Geboes, K., Jewell, D. P., Karban, A., Loftus Jr, E. V., Peña, A. S., Riddell, R. H., Sachar, D. B., Schreiber, S., Steinhart, A. H., Targan, S. R., Vermeire, S., & Warren, B. F. (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien de Gastroenterologie*, 19 Suppl A, 5–36.

Simms, L. A., Doecke, J. D., Walsh, M. D., Huang, N., Fowler, E. V., & Radford-Smith, G. L. (2008). Reduced α -defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 57(7), 903–910.

Singh, S. B., Davis, A. S., Taylor, G. A., & Deretic, V. (2006). Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria. *Science*, 313(5792), 1438–1441.

Singh, S. B., Ornatowski, W., Vergne, I., Naylor, J., Delgado, M., Roberts, E., Ponpuak, M., Master, S., Pilli, M., White, E., Komatsu, M., & Deretic, V. (2010). Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nature Cell Biology*, 12(12), 1154–1165.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasequez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16731–16736.

Sonnenberg, A., & Genta, R. M. (2012). Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection among patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(4), 469–476.

Stein, J., Tannich, E., & Hartmann, F. (2013). An unusual complication in ulcerative colitis

during treatment with azathioprine and infliximab: *Isospora belli* as “Casus belli.” *BMJ Case Reports*, 2013, bcr2013009837.

Stewart, M. J., Seow, C. H., & Storr, M. A. (2011). Prednisolone and Budesonide for Short- and Long-Term Treatment of Microscopic Colitis: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 9(10), 881–890.

Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal*, 299(6710), 1259–1260.

Stremmel, W., & Gauss, A. (2013). Lecithin as a Therapeutic Agent in Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases*, 31(3-4), 388–390.

Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., Rankin, G., Summers, R., Mekhjian, H., Greenberger, N., & Kelly, M. (1991). Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn’s disease. *Gut*, 32(9), 1071–1075.

Teke, Z., Aytakin, F. O., Atalay, A. O., & Demirkan, N. C. (2008). Crohn’s disease complicated by multiple stenoses and internal fistulas clinically mimicking small bowel endometriosis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(1), 146–151.

The Wellcome Trust Case Control Consortium. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), 661–678.

Thoeni, R. F., & Cello, J. P. (2006). CT Imaging of Colitis. *Radiology*, 240(3), 623–638.

Thukkani, N., Williams, J. L., & Sonnenberg, A. (2011). Epidemiologic characteristics of patients with inflammatory bowel disease undergoing colonoscopy. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(6), 1333–1337.

Travassos, L. H., Carneiro, L. A. M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhaes, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I. G., Allaoui, A., Jones, N. L., Nunez, G., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature Immunology*, 11(1),

55–62.

Traver, M. K., Henry, S. C., Cantillana, V., Oliver, T., Hunn, J. P., Howard, J. C., Beer, S., Pfeffer, K., Coers, J., & Taylor, G. A. (2011). Immunity-related GTPase M (IRGM) Proteins Influence the Localization of Guanylate-binding Protein 2 (GBP2) by Modulating Macroautophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30471–30480.

Triantafillidis, J. K., & Papalois, A. E. (2014). The role of total parenteral nutrition in inflammatory bowel disease: current aspects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(1), 3–14.

Triester, S. L., Leighton, J. A., Leontiadis, G. I., Gurudu, S. R., Fleischer, D. E., Hara, A. K., Heigh, R. I., Shiff, A. D., & Sharma, V. K. (2006). A Meta-Analysis of the Yield of Capsule Endoscopy Compared to Other Diagnostic Modalities in Patients with Non-Stricturing Small Bowel Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(5), 954–964.

Umeno, J., Asano, K., Matsushita, T., Matsumoto, T., Kiyohara, Y., Iida, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., & Kubo, M. (2011). Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*.

Vandenbroucke, R. E., Vanlaere, I., Van Hauwermeiren, F., Van Wonterghem, E., Wilson, C., & Libert, C. (2013). Pro-inflammatory effects of matrix metalloproteinase 7 in acute inflammation. *Mucosal Immunology*.

Van Limbergen, J., Russell, R. K., Nimmo, E. R., Drummond, H. E., G, D., Wilson, D. C., & Satsangi, J. (2009). Germline variants of IRGM in childhood-onset Crohn's disease. *Gut*, 58(4), 610–611.

Van Limbergen, J., Russell, R. K., Nimmo, E. R., & Satsangi, J. (2007). The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 102(12), 2820–2831.

Van Limbergen, J., Wilson, D. C., & Satsangi, J. (2009). The genetics of Crohn's disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 89–116.

Vavricka, S. R., & Rogler, G. (2010). Fistula Treatment: The Unresolved Challenge. *Digestive Diseases*, 28(3), 556–564.

Voderholzer, W. A., Beinhold, J., Rogalla, P., Murrer, S., Schachschal, G., Lochs, H., & Ortner, M.-A. (2005). Small bowel involvement in Crohn's disease: a prospective comparison of wireless capsule endoscopy and computed tomography enteroclysis. *Gut*, 54(3), 369–373.

Von Mutius, E. (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology*, 212(6), 433–439.

Wagtman, M. J., Witte, A. M., Taylor, D. R., Biemond, I., Veenendaal, R. A., Verspaget, H. W., Lamers, C. B., & van Hogezaand, R. A. (1997). Low seroprevalence of Helicobacter pylori antibodies in historical sera of patients with Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(7), 712–718.

Waterman, M., Xu, W., Stempak, J. M., Milgrom, R., Bernstein, C. N., Griffiths, A. M., Greenberg, G. R., Steinhart, A. H., & Silverberg, M. S. (2011). Distinct and overlapping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: Correlations with pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(9), 1936–1942.

Weersma, R. K., Stokkers, P. C. F., Cleynen, I., Wolfkamp, S. C. S., Henckaerts, L., Schreiber, S., Dijkstra, G., Franke, A., Nolte, I. M., Rutgeerts, P., Wijmenga, C., & Vermeire, S. (2009). Confirmation of Multiple Crohn's Disease Susceptibility Loci in a Large Dutch-Belgian Cohort. *The American Journal of Gastroenterology*, 104(3), 630–638.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schäffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K. R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schröder, J. M., Bevins, C. L., Fellermann, K., & Stange, E. F. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*, 53(11), 1658–1664.

Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R. W., Chu, H., Lima, H., Jr, Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E. F., & Bevins, C. L. (2005). Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18129–18134.

Weinstock, J. V., Summers, R. W., Elliott, D. E., Qadir, K., Urban Jr, J. F., & Thompson, R. (2002). The possible link between de-worming and the emergence of immunological disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(6), 334–338.

Wei, S.-C., Ni, Y.-H., Yang, H.-I., Su, Y.-N., Chang, M.-C., Chang, Y.-T., Shieh, M.-J., Wang, C.-Y., & Wong, J.-M. (2011). A hospital-based study of clinical and genetic features of Crohn's disease. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, 110(9), 600–606.

Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–476, 478–481.

Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.-C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., & de Waal Malefyt, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17–producing helper T cells. *Nature Immunology*, 8(9), 950–957.

Winawer, S., Fletcher, R., Rex, D., Bond, J., Burt, R., Ferrucci, J., Ganiats, T., Levin, T., Woolf, S., Johnson, D., Kirk, L., Litin, S., & Simmang, C. (2003). Colorectal cancer screening and surveillance: Clinical guidelines and rationale—Update based on new evidence. *Gastroenterology*, 124(2), 544–560.

Winther, K. V., Jess, T., Langholz, E., Munkholm, P., & Binder, V. (2003). Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County. *Gastroenterology*, 125(6), 1576–1582.

WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. (2008). Retrieved October 6, 2011, from <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>

Wouters, M. M. (2011). New insight in the pathogenesis of functional gastrointestinal disorders: association between genetics and colonic transit. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 23(10), 893–

897.

Wurzelmann, J. I., Lyles, C. M., & Sandler, R. S. (1994). Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, *39*(3), 555–560.

Wyant, T., Leach, T., Sankoh, S., Wang, Y., Paolino, J., Pasetti, M. F., Feagan, B. G., & Parikh, A. (2015). Vedolizumab affects antibody responses to immunisation selectively in the gastrointestinal tract: randomised controlled trial results. *Gut*, *64*(1), 77–83.

Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, *448*(7152), 427–434.

Yang, L., Anderson, D. E., Baecher-Allan, C., Hastings, W. D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K., & Hafler, D. A. (2008). IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human TH17 cells. *Nature*, *454*(7202), 350–352.

Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, *7*(1), 85.

Zanello, G., Goethel, A., Forster, K., Geddes, K., Philpott, D. J., & Croitoru, K. (2013). Nod2 Activates NF- κ B in CD4⁺ T Cells but Its Expression Is Dispensable for T Cell-Induced Colitis. *PLoS ONE*, *8*(12), e82623.

Zeos, P., Kouklakis, G., Oikonomou, A., Pitiakoudis, M., & Simopoulos, C. (2010). Esophageal Crohn's disease treated "topically" with swallowed aerosolized budesonide. *Case Reports in Medicine*, 2010.

Zhang, F., Liu, H., Chen, S., Low, H., Sun, L., Cui, Y., Chu, T., Li, Y., Fu, X., Yu, Y., Yu, G., Shi, B., Tian, H., Liu, D., Yu, X., Li, J., Lu, N., Bao, F., Yuan, C., Liu, J., Liu, H., Zhang, L., Sun, Y., Chen, M., Yang, Q., Yang, H., Yang, R., Zhang, L., Wang, Q., Liu, H., Zuo, F., Zhang, H., Khor, C. C., Hibberd, M. L., Yang, S., Liu, J., & Zhang, X. (2011). Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nature Genetics*, *43*(12), 1247–1251.

9.4 Abkürzungen und Begriffe

A	<u>A</u> denin
Abk.	<u>A</u> bkürzung
AIEC	<u>A</u> dherent- <u>i</u> nvasive <u>E. coli</u>
APAF 1	<u>A</u> poptotic <u>p</u> rotease <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor <u>1</u>
APC	<u>A</u> ntigen- <u>p</u> resenting <u>c</u> ell
Appdy	<u>A</u> ppend <u>e</u> ctomy
ASCA	<u>A</u> nti- <u>S</u> accharomyces <u>c</u> erevisiae- <u>A</u> ntikörper
ATG16L1	<u>A</u> utophagy- <u>r</u> elated <u>16</u> - <u>l</u> ike <u>1</u>
bp	<u>B</u> asenpaare
BSG	<u>B</u> lutkörperchen- <u>S</u> enkungs- <u>G</u> eschwindigkeit
bzgl.	bezüglich
bzw.	<u>b</u> eziehu <u>n</u> gs <u>w</u> eise
C	<u>C</u> ytosin
Ca.	<u>C</u> irca
CARD15	<u>C</u> aspase <u>r</u> ecruitment <u>d</u> omain <u>15</u>
CCD	<u>C</u> harge- <u>c</u> oupled <u>D</u> evice
CD	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
cDNA	<u>C</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u>
CED	<u>C</u> hronisch <u>e</u> ntzündliche <u>D</u> armerkrankungen

CHOP	<i>C/EBP-homologous protein</i>
CMV	<i>Cytomegalievirus</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
C. ulcerosa	<i>Colitis ulcerosa</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
d.h.	<i>das heißt</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure (- acid)</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphate</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
e.g.	<i>Exempli gratia</i>
engl.	<i>englisch</i>
eQTL	<i>Expression quantitative trait loci</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
ERAD	<i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i>
evtl.	<i>eventuell</i>
ε	<i>Extinktionskoeffizient</i>
GATA	<i>GATA binding protein</i>
F	<i>Forward primer</i>

FL	<i><u>F</u>luorescein</i>
FAE	<i><u>F</u>ollikel-assoziertes <u>E</u>pithel</i>
FOXP	<i><u>F</u>orkhead box <u>P</u>3</i>
FRET	<i><u>F</u>luorescence <u>r</u>esonance <u>e</u>nergy <u>t</u>ransfer</i>
FRFSE	<i><u>F</u>ast <u>r</u>elaxation <u>f</u>ast <u>s</u>pin <u>e</u>cho sequence</i>
G	<i><u>G</u>oblet cell / <u>G</u>uanin</i>
GALT	<i><u>G</u>ut <u>a</u>ssociated <u>l</u>ymphoid <u>t</u>issue</i>
GBP	<i><u>G</u>uanylat-<u>b</u>indendes <u>P</u>rotein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GIT	<i><u>G</u>astrointestinaltrakt</i>
GTP	<i><u>G</u>uanosintri<u>p</u>hosfat</i>
GWAS	<i><u>G</u>enomweite <u>A</u>ssoziationsstudien</i>
HATH	<i><u>H</u>omologous to <u>a</u>mino <u>t</u>erminus of human <u>h</u>epatoma-derived <i>growth factor</i></i>
HD	<i><u>H</u>uman enteric <u>d</u>efensin</i>
IAPP	<i><u>I</u>slet <u>A</u>myloid <u>P</u>olypeptide</i>
IBDGC	<i><u>I</u>nflammatory <u>B</u>owel <u>D</u>isease <u>G</u>enetics <u>C</u>onsortium</i>
ICOS	<i><u>I</u>nducible <u>c</u>o-<u>s</u>timulatory molecule</i>
IFN- γ	<i><u>I</u>nterferon-γ</i>

Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
IRGM	<i><u>I</u>mmunity-<u>r</u>elated <u>G</u>TPase <u>M</u></i>
iTregs	<i><u>I</u>nduced <u>r</u>egulatory <u>T</u> cells</i>
i.v.	<u>i</u> ntravenös
JNK	<i><u>c</u>-<u>J</u>un <u>N</u>-terminal <u>k</u>inases</i>
KI	<u>K</u> onfiden <u>i</u> ntervall
KLF	<i><u>K</u>rüppel-<u>l</u>ike <u>f</u>amily of transcription factors</i>
L/l	<u>L</u> iter
LC610	<i><u>L</u>ight<u>C</u>ycler-<u>R</u>ed <u>6</u>1<u>0</u></i>
LC640	<i><u>L</u>ight<u>C</u>ycler-<u>R</u>ed <u>6</u>4<u>0</u></i>
LED	<u>L</u> ichtemittierende <u>D</u> iode
LNA	<i><u>L</u>ocked <u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>
M	<i><u>M</u>icrofold</i>
m-...	<u>M</u> illi-...
MAF	<u>M</u> inor- <u>A</u> llel- <u>F</u> requenzen
M. Crohn	<u>M</u> orbus <u>C</u> rohn
MgCl	<u>M</u> agnesium <u>c</u> hlorid
MHC	<i><u>M</u>ajor <u>H</u>istocompatibility <u>C</u>omplex</i>

Min.	<u>Minuten</u>
miR	<u>MicroRNA</u>
MR	<u>Magnetresonanz</u>
n-...	<u>Nano-...</u>
n.d.	<i><u>no date</u></i>
NF-κB	<i><u>Nuclear factor kappa B</u></i>
NIDDK	<i><u>National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney diseases</u></i>
NKT	<i><u>Natural killer cells</u></i>
NOD1/2	<i><u>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1/2</u></i>
n.s.	<u>nicht-signifikant</u>
NSAIA	<i><u>Nonsteroidal anti-inflammatory agents</u></i>
OCP	<i><u>Oral contraceptive pills</u></i>
OD	<u>Optische Dichte</u>
OP	<u>Operation</u>
OR	<i><u>Odds Ratio</u></i>
p.	<i><u>Page</u></i>
P	<i><u>Paneth cell</u></i>
p-...	<u>Pico-...</u>
pANCA	<u>Perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper</u>

PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>
pH	<i><u>P</u>ondus / <u>P</u>otentia <u>H</u>ydrogenii</i>
PRR	<i><u>P</u>attern <u>r</u>ecognition <u>r</u>eceptor</i>
PXR/NR1I2	<i><u>P</u>regnane <u>X</u> receptor</i>
R	<i><u>R</u>everse primer</i>
RNA	<i><u>R</u>ibonukleinsäure (- <u>a</u>cid)</i>
ROR γ t	<i><u>R</u>etoid-related <u>o</u>rphan <u>r</u>eceptor γt</i>
ROS	<i><u>R</u>eactive <u>o</u>xygen <u>s</u>pecies</i>
RUNX	<i><u>R</u>unt-related transcription factor</i>
SA	<i><u>S</u>tandardabweichung</i>
Sek.	<i><u>S</u>ekunden</i>
STAT	<i><u>S</u>ignal <u>t</u>ransducer and <u>a</u>ctivator of <u>t</u>ranscription</i>
T	<i><u>T</u>hymine</i>
Taq	<i><u>T</u>hermus <u>a</u>quaticus</i>
TBE-Puffer	<i><u>T</u>ris-, <u>B</u>orat- und <u>E</u>DTA-<u>P</u>uffer</i>
T-bet	<i><u>T</u> box expressed in <u>T</u> cells</i>
TCF	<i><u>T</u>ranscription factor</i>
TE-Puffer	<i><u>T</u>ris- und <u>E</u>DTA-<u>P</u>uffer</i>
Tfh	<i><u>F</u>ollicular <u>h</u>elper <u>T</u> cell</i>

TGF- β	<i><u>T</u>ransforming growth factor <u>b</u>eta</i>
Th-Zellen	<i><u>T</u>-<u>H</u>elferzellen</i>
TLR	<i><u>T</u>oll-<u>l</u>ike <u>R</u>ezeptoren</i>
TNF	<i><u>T</u>umornekrosefaktor</i>
TNFSF15	<i><u>T</u>umor <u>n</u>ecrosis factor ligand <u>s</u>uperfamily member <u>15</u></i>
Treg	<i><u>R</u>egulatory <u>T</u> cell</i>
u.a.	<i><u>u</u>nter <u>a</u>nderem / <u>u</u>nter <u>a</u>nderen</i>
UPR	<i><u>U</u>nfolded protein <u>r</u>esponse</i>
u.U.	<i><u>u</u>nter <u>U</u>mständen</i>
UV	<i><u>U</u>ltraviolett</i>
μ -...	<i>Micro-...</i>
vs.	<i><u>v</u>ersus</i>
Wnt	<i><u>W</u>ingless, <u>I</u>nt-1</i>
WTCCC	<i><u>W</u>ellcome <u>T</u>rust <u>C</u>ase <u>C</u>ontrol <u>C</u>onsortium</i>
XBP1	<i><u>X</u>-box <u>b</u>inding protein <u>1</u></i>
YRI	<i><u>Y</u>oruba in <u>I</u>badan, Nigeria</i>
z.B.	<i><u>z</u>um <u>B</u>eispiel</i>
z.T.	<i><u>z</u>um <u>T</u>eil</i>
5-ASA	<i><u>5</u>-aminosalicylic <u>a</u>cid</i>

9.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Stephan Brand danken für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas, die Ermöglichung der Teilnahme am Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe), und nicht zuletzt für die hervorragende Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an meinen Betreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dipl.-Biol. Jürgen Glas für die zuverlässige und kompetente Betreuung, insbesondere auch bei der Lösung von Problemen im Rahmen der Arbeit im Labor.

Ich danke auch meinen Mit-Doktoranden, an erster Stelle Johannes Stallhofer, für die hilfreiche Einarbeitung, seine Zeit und seine Geduld, ebenso Eleni Tsekeri, Johanna Wagner, Christoph Fries und Melinda Nagy. Auch allen Doktoranden, deren gewonnene Daten für diese Arbeit unverzichtbar waren, danke ich herzlich: Fabian Schnitzler (*NOD2*), Martin Wetzke (*IL23R*) und Silke Schmechel, zusammen mit Jürgen Glas (*ATG16LI*).

Mein Dank gilt außerdem sämtlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, besonders Prof. Dr. med. Thomas Ochsenkühn und Prof. Dr. med. Julia Seiderer-Nack.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen Beteiligten des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe). Ich habe sehr von der Teilnahme am Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ und „Systembiologische Medizin“, der Ringvorlesung sowie dem Methodenkolloquium profitiert. Auch die finanzielle Unterstützung erleichterte mir das Studium und diese Arbeit sehr.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Penelope und Wolfgang Bues, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben. Sie stärkten mir stets den Rücken und glaubten an mich. Ohne sie hätte ich es nie bis hierher geschafft.

Besonders möchte ich auch meiner Schwester, Sonia Bues, danken. Sie war eine wundervolle und unverzichtbare Unterstützung während dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund, Till Reiter. Seine liebevolle Unterstützung und konsequente Motivation haben mich bis hierher gebracht. Vielen Dank.

9.6 Lebenslauf

Name: Bues

Vorname(n): Stephanie Kathrin Silke

Geburtsdatum: 10.02.1984

Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Anstellung:

Seit 09/2012: Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin,
Charité, Campus Benjamin Franklin

09/2010-09/2012: Klinik für Kardiologie und Angiologie, Charité, Campus Mitte

Studium:

04/2006-04/2010: Ludwig-Maximilians-Universität München; Studium der
Humanmedizin

04/2010: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2004-04/2006: Johannes Gutenberg Universität Mainz; Studium der
Humanmedizin

04/2006: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

10/2009-01/2010: 3. Tertial: Klinikum Großhadern, München

Wahlfach Anästhesiologie: Anästhesie; Anästhesiologische Intensivstation

06/2009-10/2009: 2. Tertial: Kantonsspital Baden, Baden, Schweiz

Chirurgie: Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie; Orthopädie und Unfallchirurgie; Chirurgische Notaufnahme

02/2009-06/2009: 1. Tertial: Queen Elizabeth Hospital Woolwich, London, Großbritannien

Innere Medizin: Cardiology Department / Coronary Care Unit; Acute Medicine / Emergency Department

Famulaturen:

08/2007-09/2007: Klinikum rechts der Isar, München

Medizinische Notaufnahme

02/2007-03/2007: Klinikum rechts der Isar, München

Klinik für Anästhesiologie

08/2006-09/2006: Deutsches Herzzentrum, München

Innere Medizin / Kardiologie

Stipendium:

07/2008-12/2009: Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe)

Teilnahme am Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ und „Systembiologische Medizin“ der LMU einschließlich der Ringvorlesung und des Methodenkolloquiums

Wissenschaftliche Publikation:

Glas J, Seiderer J, **Bues S**, Stallhofer J, Fries C, Olszak T, Tsekeri E, Wetzke M, Beigel F, Steib C, Friedrich M, Göke B, Diegelmann J, Czamara D, Brand S. *IRGM* Variants and Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease in the German Population. *PLoS ONE*. 2013; 8(1): e54338.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

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

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

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand