

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Die Rolle von *IL12B*- und *PTPN2*-Polymorphismen
bei der Pathogenese
chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**



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

vorgelegt von Johanna Wagner
aus Deggendorf

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Brand

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sibylle Koletzko
Prof. Dr. Hermann S. Fießl

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

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2014

**Meinen Eltern
und meinem Bruder Matthias
gewidmet.**

Vorbemerkungen

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre (Promotionsstudiengang Molekulare Medizin) in den Forschungslaboratorien der Medizinischen Klinik II - Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Betreut wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. med. Stephan Brand. Der praktische Teil der Arbeit wurde von 2008 bis 2011 durchgeführt. Statistische Auswertung und Publikation der Ergebnisse erfolgten in den Jahren 2011 und 2012. Die schriftliche Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit wurde 2012/2013 abgeschlossen.

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Originalarbeiten

1. Tillack C., Ehmann L. M., Friedrich M., Laubender R. P., Papay P., Vogelsang H., Stallhofer J., Beigel F., Bedynek A., Wetzke M., Maier H., Koburger M., **Wagner J.**, Glas J., Diegelmann J., Koglin S., Dombrowski Y., Schaubert J., Wollenberg A., Brand S. (2013). Anti-TNF antibody-induced psoriasiform skin lesions in patients with inflammatory bowel disease are characterised by interferon-gamma-expressing Th1 cells and IL-17A/IL-22-expressing Th17 cells and respond to anti-IL-12/IL-23 antibody treatment.

Gut. 2013 Mar 6. [Epub ahead of print]

2. Glas J.*, **Wagner J.***, Seiderer J., Olszak T., Wetzke M., Beigel F., Tillack C., Stallhofer J., Friedrich M., Steib C., Göke B., Ochsenkühn T., Karbalai N., Diegelmann J., Czamara D., Brand S. (2012). *PTPN2* gene variants are associated with susceptibility to both Crohn's disease and ulcerative colitis supporting a common genetic disease background.

PLoS One, 7(3), e33682. doi: 10.1371/journal.pone.0033682. Epub 2012 Mar 21.

* **geteilte Erstautorenschaft**

3. Glas J.*, Seiderer J.*, **Wagner J.**, Olszak T., Fries C., Tillack C., Friedrich M., Beigel F., Stallhofer J., Steib C., Wetzke M., Göke B., Ochsenkühn T., Diegelmann J., Czamara D., Brand S. (2012). Analysis of IL12B gene variants in inflammatory bowel disease.
PLoS One, 7(3), e34349. doi: 10.1371/journal.pone.0034349. Epub 2012 Mar 30.
4. 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. *J Gastroenterol* 45(7), 721-731. doi: 10.1007/s00535-010-0231-7. Epub 2010 Apr 29.
5. 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., Göke 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. *Am J Gastroenterol* 105(8), 1811-1819. doi: 10.1038/ajg.2010.95. Epub 2010 Mar 2.

Publizierte Abstracts und Kongressbeiträge

Wagner J., Glas J., Seiderer J., Göke B., Ochsenkühn T., Diegelmann J., Brand S., Variants in the *PTPN2* Gene Are Associated With Susceptibility to Both Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the German Population

Digestive Disease Week. May 7-10, 2011, Chicago, USA. Sa1291

Wagner J., Glas J., Seiderer J., Tillack C., Göke B., Ochsenkühn T., Diegelmann J., Brand S., Analysis of *IL12B* Gene Variants in German Patients With Inflammatory Bowel Disease

Digestive Disease Week. May 7-10, 2011, Chicago, USA. Su1738

Wagner J.*, Glas J.*, Seiderer J., Tillack C., Göke B., Ochsenkühn T., Diegelmann J., Brand S., Gene variants in the *IL12B* gene are not associated with susceptibility to inflammatory bowel disease in the German population.

United European Gastroenterology Week, Barcelona (Spain), October 23-27, 2010.

Gut 2010;59(Suppl. 2): P1468.

Wagner J.*, Glas J.*, Seiderer J., Ochsenkühn T., Göke B., Diegelmann J., Brand S. *PTPN2* polymorphisms are associated with susceptibility to both Crohn's disease and ulcerative colitis in the German population.

United European Gastroenterology Week, Barcelona (Spain), October 23-27, 2010.

Gut 2010;59(Suppl. 2): P1470.

1 Inhalt

1	Inhalt	7
2	Einleitung	10
2.1	<i>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen</i>	<i>10</i>
2.1.1	Allgemeine Angaben und historische Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	10
2.1.2	Epidemiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	11
2.1.3	Morbus Crohn – Einführung in das Krankheitsbild	13
2.1.4	Colitis ulcerosa – Einführung in das Krankheitsbild	20
2.1.5	Therapieansätze bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	22
2.1.6	Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen	27
2.2	<i>Genetik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen</i>	<i>31</i>
2.2.1	Ansätze zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene	31
2.2.2	Der Einfluss genetischer Faktoren auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen	
2.2.3	<i>IL23R</i> und <i>IL12B</i> - Lokalisation, Funktion und Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	37
2.2.4	<i>PTPN2</i> - Lokalisation, Funktion und Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	42
3	Zielsetzung	46
4	Material und Methoden	47
4.1	<i>Studiendesign und Studienpopulation</i>	<i>47</i>
4.1.1	Studiendesign	47
4.1.2	Studienpopulation.....	47
4.1.3	Phänotypisierung.....	49
4.2	<i>Materialien für molekularbiologische Experimente</i>	<i>49</i>
4.3	<i>Primer und Sonden.....</i>	<i>50</i>
4.4	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>53</i>
4.5	<i>Geräte und Software.....</i>	<i>53</i>
4.6	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>54</i>
4.6.1	DNA-Isolierung aus Blutproben	54
4.6.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	55

1. Inhalt	8
4.6.3 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
4.6.4 Agarose-Gelelektrophorese	56
4.6.5 Sequenzierung	57
4.7 Genotypisierung von SNPs mittels Real-Time-PCR	58
4.7.1 Genotypisierung von <i>IL12B</i> - und <i>PTPN2</i> -Polymorphismen	58
4.7.2 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-time-PCR)	58
4.7.3 Schmelzkurventechnologie	59
4.7.4 HybProbe-Sondenformat und Fluorescence Resonance Energy Transfer	60
4.7.5 Genotypisierung von <i>STAT4</i> - und <i>IL23R</i> -Polymorphismen	62
4.7.6 Genotypisierung von <i>NOD2</i> - und <i>ATG16L1</i> -Polymorphismen	63
4.8 <i>In silico</i> -Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen	63
4.9 Statistische Auswertung	64
5 Ergebnisse	65
5.1 Suszeptibilitäts-Analyse von <i>IL12B</i> - und <i>PTPN2</i> -Polymorphismen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	65
5.1.1 <i>IL12B</i> -Polymorphismen und ihre Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	65
5.1.2 <i>PTPN2</i> -Polymorphismen und ihre Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	66
5.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse	67
5.2.1 <i>IL12B</i> -Polymorphismen: Genotyp-Phänotyp-Analyse	67
5.2.2 <i>PTPN2</i> -Polymorphismen: Genotyp-Phänotyp-Analyse	70
5.3 Haplotyp-Analyse	75
5.3.1 Analyse von <i>IL12B</i> -Haplotypen bezüglich ihrer Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	75
5.3.2 Analyse von <i>PTPN2</i> -Haplotypen bezüglich ihrer Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	76
5.4 Epistasis-Analyse	76
5.4.1 Analyse der Gen-Gen-Interaktion von <i>IL12B</i> mit dem <i>IL23R</i> - bzw. <i>STAT4</i> -Gen	76
5.4.2 Analyse der Gen-Gen-Interaktion zwischen <i>PTPN2</i> und den wichtigsten M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen <i>NOD2</i> , <i>IL23R</i> und <i>ATG16L1</i>	77

5.5	<i>Der Einfluss von IL12B-SNPs auf dermatologische Nebenwirkungen von Anti-TNF-Antikörpern bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i>	80
5.6	<i>In silico-Analyse bezüglich der Modulation des Bindungsverhaltens von Transkriptions-Faktoren durch IL12B- und PTPN2-SNPs</i>	84
5.6.1	Der Einfluss von <i>IL12B</i> -SNPs auf das Bindungsverhalten von Transkriptions-Faktoren und die Genexpression von <i>IL12B</i>	84
5.6.2	Der Einfluss von <i>PTPN2</i> -SNPs auf das Bindungsverhalten von Transkriptions-Faktoren und die Genexpression von <i>PTPN2</i>	87
6	Diskussion	88
6.1	<i>Die Rolle des IL12B-Gens bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i>	88
6.1.1	<i>IL12B</i> als Suszeptibilitäts-gen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Ergebnisse und Grenzen der Assoziationsstudie	88
6.1.2	Die Assoziation von <i>IL12B</i> -Polymorphismen mit phänotypischen Merkmalen..	92
6.1.3	Ergebnisse der Epistasis-Analyse: <i>IL12B</i> in der Interaktion mit anderen M. Crohn-Suszeptibilitäts-Genen	93
6.1.4	Ausblick: neue Ansätze zur Therapie Anti-TNF-induzierter psoriasiformer Hautläsionen, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und weiterer Autoimmunerkrankungen	93
6.1.5	Funktionelle Konsequenzen von <i>IL12B</i> -SNPs in der <i>in silico</i> -Analyse	100
6.2	<i>Die Rolle des PTPN2-Gens bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i>	103
6.2.1	<i>PTPN2</i> als gemeinsames Suszeptibilitäts-gen von M. Crohn und C. ulcerosa ...	103
6.2.2	Die krankheitsmodifizierende Rolle von <i>PTPN2</i> für M. Crohn und C. ulcerosa	
6.2.3	Die Gen-Gen-Interaktion von <i>PTPN2</i> mit den wichtigsten CED-Suszeptibilitäts-genen <i>NOD2</i> , <i>IL23R</i> und <i>ATG16L1</i>	104
6.2.4	Funktionelle Konsequenzen von <i>PTPN2</i> in der <i>in silico</i> -Analyse	107
7	Zusammenfassung	111
8	Abkürzungen und Begriffe	113
9	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	116
10	Anhang	120
11	Danksagung	122
12	Literaturverzeichnis	123

2 Einleitung

2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

2.1.1 Allgemeine Angaben und historische Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (engl. *inflammatory bowel disease*) sind rezidivierende oder kontinuierlich entzündliche Erkrankungen des Verdauungstraktes. Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa (C. ulcerosa) sind die zwei wichtigsten Vertreter und zeichnen sich durch eine unkontrollierte Entzündung der intestinalen Mukosa aus (detaillierte Einführung in beide Krankheitsbilder unter 2.1.3 und 2.1.4). Im Gegensatz zur physiologischen Entzündungsreaktion fehlt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die Regulation der Immunantwort, wodurch das Immunsystem permanent aktiviert bleibt und der Darm chronisch entzündet ist [1]. Die Ursachen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind nach wie vor nicht vollständig geklärt.

Überblick über die historische Entwicklung

Die in ihrer Inzidenz zunehmenden Krankheiten stellen vor allem ein Problem des späten 20. und des 21. Jahrhunderts dar. Erste Fallbeschreibungen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen finden sich jedoch bereits vor Beginn des 18. Jahrhunderts. Mit dem heutigen Wissensstand lassen sich die historischen Berichte zu Symptomen, klinischen Zeichen und Autopsiebefunden auch nachträglich verdachtsweise M. Crohn und Colitis ulcerosa zuordnen.

Als einer der ersten verfasste Gullielmus Fabricius Hildenus 1612 einen Autopsiebericht, in dem er den Fall eines Jungen schildert, welcher nach persistierenden abdominellen Schmerzen und Diarrhö verstarb. Über 150 Jahre später ging G.B. Morgagni 1769 in seinem „*De Sedibus et Causis Morborum*“ auf ein Krankheitsbild ein, das heute vermutlich den Namen M. Crohn tragen würde [1,2,3]. Viele weitere Fallbeschreibungen folgten, bevor schließlich 1932 Burrill B. Crohn vom Mount Sinai Hospital in New York zusammen mit Kollegen sein einschlägiges Paper im *Journal of the American Medical Association (JAMA)* veröffentlichte [4,5]. Darin wurde das klinische Krankheitsbild mit Hauptlokalisation im terminalen Ileum (Ileitis terminalis) erstmals umfassend beschrieben.

“We propose to describe, in its pathologic and clinical details, a disease of the terminal ileum, affecting mainly young adults, characterized by a subacute or chronic necrotizing and cicatrizing inflammation. The ulceration of the mucosa is accompanied by a disproportionate connective tissue reaction of the remaining walls of the involved intestine, a process which frequently leads to stenosis of the lumen of the intestine, associated with the formation of multiple fistulas.” [4]

Erst 1960 wurde mit Veröffentlichung der Paper von Lockhart-Mummery und Morson allgemein anerkannt, dass eine Dickdarmbeteiligung häufig mit einer Ileitis terminalis einhergeht [6,7]. Das damit identifizierte Krankheitsbild erhielt den Namen Morbus Crohn.

Der historische Kontext der C. ulcerosa lässt sich nicht gleichermaßen eindeutig nachvollziehen. Die erste wichtige Veröffentlichung zu C. ulcerosa durch Samuel Wilks aus London (1859) stellte sich im Nachhinein als ein Fall von M. Crohn heraus. Ein Bericht von Wilks und Moxon aus dem Jahre 1875 beschreibt hingegen einen frühen Fall von C. ulcerosa. Im Verlauf des 20. Jahrhunderts wurden sowohl in Europa als auch in den Vereinigten Staaten weitere Fälle von „C. ulcerosa“ gemeldet. Während man sich am Beginn der Forschungen auf eine bloße Beschreibung von Symptomen und pathologischem Befund beschränken musste, wurde zu Zeiten Robert Kochs (1882) eine Differenzierung der chronischen Entzündungsreaktion zu bakteriell verursachten Darmerkrankungen möglich [8,9]. Vollständig geklärt ist die hochkomplexe Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen jedoch bis heute nicht [10,11].

2.1.2 Epidemiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Da die genaue Ätiologie von M. Crohn und C. ulcerosa nach wie vor unklar ist, sind epidemiologische Betrachtungen von besonderer Bedeutung. Allgemein gilt zu beachten, dass sich eine Erfassung der Häufigkeit chronisch entzündlicher Darmerkrankungen aus verschiedensten Gründen als komplexes Problem darstellt. Die relative Seltenheit und ein zeitlich unklarer Erkrankungsbeginn sind ebenso ausschlaggebend wie die große Komplexität der klinischen Symptome sowie Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung. Unterschiede in der Verfügbarkeit diagnostischer Mittel müssen genauso bedacht werden wie mögliche Defizite bei der Erfassung wenig symptomatischer Fälle, welche rein ambulanter Behandlung unterliegen [12,13].

In Deutschland beträgt die Inzidenz des M. Crohn aktuell etwa 5-8 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Prävalenz beläuft sich auf 30-55, laut neueren Zahlen auf 120-200 Erkrankte pro 100.000 Einwohner [12,14s,15]. Eine Zunahme der Inzidenz in den letzten Jahrzehnten konnte durch Studien belegt werden [16]. Für C. ulcerosa wird die Inzidenz in Deutschland auf etwa 2-5 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr geschätzt. Die Prävalenz wird mit etwa 25-50 Erkrankten pro 100.000 Einwohner angegeben. In anderen europäischen Ländern ($5-25/10^5/\text{Jahr}$) und in Nordamerika ($7-14/10^5/\text{Jahr}$) finden sich etwas höhere Inzidenzen, in Asien ($<2/10^5/\text{Jahr}$) eine niedrigere [14].

Weder dem Robert-Koch-Institut noch dem Statistischen Bundesamt lagen im April 2011 konkrete aktuellere Daten zu Inzidenz und Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in Deutschland vor. Letzteres dokumentiert lediglich Daten vollstationärer Behandlung. (Persönliche Kommunikation mit Robert-Koch-Institut und Statistischem Bundesamt vom 20.04.2011).

Inzidenz und Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind stark abhängig von Herkunftsland und ethnischem Hintergrund. Im Norden Europas und in Nordamerika finden sich weltweit die höchsten Inzidenzraten für M. Crohn und C. ulcerosa [17]. Schwarze sind jeweils seltener betroffen als Weiße und die jüdische Bevölkerung trägt weltweit das höchste Risiko. Kaukasier und Aschkenazim-Juden sind generell am häufigsten betroffen, Menschen asiatischer Abstammung eher selten. Dies gibt Hinweise auf genetische Zusammenhänge (siehe 2.2). Geografisch findet sich ein Nord-Süd-Gefälle und in geringerem Maße ein West-Ost-Gefälle.

Die größere Prävalenz in westlichen Industrienationen im Vergleich zum ostasiatischen Raum lässt Rückschlüsse auf den Einfluss von Umweltfaktoren zu [18,19,20]. Verstärkt wird diese Vermutung durch die Inzidenzzunahme, die in den letzten Jahren in Asien und in so genannten Schwellenländern beobachtet werden konnte. In Japan hat sich die Gesamtzahl Betroffener seit den 1990er Jahren verdreifacht. Dies könnte u.a. auf den erhöhten Konsum von Zucker und Fast-Food zurückzuführen sein [21]. Zunehmend etablieren sich in asiatischen Ländern dem „westlichen Lebensstil“ ähnliche Lebensgewohnheiten. Veränderungen von Ernährungsverhalten und Tabakkonsum sowie Unterschiede in Sonnenlichtexposition, Luftverschmutzung und Kontakt mit industriellen Chemikalien sind zu beobachten. Dies kann als Grund für die Inzidenzzunahme chronisch entzündlicher Darmerkrankungen angenommen werden.

Zusätzlich finden sich Differenzen zwischen urbaner und ländlicher Bevölkerung, was die Hypothese, dass auch Hygienebedingungen Einfluss auf die Entstehung chronisch

entzündlicher Darmerkrankungen haben, untermauert (siehe 2.1.6). Die Unterschiede in der Erreichbarkeit medizinischer Versorgung sollten ebenfalls bedacht werden. Weltweit variiert die Qualität der Gesundheitssysteme sehr stark. Die Vermutung liegt nahe, dass bessere diagnostische Möglichkeiten Auswirkungen auf höhere Fallzahlen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen haben. Am Beispiel Japans und Koreas zeigt sich jedoch, dass diese These allein die Unterschiede nicht erklärt [18,22].

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen können in jedem Lebensalter auftreten. Erkrankungsgipfel finden sich zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr und in geringerer Ausprägung zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Es handelt sich also vor allem um eine Krankheit junger Menschen. 30% der Patienten sind noch vor dem 20. Lebensjahr betroffen [23,24]. Die Geschlechterverteilung ist annähernd ausgeglichen. C. ulcerosa findet sich etwas öfter bei Männern, wohingegen Frauen häufiger von M. Crohn betroffen sind [25]. Beide Erkrankungen treten familiär gehäuft auf.

Trotz geringer Mortalität handelt es sich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen um sehr ernste Krankheitsbilder. Patienten haben oft unter Krankheitssymptomen und Medikamentennebenwirkungen zu leiden und sind in ihrer Lebensqualität deutlich eingeschränkt. Gezielte Diagnostik, Therapie und engmaschige interdisziplinäre Betreuung sind daher besonders wichtig. Bezüglich des Einflusses von Umweltfaktoren gibt es Unterschiede zwischen M. Crohn und C. ulcerosa [25,26,27].

2.1.3 Morbus Crohn – Einführung in das Krankheitsbild

Bei M. Crohn, auch bekannt unter dem Namen Ileitis terminalis, handelt es sich um eine diskontinuierlich segmental auftretende Entzündung. Diese kann den gesamten Gastrointestinaltrakt vom Mund bis zum Anus befallen. Bedingt durch stark variierendes Ausmaß und Lokalisation der Entzündung präsentiert sich der M. Crohn oft mit einem variableren klinischen Erscheinungsbild als eine C. ulcerosa (vgl. schematische Darstellung in Abbildung 1). Auf das Krankheitsbild der C. ulcerosa wird unter 2.1.4 detaillierter eingegangen.

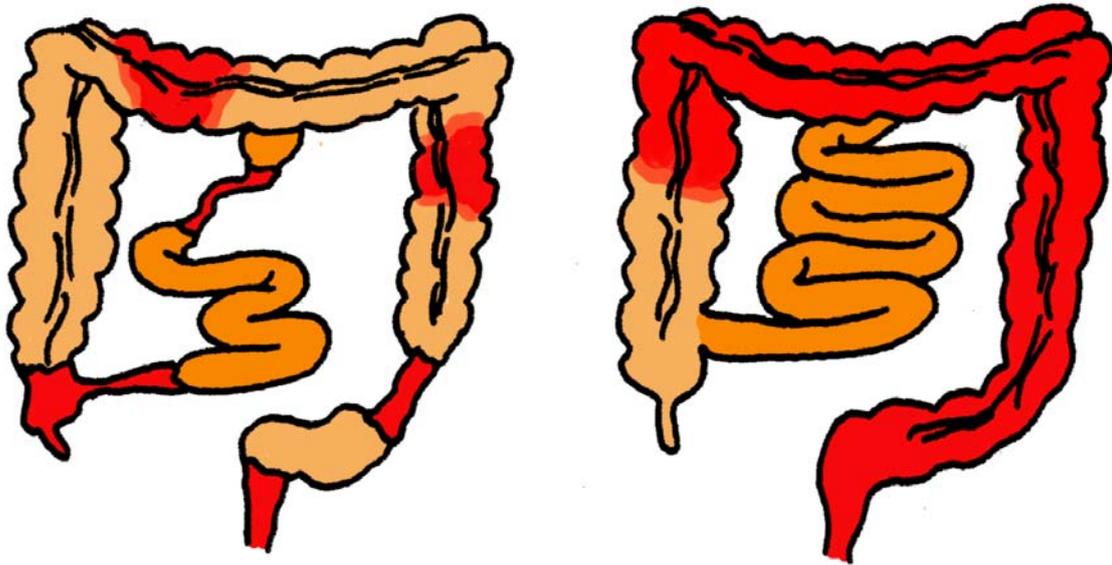


Abbildung 1. Verteilung des Entzündungsmusters bei M. Crohn (links) und C. ulcerosa (rechts).

Klinische Manifestation

Typisch für chronisch entzündliche Darmerkrankungen ist ein schubhafter Verlauf, d.h. ein Wechsel zwischen aktiven Krankheitsphasen (=Schub) und Perioden klinischer Beschwerdefreiheit (=Remission) [28]. Krampfartige Bauchschmerzen (vor allem im rechten unteren Quadranten), anhaltende Diarrhöen, Fieber und Zeichen der Mangelernährung (Gewichtsverlust, Hypoalbuminämie, Eisenmangelanämie, Malabsorptionssyndrom, Vitaminmangel) sowie tastbare Resistenzen im Abdomen prägen das klinische Bild eines M. Crohn.

Ein durch die Malabsorption verursachter Vitamin-B₁₂-Mangel kann zur megaloblastären Anämie und assoziierten Symptomen führen. Die klinische Symptomatik hängt stark von Lokalisation und Ausmaß der Erkrankung ab, welche in drei Hauptformen auftritt. So kann sich ein M. Crohn als (1.) entzündliche, nicht-stenosierende, nicht-penetrierende Erkrankung manifestieren oder als (2.) fibrostenotisch-obstruierend. Häufig finden sich Mischformen zwischen fibrostenotisch-obstruierender (2.) und dritter (3.) penetrierender und fistulierender Form [14]. Die Montreal-Klassifikation (siehe Tabelle 3 unter 4.1.1) teilt die häufigsten Krankheitsverläufe systematisch ein [29], ist jedoch in ihrer Differenzierung begrenzt, da sie nicht alle Übergangsformen berücksichtigt.

Ist der Dünndarm von der Entzündung betroffen, kommt es zu Resorptionsstörungen und Verlust unter anderem von Gallensäuren und Fettsäuren. Dadurch bedingt haben die Patienten

mit Diarrhöen zu kämpfen. Im Gegensatz dazu kann es aber auch zu Obstruktionsbeschwerden kommen. Diese entstehen in Folge narbiger Stenosen oder aufgrund eines entzündlich veränderten verengten Darmlumens.

Analfissuren und Fisteln sind charakteristisch für M. Crohn. Oft kommt es im Krankheitsverlauf zu Perforationen und peritonealen Abszessen. In der Mundhöhle finden sich schmerzhafte Ulzera und Aphten [26,30].

Makroskopische Veränderungen

Am häufigsten zeigt sich eine Lokalisation des M. Crohn im terminalen Ileum und proximalen Kolon. Die transmurale, d.h. alle Wandschichten des Darms betreffende Entzündung führt typischerweise segmental zur ödematösen und fibrotischen Verdickung der Darmwand, zur entzündlichen Schwellung der Schleimhaut und zur Ausbildung von Fissuren, Fisteln und Stenosen. Engstellen bleiben oft auch nach Abheilen des Schubes bestehen.

Zwischen den befallenen Darmabschnitten finden sich scharf abgrenzbare makroskopisch unauffällige Areale. Die ausgesparten Bereiche gesunder Schleimhaut bezeichnet man als *skip lesions*. Endoskopisch zeigen sich beim M. Crohn Aphten und Ulzerationen. Häufig bilden sich in der Folge Fissuren und Fisteln. Bei höherer Krankheitsaktivität zeigt sich durch das Nebeneinander von Inseln entzündeter und gesunder Mukosa ein typisches Pflastersteinrelief, welches als pathognomonisch für den M. Crohn gilt [14].

Wie auch bei der C. ulcerosa kann es zur Ausbildung von Pseudopolypen kommen.

Mikroskopische Veränderungen

Auch histologisch lässt sich die beim M. Crohn typische transmurale Entzündungsreaktion erkennen [31]. Am Beginn der Erkrankung finden sich entzündlich veränderte Krypten (Kryptitis) und Kryptenabszesse, die in Erosionen und Ulzerationen übergehen können. Weitete sich dieser Entzündungsprozess aus, kommt es zum Einwandern und zur Proliferation von Makrophagen und verschiedenen anderen inflammatorischen Zellen. Die transmurale Entzündung führt zu einem Lymphödem, zur Darmwandverdickung und kann in eine Fibrose übergehen. Pathognomonisch für einen M. Crohn sind Epitheloidzellgranulome (nicht verkäsend) [31], die in der Lamina propria, Submukosa, Muskularis oder Subserosa auftreten können, aber auch in Lymphknoten, Peritoneum und Leber vorkommen. In etwa 40% der Fälle können die charakteristischen Granulome und mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen

werden. Eine Hyperplasie der Peyer-Plaques und lokaler Lymphknoten lässt sich bei vielen Patienten beobachten.

Komplikationen

Zur Ausbildung von Fisteln und Stenosen kommt es bei etwa 60% der Patienten [32]. Eine ebenso häufige Komplikation stellt die Ausbildung von Abszessen dar. Damit einhergehend sind Fieberschübe, abdomineller Druckschmerz und Gewichtsverlust. Narbige Veränderungen und akute entzündliche Schwellung führen zu Stenosen. Außerdem kann es zu Perforationen kommen. Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist das relative Risiko für karzinomatöse Entartungen sowohl des Dick- als auch des Dünndarmes bei Patienten mit M. Crohn erhöht. Auch extraintestinale Manifestationen sind zu den Komplikationen zu rechnen [14].

Extraintestinale Manifestation

Extraintestinale Symptome treten häufig parallel zur Aktivität der Darmerkrankung auf. Haut, Augen, Gelenke und Leber können betroffen sein [33,34].

Beim M. Crohn kommt es gehäuft zu Gelenkbeteiligungen, wie etwa HLA-B27-assoziiertes Spondylitis ankylosans (M. Bechterew) und oligoartikulärer peripherer Arthritis. Am Auge kann sich ein M. Crohn in Form einer Episkleritis, Iritis, Uveitis und Keratitis manifestieren.

Aphthen (u.a. im Bereich der Mundschleimhaut), Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum und Zinkmangeldermatosen sind typische Hauterkrankungen bei Patienten mit M. Crohn. Seltener als bei der C. ulcerosa kommt es zur primär sklerosierenden Cholangitis der Leber [33].

Bei Kindern kann es zu Wachstumsstörungen kommen. Liegt ein Malabsorptionssyndrom vor, kann dieses zu Gewichtsverlust oder Vitamin-B₁₂-Mangel und in der Folge zur Anämie führen.

Ein ursächlicher Zusammenhang der genetischen Prädisposition chronisch entzündlicher Darmerkrankungen mit den extraintestinalen Manifestationen ist wahrscheinlich und wird detaillierter in Abschnitt 6 diskutiert.

Häufige Nebenwirkungen der Steroidtherapie wie Osteoporose, Diabetes, Infektionen und Linsentrübung sollten im Krankheitsverlauf ebenfalls Beachtung finden.

Diagnostik

Um die Diagnose eines M. Crohn stellen zu können, bedarf es einer detaillierten Anamnese, der genauen Kenntnis des klinischen Erscheinungsbilds und einer Kombination aus laborchemischen, radiologischen, endoskopischen und histologischen Befunden.

Chronisch rezidivierende Verläufe in der Anamnese lassen einen akuten Infekt eher unwahrscheinlich erscheinen und sollten den Verdacht auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen lenken. Die Inspektion der Perianalregion ist bei der körperlichen Untersuchung unabdingbar, da Fistelbildungen in diesem Bereich bei M. Crohn sehr häufig vorkommen, wohingegen sie bei akutem Infekt oder C. ulcerosa eher untypisch sind. Eine Kombination aus druckschmerzhafter, tastbarer Resistenz im rechten Unterbauch, Durchfällen und kolikartigen Schmerzen spricht – insbesondere nach Ausschluss einer Appendizitis – für einen M. Crohn und sollte unbedingt endoskopisch abgeklärt werden. In der Endoskopie lassen sich Schleimhautrötung, Aphten und Ödeme als Zeichen einer akuten Entzündung beurteilen. Die CT-Bildgebung kann Fistelungen und Abszesse darstellen, aber auch eine Röntgenkontrastuntersuchung oder das MRT, insbesondere das MRT-Enteroklysma werden häufig eingesetzt [15]. Auch in der Sonografie werden Abszesse, entzündliche Stenosen und Wandverdickungen sichtbar. Zur Detektion von kleineren Dünndarmläsionen kann, nach Ausschluss von Stenosen, die Kapselendoskopie zum Einsatz kommen. In vielen Kliniken wird nach wie vor das MRT nach Sellink zur Diagnosesicherung herangezogen [14].

Zu den Basisuntersuchungen bei Erstdiagnose eines M. Crohn gehören ein transabdomineller Ultraschall, eine Ileokoloskopie mit Biopsieentnahme aus dem terminalen Ileum und jedem Dickdarmsegment sowie eine erweiterte Dünndarmdiagnostik.

Entzündliche Veränderungen spiegeln sich in den Laborwerten häufig in beschleunigter BSG, Leukozytose, Thrombozytose, Anämie und Dysproteinämie wider. Autoantikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) lassen sich bei 40-70% der Patienten mit einem M. Crohn nachweisen [14]. Durch eine bakteriologische Stuhldiagnostik lassen sich Darminfektionen durch Bakterien, wie z.B. *Campylobacter* und *Clostridium difficile*, ausschließen. Ist die Diagnose eines M. Crohn gestellt, sind weitere Untersuchungen notwendig. Der gesamte Gastrointestinaltrakt ist auf einen möglichen Befall hin zu überprüfen und auch extraintestinale Manifestationen müssen durch Gelenkdiagnostik, ophthalmologische und dermatologische Untersuchungen abgeklärt werden.

Trotz zahlreicher Diagnosekriterien ist eine Unterscheidung zwischen M. Crohn und C. ulcerosa nicht immer möglich. Man spricht dann von einer Colitis indeterminata. Um Klarheit

in der Diagnostik zu schaffen, gewinnen im klinischen Alltag genetische Tests zunehmend an Bedeutung. Die Erforschung genetischer Zusammenhänge ist damit nicht nur für die Therapie wichtig, sondern auch diagnostisch wertvoll.

Prognose

M. Crohn ist nach wie vor nicht vollständig heilbar. Die Rezidivhäufigkeit beträgt in klinischen Studien im ersten Jahr zwischen 30 und 60 % und im zweiten Jahr zwischen 40 und 70% der betroffenen Patienten [15]. Unbehandelt kommt es zum zunehmenden Funktionsverlust betroffener Darmsegmente. Die Komplikationsrate steigt, je länger die Krankheit andauert. Bei einem Großteil der an M. Crohn erkrankten Patienten ist mindestens einmal im Leben eine Operation aufgrund von Komplikationen nötig. Von allen Patienten mit einem isolierten ileozökalen Befall müssen laut populationsbasierten Untersuchungen 50-80% im Laufe von 10 Jahren operiert werden [15]. Durch moderne Therapieverfahren konnte die Lebenserwartung von Crohn-Patienten der der Normalbevölkerung weitestgehend angeglichen werden. Häufig geht die Krankheit aber mit enormen Einschränkungen der Lebensqualität einher, weshalb die Therapieoptimierung einen zentralen Schwerpunkt der Forschung darstellt.

Differenzialdiagnose

Wichtige Differenzialdiagnosen sowohl des M. Crohn als auch der C. ulcerosa sind verschiedenste Darmerkrankungen infektiöser und nicht-infektiöser Genese. Ein Befall mit Bakterien (Darm-Tbc, Campylobacter, Salmonellen, Shigellen, *E. coli*, *Clostridium difficile*-induzierte pseudomembranöse Kolitis u.a.), Parasiten (Amöben, *Cryptosporidium sp.*), Viren (HIV, Herpes simplex, Cytomegalovirus, Noroviren) oder Pilzen (*Candida*, *Aspergillus*) muss genauso ausgeschlossen werden wie eine kollagene Kolitis/mikroskopische Kolitis oder nicht-infektiöse Koliden (Divertikulitis, ischämische Kolitis, Strahlenkolitis, Reizdarm-Syndrom, Graft-versus-Host Disease u.v.a.m.). Auch Malignome (Kolonkarzinom, Lymphome, Metastasen, Karzinoid), medikamentös oder durch Chemikalien induzierte Entzündungen, Laktoseintoleranz, Fruktoseintoleranz, Nahrungsmittelallergien, ein M. Whipple oder eine glutensensitive Enteropathie dürfen im Abklärungsprozess nicht vernachlässigt werden. Bei Frauen muss zusätzlich eine Extrauterin gravidität ausgeschlossen werden. Von besonderer Bedeutung ist die Differenzialdiagnose Appendizitis, die in ihrer Symptomatik einem M. Crohn ähneln kann [14]. Im Vordergrund der Differenzialdiagnostik eines M. Crohn steht

jedoch immer auch die Abgrenzung zur *C. ulcerosa* [14]. Tabelle 1 fasst wichtige Charakteristika zur Unterscheidung von *M. Crohn* und *C. ulcerosa* zusammen.

Merkmal	M. Crohn	C. ulcerosa
Makroskopisch		
Lokalisation	Gesamter Gastrointestinaltrakt	nur Kolon
Befall des terminalen Ileums	ca. 60%	nie (Ausnahme: Backwash-Ileitis)
Befall des Rektums	ca. 25%	ca. 95%
Verteilungsmuster	diskontinuierlich, segmental	kontinuierlich
Stenosen	häufig	selten
Wandschichten	verdickt	dünn
Endoskopisch-histologisch		
Entzündung	transmural	mukosal und submukosal
Pseudopolypen	5-10%	10-20%
Ulzerationen	tief	oberflächlich
Lymphatische Reaktion	ausgeprägt	mittelgradig
Fibrose	ausgeprägt	mild bis keine
Epitheloidzellgranulome	in 40% nachweisbar	nein
Kryptenabszesse	selten	ja
Fisteln	ja	nein
Aphten	charakteristisch	selten
Klinisches Bild/Symptomatik		
Diarrhö	häufig	häufig (Leitsymptom)
Blutabgang	selten	häufig (Leitsymptom)
Perianalfisteln	ja (bei Kolonbefall)	nein
Gewichtsverlust	häufig	ja
Malabsorption	gelegentlich	nie
Malignitätspotential	bei Kolonbefall	ja
Rezidiv nach OP	häufig	nein
Toxisches Megakolon	nein	ja
Extraintestinale Manifestationen	häufig	häufig

Tabelle 1. Charakteristika zur Unterscheidung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Anmerkung: nicht alle Merkmale sind stets gleich ausgeprägt (modifiziert nach [26] S.808).

2.1.4 Colitis ulcerosa – Einführung in das Krankheitsbild

Klinische Manifestation, makroskopische und mikroskopische Veränderungen

Im Gegensatz zum M. Crohn (siehe 2.1.3) handelt es sich bei der C. ulcerosa um eine entzündliche Erkrankung, die nur Mukosa und Submukosa, also die oberflächlichen Schleimhautschichten des Dickdarmes befällt (mukosale Kolitis). Die sich ausschließlich kontinuierlich ausbreitende Entzündung beginnt fast immer im Rektum. Bei 40-50 % der Patienten beschränkt sich der Befall auf Rektum und Rektumsigmoid, 30-40 % entwickeln zusätzlich eine linksseitige Kolitis. Die Erkrankung kann sich über das Sigma hinaus bis auf das gesamte Kolon ausweiten. In ca. 20% der Fälle findet man diese Pankolitis. Nur selten kommt es zum Befall des distalen Ileums. Man spricht dann von einer retrograden Ileitis oder sogenannten „Backwash-Ileitis“ [14,30].

Leitsymptom der C. ulcerosa sind rezidivierende, blutig-schleimige Durchfälle. Je nach Schweregrad und Dauer der Entzündung finden sich Begleitsymptome wie Fieber, Anämie und Gewichtsverlust. Schmerzen treten oft in Form krampfartiger Unterbauchschmerzen unmittelbar vor der Defäkation auf. Sowohl ein schleichender als auch ein fulminanter Erkrankungsbeginn sind möglich. Im frischen Stadium einer C. ulcerosa findet man makroskopisch eine gerötete, geschwollene Kolonschleimhaut mit Kontaktblutungen und kleinen Schleimhautulzera mit weißlichen Fibrinbelägen. Die normale Gefäßzeichnung ist nicht mehr zu erkennen. Kryptenabszesse und Kryptitis gehören zum typischen histologischen Bild einer aktiven C. ulcerosa und entstehen durch die Granulozyteninfiltration der Schleimhaut. Das chronisch fortgeschrittene Stadium zeichnet sich durch einen Verlust des normalen Faltenreliefs und einen Verlust der Haustrierung aus. Die verbleibenden Schleimhautinseln imponieren als „Pseudopolypen“. Histologisch ist die vornehmlich mit Lymphozyten und Histozyten infiltrierte Mukosa atrophiert. Es finden sich sogenannte DALMs (= *dysplasia associated lesion or mass*) und Epitheldysplasien, die als Vorläufer einer karzinomatösen Entartung zu werten sind [35].

Diagnostik

Nach einer differenzierten Anamnese reicht häufig eine Rektoskopie, um die Diagnose einer C. ulcerosa zu sichern, da diese in der Regel mit einem Befall des Rektums einhergeht. Biopsien dienen zur Diagnosesicherung. Um die Ausdehnung der Entzündung zu ermitteln, stellt eine endoskopische Untersuchung des gesamten Kolons einschließlich des terminalen

Ileums mit Biopsieentnahme den diagnostischen Goldstandard dar. Aufgrund von Perforationsgefahr ist eine komplette Koloskopie im akuten Schub meist kontraindiziert.

Typische Zeichen einer *C. ulcerosa* sind der kontinuierliche Befall, ein Haustrenverlust, Ulzerationen und eine samtartige Schleimhaut mit unscharfen Konturen. Diese lassen sich bei einem Kolonkontrasteinlauf erkennen. Endoskopien oder Kontrastmitteluntersuchungen sollten nur dann erfolgen, wenn eine Perforation ausgeschlossen ist. Andernfalls können Sonografie, Röntgen-Abdomenübersichtsaufnahme oder Computertomographie zur Diagnostik eingesetzt werden. MRT, MRT-Enteroklysma und Kapselendoskopie sind in der differenzialdiagnostischen Abgrenzung zum *M. Crohn* hilfreich. Eine Stuhluntersuchung sollte zum Ausschluss einer bakteriellen oder pseudomembranösen Kolitis erfolgen.

Obwohl es keine spezifischen Laborparameter zur Diagnosesicherung gibt, helfen Entzündungsparameter wie BSG, Leukozyten, CRP, Thrombozyten und Dysproteinämie, die Erkrankungsschwere einer *C. ulcerosa* einzuschätzen. Meist besteht eine Anämie. Schwere Fälle können zu Eiweißmangel, Hypalbuminämie und Zinkmangel führen. Sowohl bei *M. Crohn* als auch bei *C. ulcerosa* finden sich gehäuft Autoantikörper im Blut. Bei bis zu 70% der von *C. ulcerosa* betroffenen Patienten sind Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (pANCA) nachweisbar [14].

Extraintestinale Manifestation

Bei einer *C. ulcerosa* kann es, ähnlich dem *M. Crohn*, zu Veränderungen an Haut, Augen, Gelenken und Leber sowie Wachstumsstörungen im Kindesalter, Gewichtsverlust und massiven Blutungen kommen. Im Gegensatz zu Begleiterscheinungen beim *M. Crohn* ist das Auftreten von Aphten, Erythema nodosum, Iritis, Uveitis und Arthritiden bei einer *C. ulcerosa* seltener. Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist jedoch als extraintestinale Manifestation bei der *C. ulcerosa* häufiger zu beobachten als beim *M. Crohn*. Liegt eine PSC vor, ist auch das Risiko für das Auftreten eines cholangiozellulären Karzinoms und eines kolorektalen Karzinoms erhöht [36].

Komplikationen

Bei fulminantem Verlauf einer *C. ulcerosa* kann es zu einem toxischen Megakolon kommen. Dies stellt eine lebensbedrohliche Komplikation dar. Flächenhaft ulzerierte Schleimhaut,

extreme Dilatation des gesamten Kolons sowie Wandnekrosen können bis zur Darmwandperforation und Peritonitis führen.

Die *C. ulcerosa* ist zudem mit einem (20 bis 30-fach) erhöhten Kolonkarzinomrisiko assoziiert. Der chronisch-rezidivierende Verlauf begünstigt intraepitheliale Neoplasien, welche als Vorläuferläsionen des Karzinoms gewertet werden können. Ausdehnung, Intensität der Entzündung und Erkrankungsdauer nehmen Einfluss auf das relative Risiko. Regelmäßige Koloskopien mit Biopsieentnahme stellen eine wichtige Maßnahme zur Überwachung dar. Eine totale Kolektomie ist dann indiziert, wenn hochgradige Dysplasien oder ein invasives Karzinom nachgewiesen werden können [30,37].

Prognose

Chronisch rezidivierend und schubweise verlaufend, führt unbehandelt auch die *C. ulcerosa* zum progredienten Funktionsverlust des Darmes und damit einhergehend zu chronischen Durchfällen. Die akute fulminante *C. ulcerosa* ist ein lebensbedrohlicher Zustand. Diese in bis zu 5% der Fälle auftretende Erkrankung geht mit einer sehr hohen Letalität einher. Kommt es zum toxischen Megakolon, beträgt die Letalität etwa 20%. Bei sehr leichten bis milden Verläufen entspricht die Lebenserwartung der von Gesunden [14]. Im Gegensatz zum *M. Crohn* ist die *C. ulcerosa* durch Proktokolektomie heilbar.

2.1.5 Therapieansätze bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Vorgehensweise und Therapieziel

Die sorgfältige Analyse des Krankheitsbildes und die Erfassung der Krankheitsaktivität sind für eine erfolgreiche Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entscheidend. Aktivitätsindizes wie der *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) und der *Severity Activity Index* (SAI) bei *M. Crohn* und der *Clinical Activity Index* (CAI) und *Endoscopic Index* (EI) bei *C. ulcerosa* beziehen sowohl das subjektive Befinden des Patienten als auch objektive, klinische und laborchemische Untersuchungsbefunde in die Beurteilung ein. Dadurch werden ein gezielter Einsatz der Therapiemodalitäten und eine Beobachtung des Krankheitsverlaufs möglich [14]. *M. Crohn* und *C. ulcerosa* sind vornehmlich Erkrankungen junger Menschen. Die Therapiemaßnahmen müssen der besonderen Lebenssituation des jeweiligen Patienten angepasst werden und auf dessen individuelle Bedürfnisse eingehen (z.B. Kinderwunsch,

Schwangerschaft). Optimalerweise erfolgt die Versorgung von CED-Patienten (CED = chronisch entzündliche Darmerkrankungen) in einem interdisziplinären Team.

Um möglichst unmittelbar nach der Diagnose eine effektive Therapie beginnen zu können, bedarf es der Prognose des zu erwartenden Krankheitsverlaufs einer C. ulcerosa und eines M. Crohn [38]. Die Vorhersagbarkeit der klinischen Ausprägung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und die Therapiemöglichkeiten zu verbessern, sind Ziele der genetischen Forschung.

Man unterscheidet prinzipiell zwischen einer Therapie im akuten Schub (Schubtherapie) und der Remissionserhaltungstherapie. Im akuten Schub haben die Remissionsinduktion und das schnelle Erreichen von Beschwerdefreiheit oberste Priorität. Bei der Remissionserhaltung geht es darum eine langfristige Beschwerdefreiheit zu sichern sowie neue Schübe zu verhindern. Komplikationen (Engstellen, Stenosen, Fisteln, Abszesse) vorzubeugen ist ebenso wichtig wie die Behandlung von Mangelerscheinungen (z.B. Blutarmut durch Eisenmangel). Unter Therapie auftretende Nebenwirkungen (z.B. Osteoporose durch Langzeiteinnahme von Kortisonpräparaten) gilt es zu minimieren.

Medikamentöse Therapie

Für die Wahl des richtigen Medikaments spielen Entzündungsaktivität, Verlaufsform und Lokalisation der befallenen Darmabschnitte eine Rolle. Bei einem Befall von Rektum und Sigma sind topisch wirksame Medikamente (Einläufe, Suppositorien) der oralen Gabe häufig vorzuziehen. Auch Besonderheiten wie extraintestinale Manifestationen, Komplikationen und Begleiterkrankungen wie etwa Hepatitis C sollten in der individuellen Therapieplanung beachtet werden [12].

Während früher das Therapieprinzip des „Step-up“ maßgeblich war, wird heute oftmals die Strategie des „Top-down“ favorisiert (Abbildung 2) [12]. Der frühzeitige Einsatz immunmodulierender Pharmaka zielt darauf ab, den Langzeitverlauf günstig beeinflussen zu können und das Auftreten von Komplikationen zu vermeiden. Um Therapieentscheidungen zu verbessern und Hochrisikopatienten, die von der „Top-down“-Strategie profitieren, im klinischen Alltag zielstrebig identifizieren zu können, und um gleichzeitig Nebenwirkungsrisiken und Kosten in Grenzen zu halten, bedarf es spezifischer Auswahlkriterien. Zur Prognose werden klinische Parameter, aber auch sogenannte

Biomarker herangezogen. Sowohl verschiedene Serumparameter als auch genetische Marker (darunter *NOD2*) scheinen mit komplexen Phänotypen assoziiert zu sein [39].

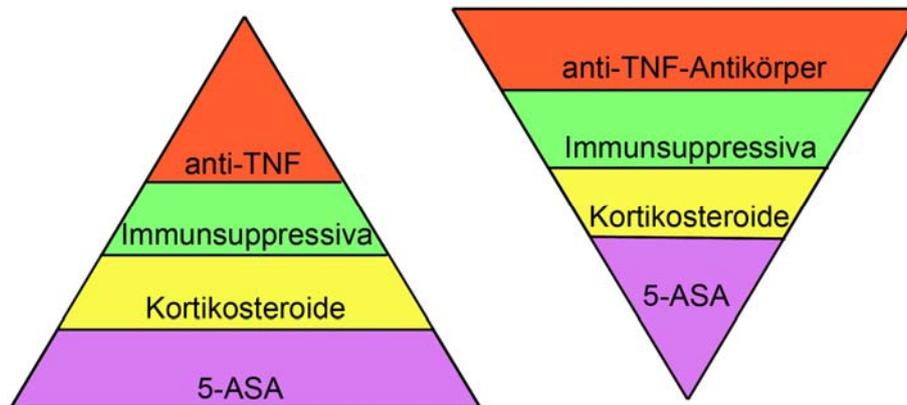


Abbildung 2. Zwei Therapiestrategien im Vergleich: Step-up (links) versus Top-down (rechts).

In der Therapie des akuten Schubs einer *C. ulcerosa* kommen 5-Aminosalicylsäure (5-ASA)-Präparate (z.B. Sulfasalazin, Mesalazin, Olsalazin) sowie topisch oder systemisch wirksame Glukokortikosteroide (z.B. Prednisolon, Budesonid) zum Einsatz.

Bei therapierefraktären Verläufen einer *C. ulcerosa* können Immunsuppressiva wie Azathioprin, Ciclosporin A i.v. oder Tacrolimus (Reservemittel) zum Einsatz kommen. Führen in der Schubtherapie einer *C. ulcerosa* Steroide und Immunsuppressiva nicht zu einer Besserung, können Anti-TNF- α -Antikörper wie Infliximab i.v. gegeben werden [40,41]. Die Indikation für Infliximab (Remicade®) wurde 2006 in Deutschland auf die *C. ulcerosa* erweitert.

Der Einsatz der Ausweichpräparate Ciclosporin oder Tacrolimus ist aufgrund ihrer Nephrotoxizität und bei Tacrolimus zusätzlich möglicher Neurotoxizität problematisch.

Zur Remissionserhaltung einer *C. ulcerosa* dienen 5-ASA-Präparate und Immunsuppressiva wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin. Auch Infliximab kann Rezidiven vorbeugen.

Vor dem Beginn einer Therapie mit Infliximab muss eine Abklärung bezüglich diverser Begleiterkrankungen, die infolge einer Immunsuppression wieder aufflammen könnten, erfolgen. Auszuschließen ist das Vorliegen von Abszessen, Tuberkulose (Hauttest, Röntgen-Thorax), Schwangerschaft, schweren Infekten und Herzinsuffizienz NYHA III-IV [14].

Zur Remissionsinduktion eines M. Crohn kommen topische und systemische Kortikosteroide zum Einsatz. Spricht ein Patient auf diesen Therapieansatz nicht an, werden Immunsuppressiva wie Azathioprin/6-Mercaptopurin oder Methotrexat gegeben.

Fortschritte im Verständnis der Pathologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen machen zunehmend eine sogenannte *targeted therapy* möglich, mit der die Entzündungskaskade zielgerichtet unterbrochen wird [25]. *Biologicals* (gentechnisch hergestellte an bestimmten Stellen des Immunsystems angreifende biologische Therapeutika) finden seit einiger Zeit im klinischen Alltag ihre Verwendung und haben sich als äußerst effektiv erwiesen. Als wichtigste Vertreter in der Therapie von M. Crohn gelten aktuell monoklonale Anti-TNF- α -Antikörper (TNF = Tumor-Nekrose-Faktor). In Deutschland sind derzeit (Stand 2012) Infliximab und Adalimumab zugelassen. Bei prognostisch ungünstigem Verlauf sollte bereits frühzeitig der Einsatz von Azathioprin und/oder Anti-TNF-Antikörpern erwogen werden [15]. Die Prognose lässt sich dadurch deutlich verbessern.

Bei einer Rezidivhäufigkeit von 30% nach einem Jahr und 70% nach zwei Jahren ist eine Remissionserhaltung bei M. Crohn besonders wichtig. Hierzu erfolgt eine Dauertherapie mit Azathioprin oder mit Anti-TNF- α -Antikörpern [15].

Sowohl beim M. Crohn als auch bei C. ulcerosa sind supportive Therapiemaßnahmen wichtig. Eine Substitution von Eiweiß, Kalorien, Elektrolyten, Eisen, Kalzium, Zink und Vitaminen (Vitamin B₁₂, A, D, E, K) ist u.a. bei einem Dünndarmbefall mit Malabsorptionssyndrom indiziert. Bei manifester Osteoporose werden Bisphosphonate als Therapeutika verabreicht; zur Prophylaxe dient die Gabe von Vitamin D und Kalzium.

Ein Auftreten von extraintestinalen Manifestationen wird hauptsächlich im Zusammenhang mit einem akuten Schub oder einer mangelnden remissionserhaltenden Therapie, wie etwa einer Azathioprin-Unterdosierung, beobachtet. Liegen extraintestinale Manifestationen vor, sollte eine remissionserhaltende Therapie eingeleitet und die Immunsuppression überprüft werden.

Im Falle von Gelenkbeschwerden können Analgetika wie Paracetamol oder Novaminsulfon zum Einsatz kommen. Da sich unter NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) chronisch entzündliche Darmerkrankungen häufig verschlimmern, sollten diese nicht routinemäßig eingesetzt werden. Besteht ein Verdacht auf rheumatoide Arthritis oder M. Bechterew ist eine rheumatologische Abklärung indiziert [14].

Chirurgische Therapie

Führen konservative Therapiemethoden nicht zu einer ausreichenden Besserung der klinischen (Diarrhö, Blut im Stuhl, Schmerzen) und endoskopischen (Entzündungsbild) Symptome, besteht die Gefahr einer dauerhaften Darmschädigung. Eine Ausbreitung der Entzündung auf noch nicht befallene Darmabschnitte ist ebenso zu vermeiden wie die Folgen einer dauerhaften Malabsorption.

Der chirurgische Eingriff als *ultima ratio* ist häufig nicht zu vermeiden. Die Indikation zur Operation besteht u.a. bei akuten Komplikationen wie Perforation, Peritonitis oder Ileus sowie elektiv nach rezidivierenden Fisteln oder Subileus. Erst wenn konservative Mittel versagen, ist eine Teilresektion durchzuführen. Dieser Eingriff darf andererseits nicht zu lange verzögert werden. Ein enges Zeitfenster entscheidet über den Erfolg der Behandlung und macht eine kontinuierliche interdisziplinäre, d.h. auch chirurgische Betreuung bei CED-Patienten nötig.

Als grundlegendes Prinzip der operativen Behandlung gilt die darmerhaltende und funktionserhaltende *minimal surgery*. Die Darmteilresektion bei M. Crohn erfolgt meist ileozökal. Im Falle von Komplikationen wie Konglomerattumoren aus mehreren entzündeten Darmschlingen und vor allem langstreckigen, hochgradigen, narbigen Stenosen ist ein operativer Eingriff häufig die einzige Therapieoption. Abszessdrainage, Fistel- und Abszessspaltung sowie die vorübergehende Anlage eines Ileostomas oder eines Kolostomas sind Verfahren der operativen Versorgung. Stenosen des Anal- und distalen Rektumbereichs sind häufig aufgrund von perianalen Fisteln problematisch und können eine permanente Stomaanlage nötig machen.

Die kurative Sanierung einer C. ulcerosa ist durch Kolektomie und ileoanale Pouchanlage nach Kolektomie möglich. Im Gegensatz zur C. ulcerosa ist ein M. Crohn operativ nicht heilbar. Besonders zu beachten sind Komplikationen, die als Folge wiederholter Darmresektionen auftreten können. Ein Beispiel dafür ist das Kurzdarmsyndrom [42].

Ernährungstherapie

Eine spezifische Diät für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gibt es nicht und nach wie vor mangelt es an verlässlichen wissenschaftlichen Daten zur Ernährungstherapie [43]. Generell empfiehlt sich bei nachgewiesener Laktoseintoleranz (in 30% der Fälle) eine laktosearme Kost. Im akuten Schub sollte auf eine ballaststofffreie Kost geachtet werden. Handelt es sich um einen schweren beziehungsweise hochakuten Verlauf

eines M. Crohn oder einer C. ulcerosa oder besteht dringender Verdacht auf Komplikationen, ist eine kurzfristige parenterale Ernährung indiziert.

2.1.6 Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Nach wie vor ist die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen nicht vollständig geklärt. M. Crohn und C. ulcerosa sind hochkomplexe Erkrankungen, die multifaktoriell bedingt entstehen (Abbildung 3). Man weiß heute, dass sowohl Störungen im intestinalen Immunsystem, wie Defekte der Mukosabarriere als auch Umweltfaktoren bei der Pathogenese eine Rolle spielen [44,45]. Von entscheidender Bedeutung ist die Genetik. Eine inadäquate, überschießende Immunantwort auf dem Boden einer genetischen Prädisposition, ausgelöst durch kommensale Bakterien oder Infektionen, führt zur chronischen Entzündung. Im Folgenden sind die wesentlichen Mechanismen, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen, genauer beschrieben.

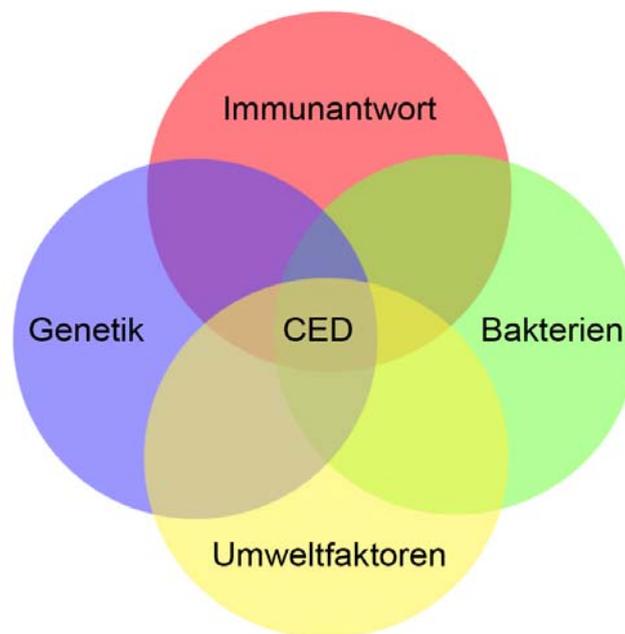


Abbildung 3. Multifaktorielle Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Immunantwort

Sowohl Defekte im angeborenen wie im erworbenen Immunsystem spielen eine Rolle. Primär kommt es zu einer Barrierestörung der Darmschleimhaut und dadurch zum Eindringen von Bakterien. Die erhöhte Permeabilität der intestinalen Barriere (schematisch dargestellt in Abbildung 4) scheint besonders in der Pathogenese des M. Crohn eine entscheidende Rolle zu

spielen. Scharl et al. konnten zeigen, dass PTPN2 für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion mitverantwortlich ist (siehe 2.2.4) [46].

Zusätzlich zur Barriestörung bzw. in deren Folge kommt es zu einer pathologisch gesteigerten Abwehrreaktion mit Bildung von Entzündungsmediatoren. Die überschießende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine ist Folge einer erhöhten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Eine besondere Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielen CD4⁺ Lymphozyten. Sowohl bei *C. ulcerosa* als auch bei *M. Crohn* finden sich aktivierte CD4⁺ T-Zellen in der Lamina propria und im peripheren Blut [27]. Aus den naiven CD4⁺ Zellen entwickeln sich T-Helfer-Zellen. Beim *M. Crohn* findet sich eine vorwiegend Th1- und Th17-vermittelte Entzündungsreaktion. Th1-Zellen produzieren u.a. IFN- γ . Th17-Zellen sind eine T-Zell-Population, welche durch den Transkriptionsfaktor ROR γ t, die Oberflächenmarker IL-23R und CCR6 sowie die Produktion diverser proinflammatorischer Zytokine wie IL-17A, IL-17F und IL-22 charakterisiert ist [47]. Bei der *C. ulcerosa* spielen Th2-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sezernieren, eine größere Rolle. Genauere Erläuterungen der komplexen Zusammenhänge sind in Abschnitt 2.2 und unter 6. beschrieben. Neben der erhöhten Ausschüttung von Zytokinen nimmt eine gestörte Expression von Defensinen in der Darmschleimhaut ebenfalls Einfluss auf die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [48,49,50].

Während sich bei der *C. ulcerosa* eine große Zahl von Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten im histopathologischen Bild findet, sind Entzündungen beim *M. Crohn* durch Ansammlungen von Makrophagen gekennzeichnet [30,31,51]. Am Ende des Prozesses der chronisch-destruierenden Entzündung finden sich lokale Gewebsschädigungen mit Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen.

Umweltfaktoren

Das Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist mit dem Lebensstil westlicher Industriegesellschaften verbunden. Epidemiologische Studien (vgl. 2.1.2) untermauern diese These. Inzwischen konnten einzelne Umweltfaktoren identifiziert werden, die für eine Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und deren Progredienz mitverantwortlich sind. Dazu gehören Rauchen, Ernährung, Medikamente, Infektionskrankheiten in der Kindheit, sozioökonomischer Status und Bildungsstand [52]. Die beiden letztgenannten Punkte stimmen mit der Hygienehypothese für Allergien und Autoimmunerkrankungen überein, sind jedoch relativ schwer zu analysieren und daher

kritisch zu bewerten [53]. Stress ist mehr als modifizierender denn als ursächlicher Faktor zu interpretieren und ist im Tiermodell von klarerer Relevanz als beim Menschen [54].

Nikotinkonsum in Form von Zigarettenrauch zählt zu den eindeutigsten Risikofaktoren eines M. Crohn. Im Gegensatz dazu hat das Rauchen für C. ulcerosa einen protektiven Effekt [55,56,57]. Ein ähnlich gegensätzlicher Zusammenhang zeigt sich für die Appendektomie bei Appendizitis, die für M. Crohn risikosteigernd, für C. ulcerosa jedoch protektiv zu sein scheint [58,59]. Betrachtet man die epidemiologische Verteilung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen fällt eine generelle Häufung auf der nördlichen Erdhalbkugel und in den westlichen Industrienationen auf. Fernöstliche Länder kämpfen jedoch inzwischen mit einer Zunahme von Inzidenz und Prävalenz (vgl. 2.1.2). Epidemiologische Besonderheiten unterstützen die These, dass Umweltfaktoren, deren Einfluss einem permanenten Wandel unterliegt, die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mitbestimmen.

Vermutungen, dass Umweltfaktoren und Hygienebedingungen bereits in der frühen Kindheit Einfluss auf die spätere Entstehung von Allergien und Autoimmunerkrankungen haben, fasst man unter dem Begriff der Hygienehypothese zusammen. Diese geht davon aus, dass ein mangelnder Kontakt mit Bakterien und Mikroorganismen in der Kindheit ein erhöhtes Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen zur Folge haben kann. Obwohl spezifische risikosteigernde Umweltfaktoren bekannt sind und Einflussfaktoren in der Kindheit eine Rolle spielen, kann die Hygienehypothese bisher nicht vollständig bestätigt werden [53,60,61].

Als wichtigster Umweltfaktor gilt die bakterielle Darmflora.

Intestinale Mikrobiota

Bisher konnten keine spezifischen Keime als Krankheitsauslöser identifiziert werden. Dennoch gibt es eine Vielzahl direkter und indirekter Hinweise für die pathogenetische Rolle mikrobieller Faktoren [62]. Hierfür spricht unter anderem die Hauptlokalisation der Erkrankung in Ileum und Kolon, den Darmregionen, in denen sich die höchste Bakterienkonzentration findet [51]. Im experimentellen Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Tiere unter keimfreien Bedingungen keine intestinale Entzündung entwickeln [63,64]. Damit bestätigt sich die These, dass Bakterien einen Einfluss auf M. Crohn und C. ulcerosa haben.

Die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase an der Grenzfläche zwischen Mukosabarriere und luminaler Flora ist hochkomplex. Signalwege und die dafür kodierenden Gene, die zur Toleranz des Immunsystems gegenüber kommensalen Bakterien beitragen,

spielen dabei eine zentrale Rolle [10]. Die Dysregulation der Autophagozytose ist in diesem Zusammenhang bei der Entstehung von M. Crohn von Bedeutung. Dies wird durch die Assoziation verschiedener im Signalweg der Phagozytose beteiligter Gene (u.a. *ATG16L1*, *IRGM* und *ATG5*) mit M. Crohn bestätigt. Des Weiteren scheinen für die Pathogenese des M. Crohn Defekte in der frühen Immunantwort, vor allem also der des angeborenen Immunsystems, und eine fehlerhafte Prozessierung intrazellulärer Bakterien von Bedeutung zu sein [65,66].

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre versuchten spezifische Bakterien oder Viren als kausale Krankheitserreger zu identifizieren. Als eines der ersten wurde *Mykobakterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) untersucht. Die Rolle von MAP in der Ätiologie wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert [62,67]. Weitere Studien beschäftigten sich mit Yersinien [68], Campylobacter, Clostridien [69], Chlamydien, *Helicobacter spp.* [70], Proteus, Pseudomonas, Listerien [71], Shigellen, Salmonellen, *E. coli* [72,73], Zytomegalieviren [74] und Masernviren [75,76,77]. Laktobazillen und Bifidobakterien scheinen eher protektiv zu wirken [78,79,80]. Trotz intensiver Forschung konnte kein unmittelbarer kausaler Zusammenhang eines spezifischen Keims mit der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden. Weitere Studien berichten von einer veränderten Zusammensetzung der Darmflora bei CED-Patienten. Zum einen findet sich eine erhöhte intestinale Bakterienkonzentration, zum anderen dringen vermehrt Bakterien in die Mukosa des Darmes ein [81]. Dies wird durch die oben beschriebene Barrierestörung begünstigt. Ob diese Barrierestörung sekundär durch die Entzündungsreaktion auftritt oder einen primär kausalen Faktor in der Pathogenese darstellt, ist unklar [82,83,84].

Als weiterer prädisponierender Faktor für chronisch entzündliche Darmerkrankungen gilt eine positive Familienanamnese. Das lässt Rückschlüsse auf genetische Einflussfaktoren zu [59,85].

Genetik

Die Genetik nimmt für das pathogenetische Verständnis chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine fundamentale Rolle ein. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden 163 Gene bezüglich ihrer Suszeptibilität mit M. Crohn und *C. ulcerosa* identifiziert [86]. Detailliert wird die Bedeutung der Genetik und der funktionelle Zusammenhang mit pathogenetischen Mechanismen in Abschnitt 2.2 beschrieben. Während sich hinsichtlich der Ätiologie durchaus deutliche Unterschiede zwischen M. Crohn und *C. ulcerosa* erkennen

lassen, zeigt sich auf genetischer Ebene durch übereinstimmende Risikogene die Verwandtschaft der beiden Entitäten.

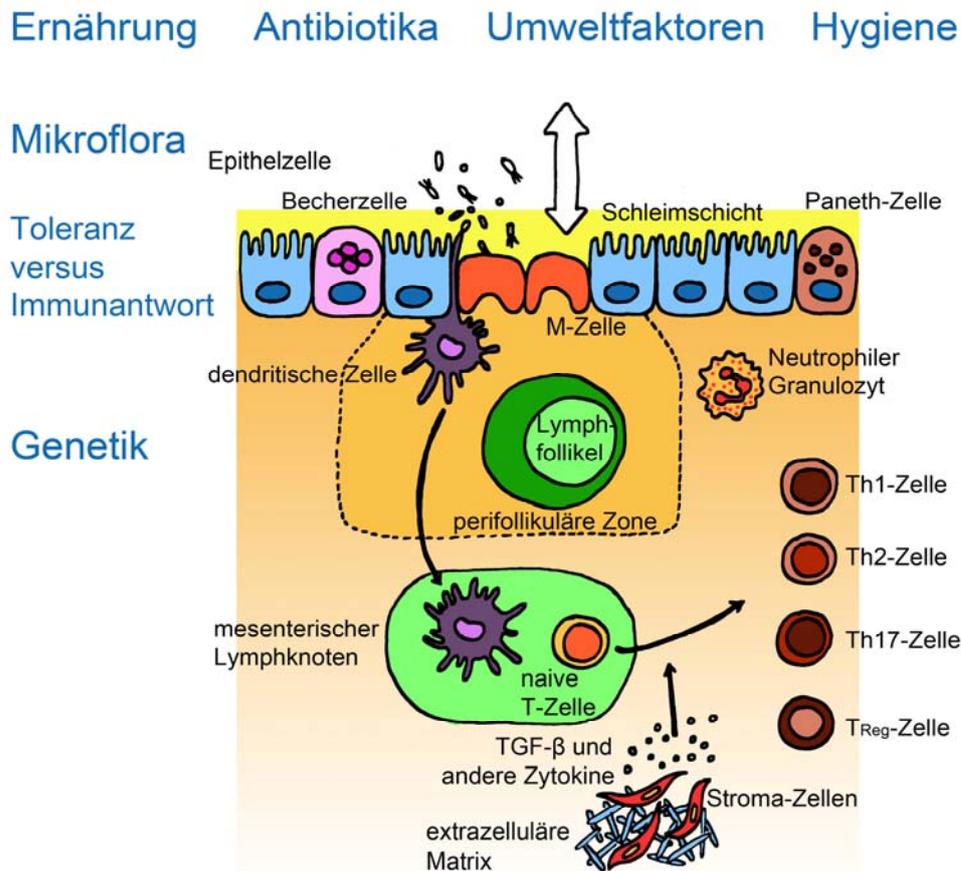


Abbildung 4. Schema der intestinalen Barriere. Die Grafik zeigt (in blauer Schrift) Einflussfaktoren, deren Veränderung zur Entstehung oder dem Wiederaufflammen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führen kann. Eigene Abbildung auf der Grundlage von [51] und [87].

2.2 Genetik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

2.2.1 Ansätze zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene

Ziel genetischer Studien ist es, spezifische Gene und deren spezielle Varianten (Allele) zu identifizieren, welche prädisponierend für eine oder mehrere Formen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind. Hierfür gibt es verschiedene Ansätze. Während in Familien durchgeführte Kopplungsstudien nur relativ große DNA-Bereiche untersuchen können, dienen Assoziationsstudien, bei denen es sich vorwiegend um Fall-Kontroll-Studien handelt, zur detaillierteren Analyse und Identifizierung einzelner Gene [88]. Die Identifikation genetischer Einflussfaktoren durch Kopplungsanalysen lieferte bei monogenetischen

Erkrankungen fundamentale neue Erkenntnisse zu Pathogenese, Diagnostik und Therapie [89]. Bei komplexen Erkrankungen blieben Kopplungsanalysen jedoch häufig erfolglos. Einen ergänzenden Ansatz, spezifische genetische Risikofaktoren zu identifizieren, stellen Assoziationsstudien dar [90]. Inzwischen sind Kandidatengene, d.h. assoziierte Gene für mehrere Erkrankungen bekannt, darunter Diabetes mellitus Typ 1 (*HLA*-Klasse II-Gene, insulin locus (*INS*) und *CTLA4*) [91,92], M. Alzheimer (*APOE*), Asthma (*ADAM33*), Schizophrenie (*neuregulin 1 (NRG1)*) [93] und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (*NOD2* und 5q31) [89]. Den Durchbruch brachten schließlich genomweite Assoziationsstudien, durch die in den vergangenen Jahren mit großer Dynamik weitere genetische Zusammenhänge komplexer Krankheitsbilder entdeckt wurden. Nur bei wenigen Erkrankungen konnte ein so schneller Fortschritt beobachtet werden wie bei M. Crohn und C. ulcerosa [66].

Einhergehend mit modernen Verfahren und Technologien ist die genetische Forschung mit neuen ethischen Herausforderungen konfrontiert. Genetische Testung wird zunehmend zur Alltagsroutine. Umso mehr muss sich jeder Arzt und Wissenschaftler der Sensibilität des Themas und der gewonnenen Daten bewusst sein. Im Rahmen des *Human Genome Project* wurde das *ELSI (Ethical, Legal and Social Issues program)* ins Leben gerufen, ein Programm, das sich ethischen, rechtlichen und sozialen Fragestellungen und Problemen im Zusammenhang mit genetischer Forschung widmet [94].

2.2.2 Der Einfluss genetischer Faktoren auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die Relevanz molekularer Genetik für die klinische Medizin ist heutzutage unumstritten. Der Einfluss genetischer Faktoren spielt für das Verständnis der Pathophysiologie eine entscheidende Rolle. Dies gilt nicht nur für chronisch entzündliche Darmerkrankungen sondern auch für verschiedene Erkrankungen, die zur Gruppe der Barriereerkrankungen (*inflammatory barrier diseases*) gezählt werden, darunter Sarkoidose, Psoriasis, atopisches Ekzem, Asthma, Peridontitis und die Psoriasis-Arthritis [95]. Neue Erkenntnisse zu genetischen Hintergründen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind daher auch für weitere Krankheitsbilder von großer Bedeutung. Komplexe Erkrankungen wie M. Crohn und C. ulcerosa unterliegen einer polygenetischen Vererbung. Sowohl Gene der angeborenen wie der erworbenen Immunität spielen eine fundamentale Rolle in der Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen [51].

Deutliche Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz in verschiedenen ethnischen Gruppen lassen Rückschlüsse auf die genetische Ursache chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu. Die Genetik unterscheidet sich jedoch in verschiedenen Populationen. Bekannt ist, dass beispielsweise in Japan das genetische Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen grundlegend von dem westlicher Länder abweicht. Fast keines der in Europa und Nordamerika mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Gene spielt in Japan eine Rolle. Dies mag auch eine Erklärung für die unterschiedliche Wirksamkeit verschiedener Therapiestrategien sein [21]. Die Vermutung, dass Gene nicht nur eine Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielen, sondern als krankheitsmodulierende Faktoren Einfluss auf Fortschreiten, Komplikationen und Therapieansprechen nehmen, gibt Ansporn, genetische Forschungen weiter zu vertiefen. Dadurch lassen sich molekulare Mechanismen besser verstehen und es kann gezielter gegen die Entzündung vorgegangen werden um die Prognose entscheidend zu verbessern [96].

Sowohl M. Crohn als auch C. ulcerosa treten familiär gehäuft auf [97]. Im Vergleich zur Normalbevölkerung besitzen Verwandte ersten Grades ein 10-fach erhöhtes Risiko, dieselbe chronische Darmerkrankung zu entwickeln wie der betroffene Patient. Weniger ausgeprägt, jedoch trotzdem erhöht, ist die Wahrscheinlichkeit, die jeweils andere Entität zu entwickeln, also für Angehörige von M. Crohn-Patienten eine C. ulcerosa zu bekommen und umgekehrt [98].

Mehrere unabhängige Zwillingsstudien belegen den genetischen Zusammenhang und zeigen zusätzlich, dass der Einfluss der Genetik bei M. Crohn stärker ausgeprägt ist als bei C. ulcerosa. Die Konkordanzraten für monozygote Zwillinge werden je nach Studie für C. ulcerosa zwischen 10-18% und für M. Crohn mit 35-58% angegeben [99,100,101,102].

Die erste mit M. Crohn assoziierte Kopplungsregion (IBD-Linkage-Areal IBD1) wurde auf Chromosom 16q12 entdeckt [103]. Im Jahr 2001 wurde in dieser Region mit *NOD2* das erste Suszeptibilitäts-gen für M. Crohn identifiziert [104]. Die Entdeckung dieses genetischen Hauptrisikofaktors für M. Crohn war ein Meilenstein in der genetischen Forschung zu chronisch entzündlichen Darmrerkrankungen. Drei Varianten von *NOD2* wurden beschrieben, die mit M. Crohn, aber nicht mit C. ulcerosa assoziiert sind. Es handelt sich um die Mutationen 1007fsinsC in Exon 11, R702W in Exon 4 und G908R in Exon 8. Die Ergebnisse zur Suszeptibilität von *NOD2* wurden in mehreren unabhängigen Studien an europäischen Kohorten bestätigt [95,105,106]. Stimuliert durch bakterielle Lipopolysaccharide wird NF-κB durch *NOD2* aktiviert und spielt damit eine Rolle im angeborenen Immunsystem [106]. Liegt

eine homozygote *NOD2*-Genmutation vor, besteht im Vergleich zur Normalbevölkerung ein bis zu 40-fach erhöhtes Risiko einen M. Crohn zu entwickeln [107,108].

Genomweite Kopplungsstudien haben inzwischen neun genetische Risikomarker identifiziert, die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert zu sein scheinen. Sieben der neun Regionen erfüllen Kriterien signifikanter Kopplungsregionen [109] und wurden mehrfach in voneinander unabhängigen Studien als CED-Kopplungsregionen bestätigt. Die sieben assoziierten Regionen sind auf den Chromosomen 16q (IBD1), 12q (IBD2), 6p (IBD3), 14q (IBD4), 5q (IBD5), 19p (IBD6) und 1p (IBD7) lokalisiert [110,111].

Die Gesamtzahl der durch genomweite Assoziationsstudien identifizierten Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen liegt aktuell bei 163, davon 110 sowohl für M. Crohn als auch für C. ulcerosa [86]. Noch bis 2011 war man von 99 Suszeptibilitätsloci ausgegangen (71 für M. Crohn, 47 für C. ulcerosa) [112,113]. Die Zahl identifizierter Suszeptibilitätsgene steigt also stetig. Abbildung 5 und Abbildung 6 geben einen Überblick über einen Teil der Suszeptibilitätsgene und über pathogenetische Mechanismen, an denen diese beteiligt sind. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) haben das Verständnis molekularer Mechanismen, die M. Crohn oder C. ulcerosa bedingen, maßgeblich verbessert.

Heute sind verschiedene Signalwege bekannt, deren Gene im Zusammenhang mit der Suszeptibilität zu CED eine besondere Rolle spielen. Dazu gehören Gene, die das angeborene und erworbene Immunsystem regulieren (z.B. *IL10*, *IL23R*, *STAT3*, *JAK2*).

Ferner sind Gene der Entzündungsregulierung (z.B. *CCR6*, *MST1*) und solche der proinflammatorischen IL-23/Th17-Zellaktivierung von Bedeutung. Auch Regulatoren des endoplasmatischen Retikulums und der Autophagozytose (*ATG16L1*, *IRGM*, *ORMDL3*, *XBPI*) nehmen Einfluss [10,114,115,116,117,118,119,120].

Für viele dieser durch GWAS identifizierten Genloci fehlen jedoch nach wie vor Daten, die den genetischen Einfluss auf Erkrankung und Phänotyp in unterschiedlichen ethnischen Kohorten durch Replikationsstudien genauer beleuchten.

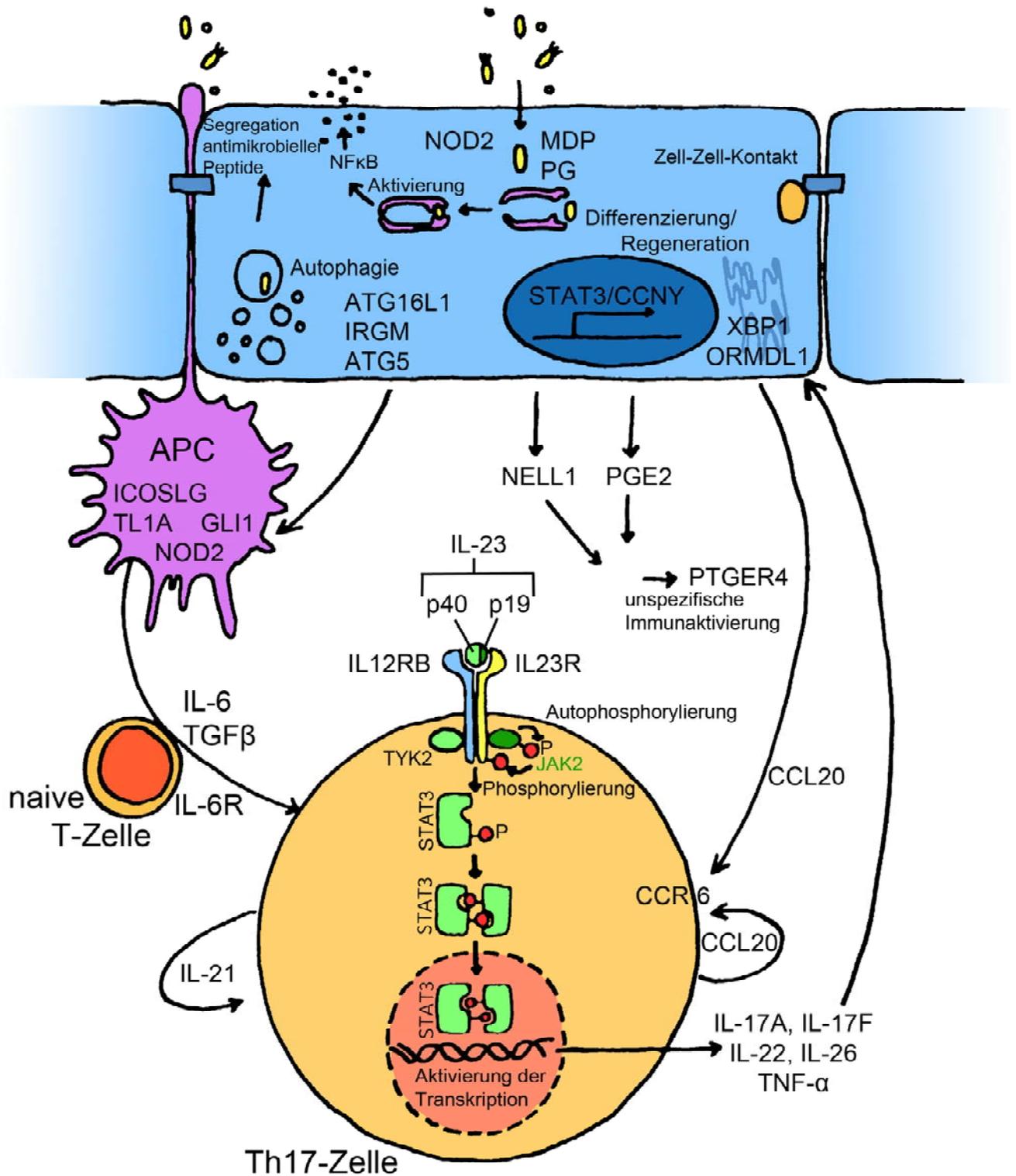


Abbildung 5. Suszeptibilitätsgene für *M. Crohn* und *C. ulcerosa* und ihre Funktion im mukosalen Immunsystem. Schwerpunktmäßig kommen *NOD2*, *ATG16L1* und Gene, die in Bezug auf Th17-Zellen eine Rolle spielen, zur Darstellung. Eigene Grafik auf der Grundlage von [51,66,87].

Abbildung 6 gibt einen Überblick über die wichtigsten Suszeptibilitätsgene für M. Crohn sowie C. ulcerosa und zeigt, welche mit beiden Erkrankungen assoziiert sind. Zu letzteren mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Zusammenhang stehenden Genen, zählen vor allem solche, die im IL23/Th17-Signalweg eine wichtige Rolle spielen (*IL23R*, *IL12B*, *JAK2*, *TYK2* und *STAT3*). Detailliert werden Bedeutung und Funktion dieser Gene unter Abschnitt 2.2.3 erläutert. Im Falle von M. Crohn spielt ein Defekt in der Prozessierung intrazellulärer Bakterien eine wichtige Rolle für die Entzündung. Diese Erkenntnis führte zur Entdeckung einiger an Autophagozytose beteiligter Gene des angeborenen Immunsystems (*NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*), welche spezifisch mit M. Crohn assoziiert sind [66].

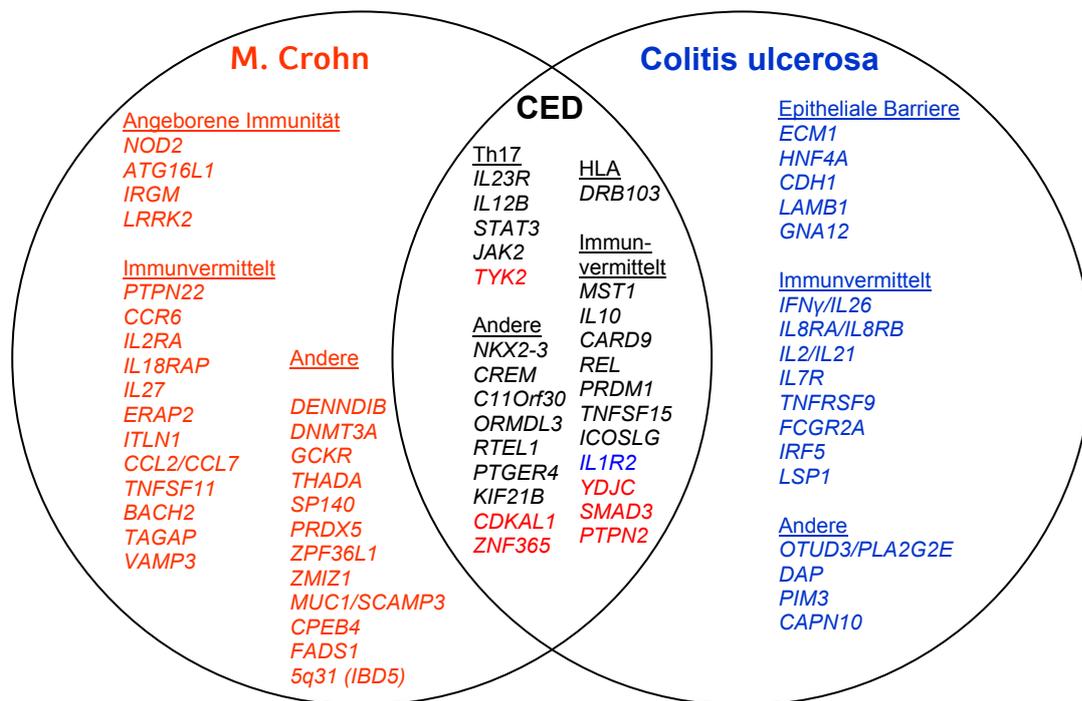


Abbildung 6. Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (schwarz), M. Crohn (rot) und C. ulcerosa (blau). Modifiziert nach [66].

2.2.3 *IL23R* und *IL12B* - Lokalisation, Funktion und Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Th17-Zellen und ihre Bedeutung für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Frühere Forschungen machten Th1-Zellen maßgeblich für die Entzündung beim M. Crohn und Th2-Zellen bei C. ulcerosa verantwortlich. Heute ist eine zusätzliche T-Helfer-Zellpopulation bekannt: die Th17-Zellen. Diese spielen nicht nur eine wichtige Rolle in der Abwehr extrazellulärer Pathogene, sondern werden unter anderem für die Entstehung von Autoimmunität und Entzündungen wie dem M. Crohn verantwortlich gemacht [121].

Der IL-23/Th17-Signalweg spielt eine zentrale Rolle für die Homöostase des intestinalen Immunsystems und die Entzündungsantwort zur Abwehr bakterieller Infektionen [47,114,122,123]. Betrachtet man die 140 Suszeptibilitäts-Regionen für M. Crohn, finden sich unter den am stärksten assoziierten vier Gene, die eine entscheidende Rolle im IL23R-Signalweg spielen (*IL23R*, *IL12B*, *STAT3* und *JAK2*) [86,112,113,124]. Genomweite Assoziationsstudien und große Kohortenstudien zeigten eine Assoziation weiterer an der Th17-Zelldifferenzierung beteiligter Gene (u.a. *TYK2*, *CCR6*, *IL2/IL21* und *TNFSF15*) mit M. Crohn und teilweise zusätzlich mit C. ulcerosa [112,113,125]. Basierend auf Daten des Wellcome Trust Case Control Consortiums (WTCCC) konnte eine Analyse von 20 am IL-12-Signalweg beteiligten Genen (u.a. *IL12B*, *JAK2*, *CCR6*, *STAT3*) einen Zusammenhang des IL-12-Signalwegs mit dem IL-23-Signalweg und eine Assoziation von M. Crohn mit den im IL-12/IL-23-Signalweg involvierten Genen zeigen [120]. Die Kenntnis über die zentrale Bedeutung des IL-23/Th17- und des IL-12/IL-23-Signalwegs eröffnet möglicherweise neue Therapiemöglichkeiten für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

Lokalisation und Funktion von *IL12B* und *IL23R*

Die Gene *IL12B* (*Interleukin 12 subunit beta*) und *IL23R* stehen in engem Zusammenhang. IL-12 und IL-23 werden vor allem von dendritischen Zellen und Makrophagen produziert, welche zuvor durch bakterielle Stimulation aktiviert wurden. Die beiden proinflammatorischen Zytokine sind von einzigartiger Bedeutung für das Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunität [126].

Funktionell ist IL-23 unter anderem von großer Bedeutung für CD4⁺ Th17-Zellen, welche sich durch die Sekretion von IL-17 und die Expression des Transkriptionsfaktors (ROR) γ t (*retinoic acid-related orphan receptor*) auszeichnen. Das Gleichgewicht zwischen Effektor-

T-Zellen, als welche Th17-Zellen fungieren, und regulatorischen T-Zellen unterliegt sehr genauen Regulationsmechanismen. Wird dieses sensible Gleichgewicht gestört, kann es zu Entzündungen und Autoimmunreaktionen kommen (vgl. Abbildung 7). Die IL-23/Th17-Signalkaskade ist an der Immunantwort beteiligt, die eine Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen spielt. Im Weiteren ist diese mitverantwortlich für die Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen [123].

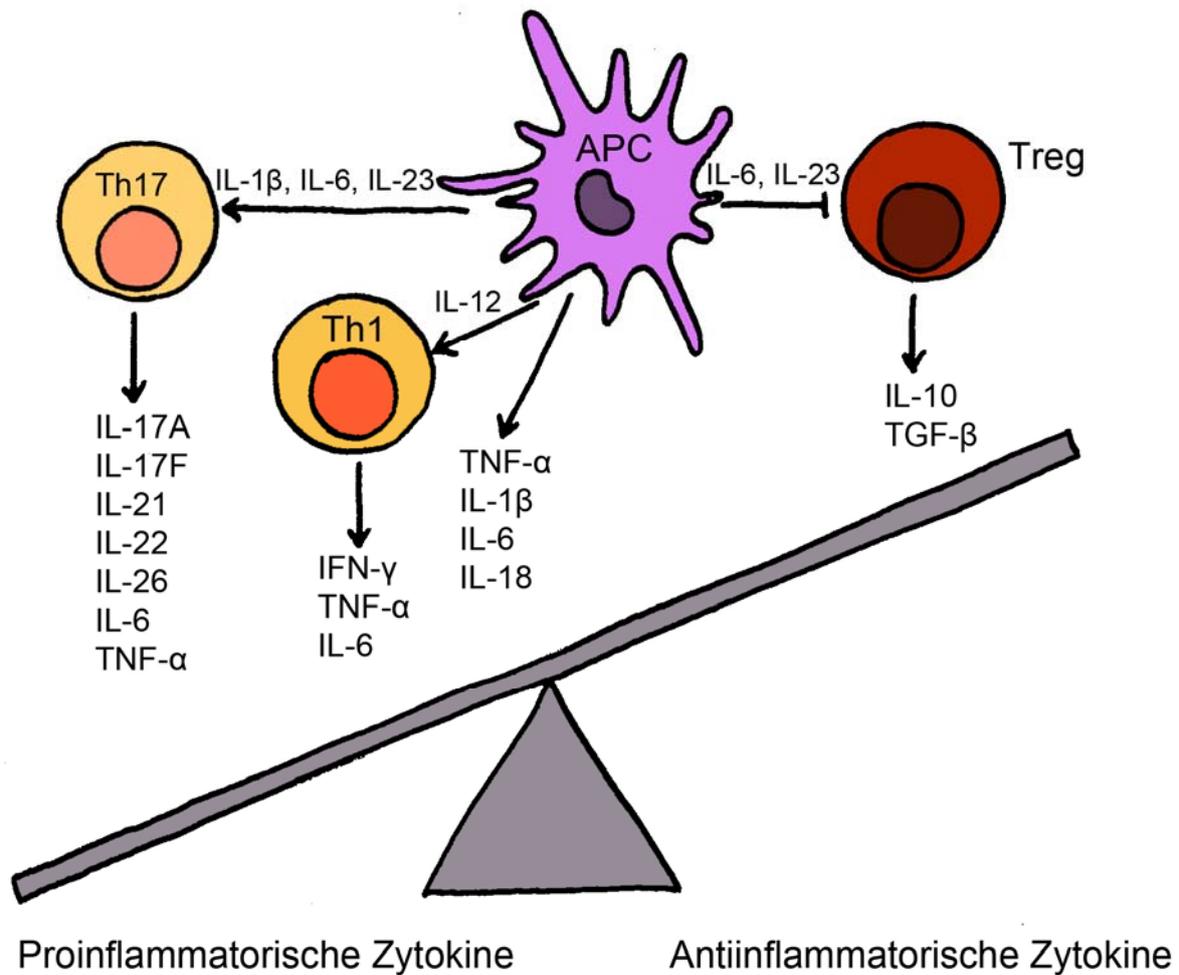


Abbildung 7. Das Ungleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Zytokine beim M. Crohn. Eigene Darstellung auf der Grundlage von [47].

Bei IL-12 handelt es sich um ein ursprünglich 1989 entdecktes, heterodimeres Zytokin mit einem Molekulargewicht von 70kD, bestehend aus den zwei Untereinheiten p40 und p35 [127,128]. IL-23 ist ein heterodimeres Zytokin, bestehend aus einer p19- und einer p40-Untereinheit, wobei die p40-Untereinheit auch Teil von IL-12 ist.

IL12B ist auf Chromosom 5 (5q31.1-q33.1) lokalisiert. Auf genetischer Ebene kodiert *IL12B* die p40 Untereinheit. Sie ist Teil der beiden Zytokine IL-12 und IL-23. *IL23R* kodiert hingegen eine der beiden Untereinheiten des IL-23-Rezeptors. Sowohl IL-12 als auch IL-23 binden an die IL12-Rezeptor-Untereinheit IL12R β 1 [129].

IL-12 ist der wichtigste Differenzierungsfaktor für die Entwicklung von naiven CD4⁺ Zellen zu reifen IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen (vgl. Abbildung 8). Außerdem fungiert IL-12 als starker Stimulus für natürliche Killerzellen und CD8⁺ T-Zellen [127,130,131]. Zelluläre Effekte von IL-12 werden hauptsächlich über STAT4-Aktivierung vermittelt [132]. IL-23 hingegen bedingt zusammen mit TGF- β 1 und IL-6 die Differenzierung von CD4⁺ Zellen in Th17-Zellen und ist verantwortlich für deren Aktivierung. Außerdem ist IL-23 nötig für die Bildung von Gedächtnis-T-Zellen [127,133]. Zusätzlich scheint IL-23 eine wichtige Rolle bei der Sekretion von IL-17 durch CD8⁺ T-Zellen zu spielen [134,135]. Die von Th17-Zellen ausgeschütteten Zytokine wie IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 und das Th17-Chemokin CCL20 wiederum sind für die intestinale Entzündungsreaktion beim M. Crohn entscheidend [136,137,138,139,140,141].

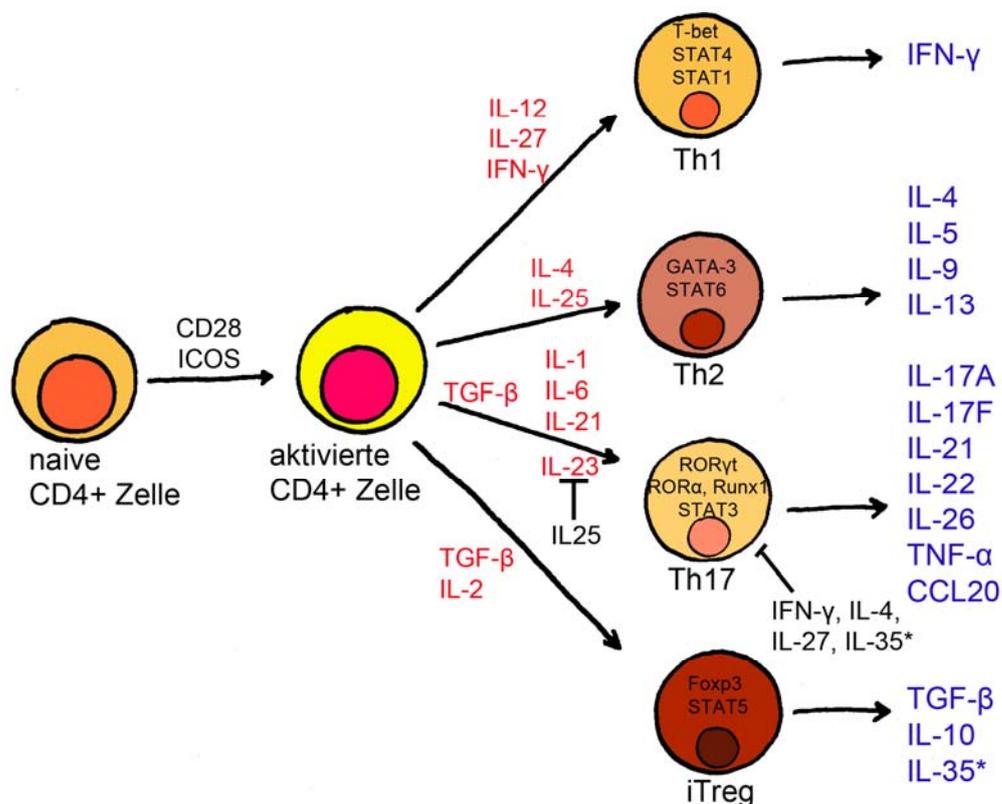


Abbildung 8. Die Entwicklung von T-Helfer(Th)1-, Th2-, Th17- und regulatorischen T(Treg)- Zellen aus naiven CD4⁺ Zellen. Eigene Grafik auf der Grundlage von [47].

Duerr et al. identifizierten *IL23R* als Suszeptibilitätsgen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen [114]. Seither wurde *IL23R* mehrfach in GWAS nicht nur als Suszeptibilitätsgen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen bestätigt, sondern auch dessen Assoziation mit weiteren Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis [142,143,144] und Spondylitis ankylosans gezeigt [145]. Dies lässt einen gemeinsamen pathophysiologischen Hintergrund des Entzündungsprozesses vermuten.

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein signifikant höheres Risiko, an Psoriasis zu leiden. Umgekehrt erkranken auch Psoriasispatienten mit höherer Wahrscheinlichkeit an M. Crohn oder C. ulcerosa [146]. Auch auf genetischer Ebene spiegelt sich dieser Zusammenhang wider. Sowohl *IL12B* als auch *IL23R* sind mit M. Crohn, C. ulcerosa und Psoriasis assoziiert [66,143,147]. Krueger et al. konnten eine Wirkung von monoklonalen Interleukin-12B/23-Antikörper gegen Psoriasis zeigen [148]. Mit dem Hintergrund genetischer Gemeinsamkeiten der beiden Krankheitsentitäten könnte ein Einsatz auch bei M. Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten von Bedeutung sein.

Eine erhöhte Inzidenz von Spondylitis ankylosans unter Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist seit längerem bekannt [149]. Inzwischen ist auch eine genetische Assoziation mehrerer CED-Suszeptibilitätsgene mit Spondylitis ankylosans bekannt, dazu gehört u.a. *IL23R* [66]. Zusätzlich konnte für *IL23R* eine Assoziation mit chronischer Sarkoidose [150] gezeigt werden.

Auch für Multiple Sklerose beziehungsweise ihr Mausmodell, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) [151] und Arthritis, ebenfalls im murinen Modell [152], spielt der IL-23-Signalweg eine Rolle im Entzündungsgeschehen [123].

Mit der Erkenntnis, welche Bedeutung die neu entdeckte Th17-Zellpopulation für Entzündungsreaktionen hat, geht ein Paradigmenwechsel im Verständnis der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen einher [153]. Die einzelnen Moleküle der IL-23/Th17-Signalkaskade bieten Angriffspunkte für neue Therapiestrategien in der Behandlung dieser Autoimmunerkrankungen. Neben den von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen betroffenen Patienten profitieren wahrscheinlich auch an Psoriasis, Rheumatoider Arthritis, Diabetes oder Multipler Sklerose Erkrankte von den weiterentwickelten Medikamenten. Denn auch bei diesen Erkrankungen konnte eine Beteiligung des IL-23/Th17-Signalwegs an der Entzündung festgestellt werden [154,155].

Eine Therapie mit Anti-IL12/IL23p40-Antikörpern, die sich sowohl gegen Th1- als auch gegen Th17-Zellen richtet, scheint eine wirksame Therapiestrategie beim M. Crohn zu sein. Dennoch ist der komplexe Zusammenhang zwischen Th1- und Th17-Zellen noch nicht verstanden [47]. Während die Assoziation von *IL23R* in mehreren Studien repliziert werden konnte und als bestätigt gilt, finden sich zu *IL12B* teilweise unterschiedliche Ergebnisse.

Abbildung 9 zeigt, wie die von Th17-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen (APC) und Darmepithelzellen freigesetzten Zytokine interagieren. Nach einer Aktivierung des toll-like Rezeptors (TLR) und NOD2 durch bakterielle Produkte sezernieren APC-Zellen IL-23 und IL-12. IL-23 fördert die Differenzierung von Th17-Zellen, IL-12 die Entwicklung von Th1-Zellen [47].

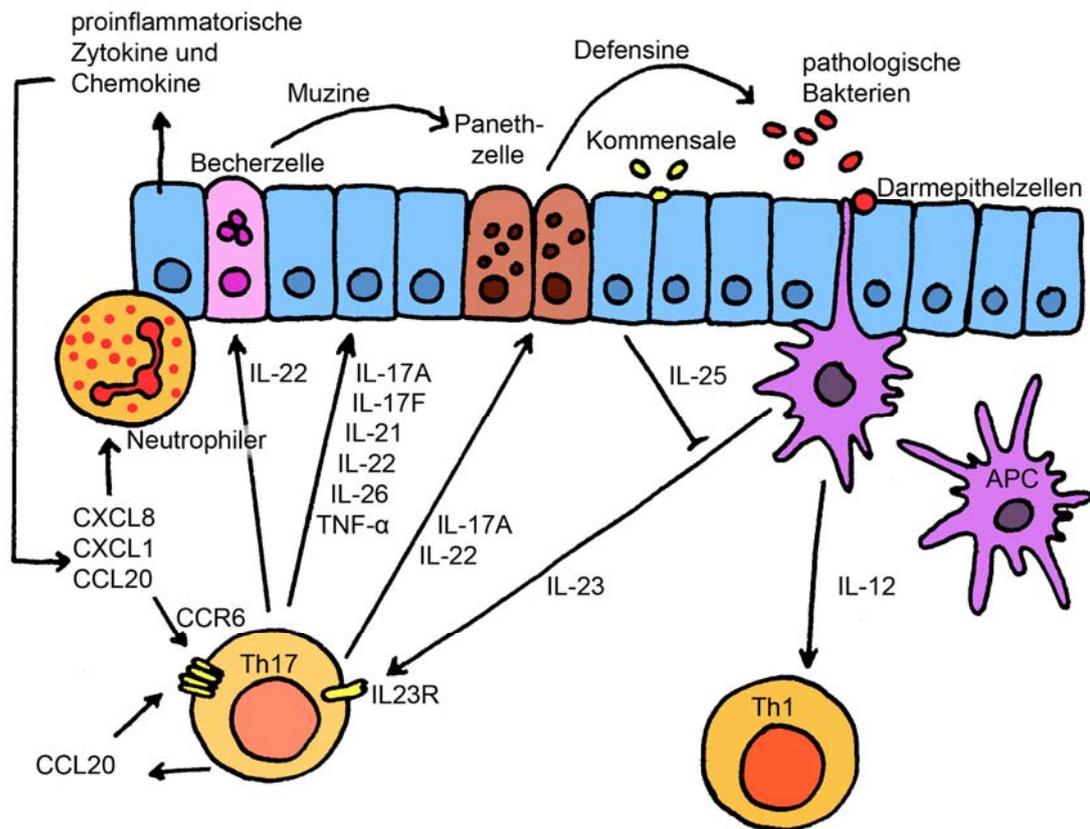


Abbildung 9. Interaktionen zwischen den Zytokinen, die bei M. Crohn von Th17-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen (APC) und intestinalen Epithelzellen freigesetzt werden. Zu erkennen ist auch der Zusammenhang zwischen IL-12B und Th1 Zellen, sowie IL-23 und Th17 Zellen. Eigene Grafik auf der Grundlage von [47].

2.2.4 *PTPN2* - Lokalisation, Funktion und Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Lokalisation und Funktion von *PTPN2*

Eines der erst kürzlich durch GWAS identifizierte Kandidaten-Gene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen ist das *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2* Gen (*PTPN2*). *PTPN2* ist auf Chromosom 18 (18p11.3-p11.2) lokalisiert. Das Gen *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2* (*PTPN2*) kodiert die humane T-Zell Protein Tyrosin Phosphatase (TC-PTP). Dieses Enzym gehört zur Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), wirkt durch Dephosphorylierung und wird ubiquitär exprimiert. Besonders hoch ist die Expression in blutbildenden Geweben.

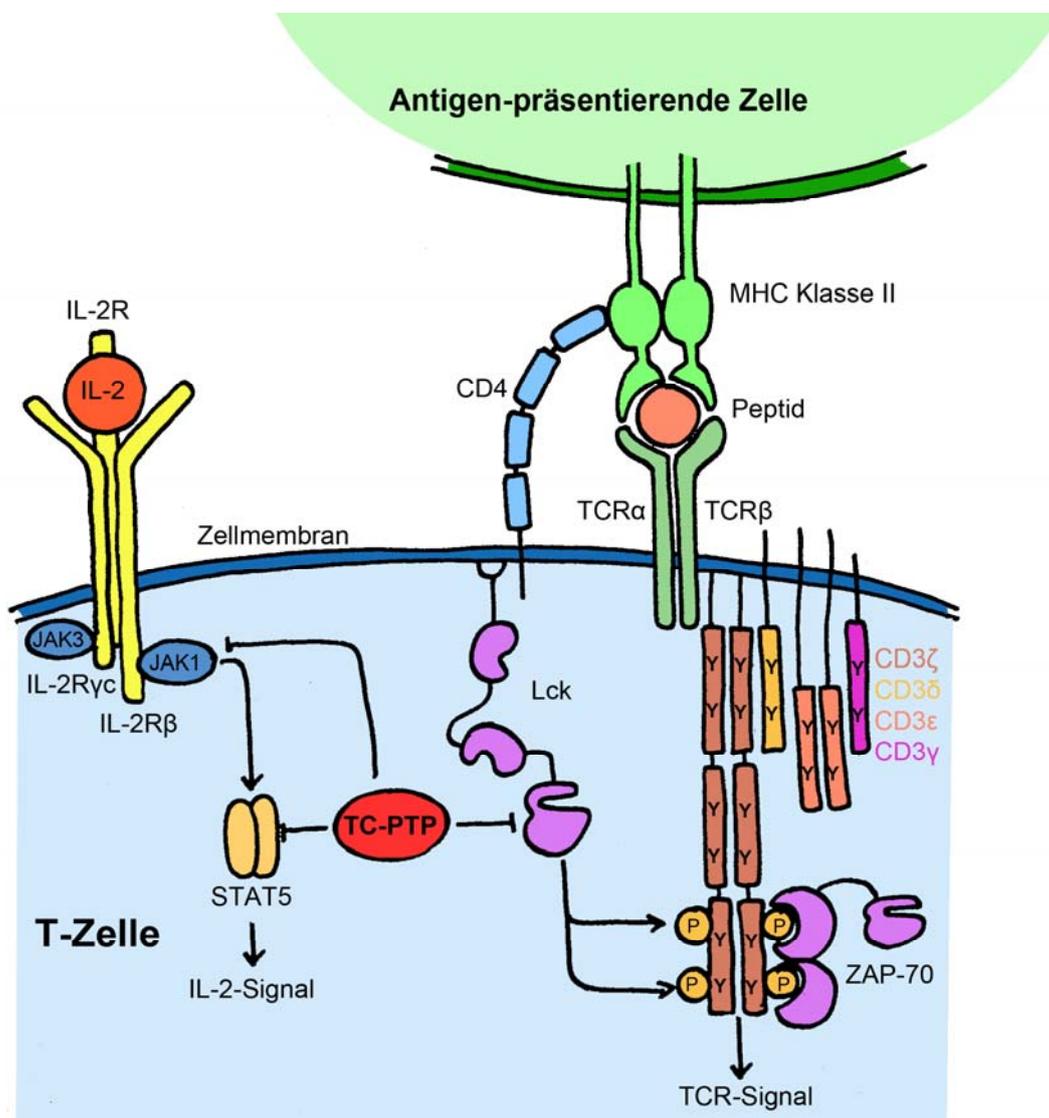


Abbildung 10. Grafik zur Funktion von PTPs in der Zelle. Eigene Grafik auf der Grundlage von [156].

Die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung ist ein dynamischer Prozess, der durch die gegensätzliche Wirkung von Protein-Tyrosin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Phosphatasen im Gleichgewicht gehalten wird. Zu einer Signalverstärkung kann es demnach entweder durch eine verstärkte Kinaseaktivität oder durch einen Funktionsverlust der entgegengesetzten Regulation durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen kommen [157].

Unter den PTPs nimmt TC-PTP eine besondere Stellung ein. Fast alle Zellen, die an der Entwicklung des Immunsystems beteiligt sind, von Stammzellen bis hin zu differenzierten Zellen, scheinen unter dem Einfluss von PTPs zu stehen.

Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) spielen als Regulatoren für verschiedene Zellfunktionen eine entscheidende Rolle. Neueste Studien ordnen TC-PTP eine zentrale Funktion für verschiedenste menschliche Erkrankungen zu. Dazu zählt eine Beteiligung von PTPs bei der Pathogenese von Entwicklungsstörungen, Neoplasien, Immundefekten und Autoimmunität [158,159].

TC-PTP wirkt durch die Dephosphorylierung ihrer Substrate und wird in zwei Varianten exprimiert. Diese entstehen durch alternatives Splicing [160]. Folgende Isoformen des Enzyms sind bekannt: Die Isoform TC45 (45 kDa) trägt ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal* = NLS), während die längere TC48-Variante (48 kDa) mit dem endoplasmatischen Retikulum in Verbindung steht [161]. Für TC45 konnten mehrere Substrate identifiziert werden, darunter Janus-Kinasen (JAKs), *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 und 3, p42/44 Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) (*extracellular signal-related kinase* [ERK]), *epidermal growth factor receptor* (EGFR) sowie Insulin-Rezeptor- β (IR β) [162,163,164,165,166].

PTPN2 spielt in der Pathogenese von M. Crohn eine maßgebliche Rolle. Ein gezielt induzierter teilweiser Funktionsverlust (*knockdown*) von *PTPN2* führt zur verstärkten IFN- γ -induzierten STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in intestinalen Epithelzellen, was eine Aktivierung der Signalkaskade nach sich zieht. Dadurch kommt es zur vermehrten Sekretion von IL-6 und MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein 1*) und letztendlich zur erhöhten Permeabilität der Epithelbarriere des Darms. Eine Dysregulation von *PTPN2* trägt somit zur Entstehung und dem Fortschreiten des Entzündungsgeschehens eines M. Crohn bei. Im Umkehrschluss nimmt das intakte *PTPN2*, das selbst durch IFN- γ aktiviert wird, eine Schlüsselrolle zur Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion und zur Regulation des Entzündungsprozesses ein [46,167].

Mehrere aktuelle Studien konnten zeigen, dass TC-PTP als negativer Regulator bei der zytokinvermittelten Signaltransduktion [168] und der T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion (*TCR-Signalling*) fungiert [169]. Dieser Zusammenhang und der oben beschriebene Einfluss von TC-PTP auf weitere Signalwege wird in Abbildung 10 dargestellt. Dem Enzym kommt als negativem Regulator der Immunantwort eine entscheidende Rolle nicht nur in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu [170].

Da TC-PTP ubiquitär exprimiert wird, können krankheitsassoziierte Polymorphismen im *PTPN2*-Gen auch die Genexpression und das Splicing in vielen anderen Geweben beeinflussen [156].

Scharl et al. konnten ferner zeigen, dass ein *knockdown* von *PTPN2* Einfluss auf den Prozess der Autophagozytose nimmt, wobei die Phagosomenbildung gestört wird. Diese Funktionsstörung führt zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen von *Listeria monocytogenes*. Als Folge erhöhter TNF- α - und IFN- γ -Spiegel gehen vermehrt intestinale Epithelzellen in die Apoptose [171]. Epithelzellen und dendritische Zellen, die Variationen im Bereich der mit M. Crohn assoziierten Gene *NOD2* und *ATG16L1* aufweisen, zeigen Funktionsverluste bei der Autophagozytose von Bakterien. Bei dendritischen Zellen lässt sich eine gestörte Präsentation exogener Antigene an CD4⁺ T-Zellen beobachten. Diese Ergebnisse beleuchten den engen Zusammenhang zwischen *NOD2*, *ATG16L1* und der Autophagozytose und die damit einhergehende Beeinträchtigung der intrazellulären Prozessierung und Kommunikation mit dem erworbenen Immunsystem [172].

***PTPN2* und seine Assoziation mit weiteren Autoimmunerkrankungen**

PTPN2-Varianten sind neben den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit weiteren Autoimmunerkrankungen assoziiert (Abbildung 11).

Dazu zählen die juvenile Arthritis [173], Diabetes mellitus Typ 1 und Zöliakie [174,175,176]. Im Falle von Diabetes modifiziert *PTPN2* die Betazell-Antwort auf virale RNA und übt eine regulatorische Funktion bei der Apoptose von Betazellen aus [177,178].

Auch ein Zusammenhang von *PTPN2* mit akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) konnte in Studien beobachtet werden. Ein therapiemodulierender Effekt bei Funktionsverlust von *PTPN2* wird vermutet [157,179].

Eine Assoziation von *PTPN2* mit M. Basedow konnte ebenso gezeigt werden [180] wie eine Assoziation von *PTPN2* mit rheumatoider Arthritis in einer japanischen Meta-Analyse [181].

Eine GRAIL-Analyse (engl. *Gene Relationships Across Implicated Loci*) (siehe Abbildung 20 im Kapitel 6) in der von Franke et al. 2010 veröffentlichten Metaanalyse genomweiter Assoziationsstudien [113] konnte eine Interaktion zwischen dem *PTPN2*-verwandten *PTPN22*-Gen und *NOD2* zeigen. Auch in vorliegender Arbeit erfolgte, basierend auf diesem bekannten Zusammenhang, eine Analyse der Gen-Gen-Interaktion von *PTPN2* mit *NOD2*.

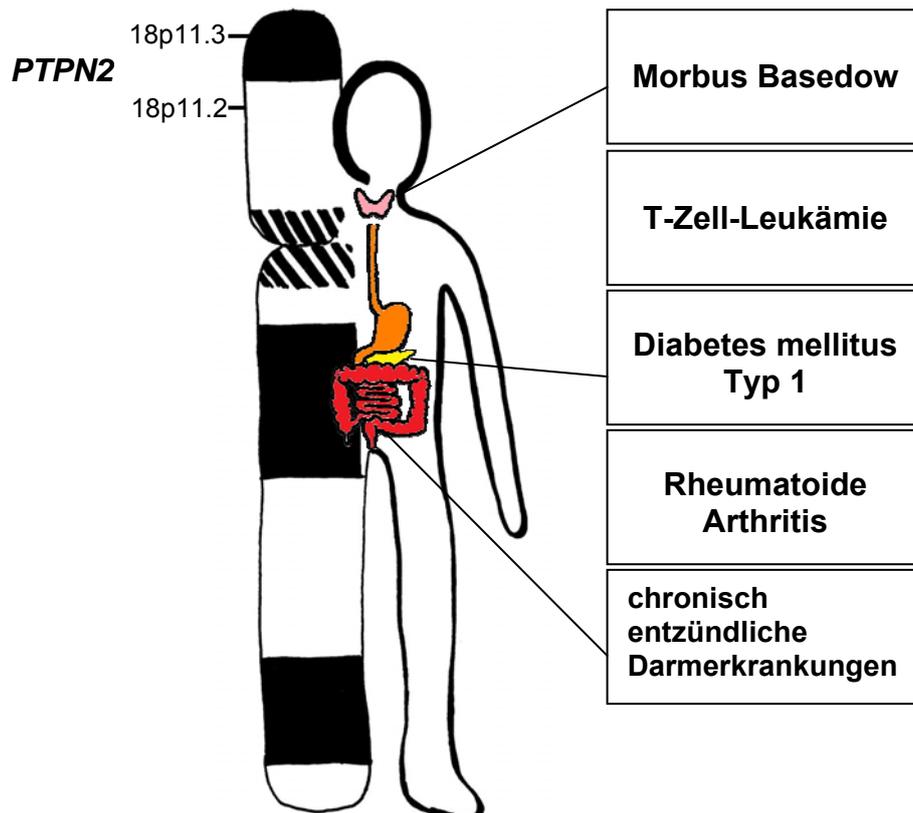


Abbildung 11. Diverse Studien belegen die Suszeptibilität von *PTPN2* auf Chromosom 18 mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Dies lässt auf einen engen Zusammenhang von Erkrankung und Genetik schließen.

3 Zielsetzung

Trotz intensiver Forschungen gibt es bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Vielzahl ungelöster Fragen. Der gezielte Einsatz neuer Medikamente, welche auf molekularbiologischer Ebene in die Vorgänge des Immunsystems eingreifen, hat gezeigt, dass weitere Anstrengungen vielversprechend sind [182]. Diese Erfolge waren nur aufgrund genauer Kenntnis der Pathogenese von M. Crohn und C. ulcerosa möglich. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) waren der Auslöser zu einer langen Reihe genetischer Forschungen, die bis heute nicht abgeschlossen sind. Da genetische Zusammenhänge weltweit stark variieren, bedarf es diverser Replikationsstudien, die mögliche Suszeptibilitäten für einzelne Populationen überprüfen (vergleiche 2.2.2) [21]. *IL12B* und *PTPN2* sind zwei Gene, die in aktuellen GWAS als Suszeptibilitätsloci für chronisch entzündliche Darmerkrankungen aber auch andere Erkrankungen wie z.B. die Psoriasis identifiziert wurden [65,112,113,124,183]. Für beide Gene mangelt es jedoch an Daten zu ihrer genauen Bedeutung insbesondere in der deutschen Bevölkerung.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle von *IL12B*- und *PTPN2*-Polymorphismen bezüglich ihrer Suszeptibilität zu M. Crohn und C. ulcerosa an einer großen deutschen Kohorte zu prüfen. Im Detail wurden dabei folgende Ziele verfolgt:

1. Analyse der Assoziation von vier SNPs im *IL12B*-Gen (rs3212227, rs6887695, rs10045431, rs17860508) und von zwei SNPs im *PTPN2*-Gen (rs2542151, rs7234029) mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch Genotypisierung.
2. Durchführung einer detaillierten Genotyp-Phänotyp-Analyse.
3. Analyse der jeweiligen Gen-Gen-Interaktionen zwischen *IL12B* und weiteren am IL-12- und IL-23-Signalweg beteiligten Gene und zwischen *PTPN2*, *NOD2*, *IL23R* sowie *ATG16L1*.
4. Durchführung einer Haplotyp-Analyse von CED-assoziierten *IL12B*- und *PTPN2*-SNPs.
5. Untersuchung des Einflusses von *IL12B*-Polymorphismen auf Anti-TNF-induzierte psoriasiforme Hautläsionen bei CED-Patienten.
6. *In silico*-Analyse bzgl. potenzieller Veränderungen des DNA-Bindungsverhaltens von Transkriptionsfaktoren und Beeinflussung der Genexpression durch *IL12B*- und *PTPN2*-SNPs.

4 Material und Methoden

4.1 Studiendesign und Studienpopulation

4.1.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine populationsbasierte genetische Assoziationsstudie. Ziel war es, den Zusammenhang zwischen einer bestimmten Erkrankung und genetischen Merkmalen genauer zu untersuchen.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Das Studienprotokoll folgte den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki für Medizinische Forschung an Menschen (*WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*) (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> (Stand: 9.9.2013)).

4.1.2 Studienpopulation

Alle Patienten wurden über Inhalt und Ziele der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Teilnahme. Bei Minderjährigen erfolgte die Unterschrift durch die Erziehungsberechtigten. Die Studienpopulation (n=2196) umfasste 1231 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, darunter 913 Patienten mit M. Crohn, 318 Patienten mit C. ulcerosa und 965 nicht verwandte, gesunde Kontrollpersonen. Es handelt sich um eine Bevölkerungsgruppe deutscher Abstammung. Grundvoraussetzung für eine Aufnahme in die Studie war eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histopathologischer Kriterien gesicherte leitliniengerechte Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. Patienten mit Colitis indeterminata wurden von der Studie ausgeschlossen. In einem standardisierten Fragebogen (siehe Anhang) wurden von den Patienten spezielle Kriterien zur besseren Einordnung des Erkrankungsstadiums erfragt. Die Studienpatienten wurden hauptsächlich in der CED-Ambulanz der Medizinischen Klinik II des Klinikums der Ludwigs-Maximilians-Universität München (Standort Großhadern) rekrutiert. Weitere Patienten stammen aus der Medizinischen Klinik der LMU (Standort Innenstadt Ziemssenstraße). Nachfolgende Tabelle gibt Auskunft über die demographischen Daten der Studienpopulation, welche hinsichtlich der Ergebnisse der Genotypisierung verblindet aufgenommen wurden (Tabelle 2).

	M. Crohn <i>n=913</i>	C. ulcerosa <i>n=318</i>	Kontrollen <i>n=965</i>
Geschlecht			
Männlich (%)	48,9	52,2	63,5
Weiblich (%)	51,1	47,8	36,5
Alter (in Jahren)			
Mittelwert ± SD	40,9± 13,2	44,2± 14,8	46,0± 10,3
Altersverteilung (<i>range</i>)	15-83	17-88	19-68
Body Mass Index (BMI)			
Mittelwert ± SD	23,0 ± 4,2	23,9 ± 4,5	
Wertebereich (<i>range</i>)	13-41	15-54	
Alter bei Diagnosestellung (in Jahren)			
Mittelwert ± SD	26,1± 12,3	28,9± 14,5	
Altersverteilung (<i>range</i>)	1-78	2-81	
Krankheitsdauer (in Jahren)			
Mittelwert ± SD	13,4 ± 8,9	12,2 ± 8,3	
Wertebereich (<i>range</i>)	0-47	1-50	
Positive Familienanamnese für CED (%)	16,8	17,4	

Tabelle 2. Demographische Daten der Studienpopulation.

Die Einteilung der Crohn-Patienten erfolgte nach den Kriterien der Montreal-Klassifikation [29] basierend auf Alter bei Diagnosestellung, Lokalisation der Entzündung und Krankheitsverhalten (siehe Tabelle 3).

Kriterien	Code	Beschreibung
Alter bei Diagnosestellung	A1	≤16 Jahre
	A2	17-40 Jahre
	A3	>40 Jahre
Befallsmuster/ Lokalisation des Befalls	L1	Terminales Ileum
	L2	Kolon (<i>colonic</i>)
	L3	Ileokolon (<i>ileocolonic</i>)
	L4	Oberer GI-Trakt
Verhalten (<i>behaviour</i>)/Klinisches Bild	B1	nicht stenosierend/nicht penetrierend
	B2	stenosierend
	B3	penetrierend

Tabelle 3. Alter bei Diagnosestellung, Befallsmuster und klinisches Bild von M. Crohn kategorisiert nach der Montreal-Klassifikation. Modifiziert nach [29].

Auch Patienten mit *C. ulcerosa* wurden anhand der Montreal-Klassifikation nach anatomischer Lokalisation in die Gruppen mit Proktitis (E1), linksseitiger Colitis ulcerosa (distale CU; E2) und Pancolitis (E3) eingeordnet (siehe Tabelle 4). Patienten mit einer Colitis indeterminata wurden von der Studie ausgeschlossen.

Code	Krankheitsausmaß
E1	Proktitis
E2	Linksseitige Kolitis
E3	Pankolitis

Tabelle 4. Maß der Krankheitsaktivität und Ausbreitung von *C. ulcerosa* eingeteilt nach der Montreal-Klassifikation für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Modifiziert nach [29].

Ferner wurden Body Mass Index (BMI), Raucher-Status, Größe, Gewicht, Familienanamnese bzgl. chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sowie das Vorhandensein von Fisteln, Stenosen, Abszessen oder extraintestinalen Manifestationen anamnestisch erfasst und in der Krankenakte dokumentiert. Außerdem wurde erhoben, ob es sich um einen postoperativen Zustand handelt. Als gesunde Vergleichspopulation dienten Blutspender. Neben den regulären Voraussetzungen, die für eine Blutspende erfüllt sein müssen, wurde Wert auf die Eigenanamnese „gesund“ gelegt.

4.1.3 Phänotypisierung

Die Phänotypisierung erfolgte mittels der Information aus standardisierten Fragebögen (siehe Anhang, Abbildung 22 und Abbildung 23). Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte eine Aktualisierung und Neuerhebung der Daten von 500 Patienten der Studienpopulation durch Auswertung der Fragebögen und Eintrag der gewonnenen Informationen in die Datenbank.

4.2 Materialien für molekularbiologische Experimente

Die folgende Tabelle 5 listet Materialien auf, die bei der Durchführung der molekularbiologischen Experimente verwendet wurden.

Material	Hersteller
QIAGEN, HotStarTaq® DNA Polymerase 1000 units	Qiagen, Hilden
Coral Load PCR Buffer, 10x, containing 15 mM MgCl ₂	Qiagen, Hilden
HotStarTaq® Plus, DNA Polymerase, 5 units/µl	Qiagen, Hilden
Q-Solution, 5x	Qiagen, Hilden
MgCl ₂ 25mM	Qiagen, Hilden
SIGMA, Deoxynucleotide Mix, 10mM	SIGMA, Steinheim
QIAGEN, QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden
Buffer PBI, Binding buffer	Qiagen, Hilden
Buffer PE, Wash buffer (55ml Buffer + 220 ml Ethanol)	Qiagen, Hilden
Buffer EB, Elution buffer	Qiagen, Hilden
QIAquick® Spin Columns	Qiagen, Hilden
Polymerase Mix, LightCycler®480 Genotyping Master 5x conc.	Roche, Mannheim
LightCycler® 480 Control Kit	Roche, Mannheim

Tabelle 5. PCR-Materialien und PCR-Kits.

4.3 Primer und Sonden

Sämtliche Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) hergestellt.

Primer für die quantitative PCR

F, A = forward Primer R, S = backward Primer

Bei den PCR-Primern war zu beachten, dass sie nicht auf den variablen Sequenzen liegen. Dort müssen sich die Sonden anlagern können. Des Weiteren durften Primer und Sonden keine komplementären Sequenzen enthalten. Tabelle 6 zeigt die Primer, die bei der quantitativen PCR für *IL12B* zum Einsatz kamen.

SNP	Sequenz
rs10045431_S	5'-CAACTTGGCCTGAAGGCA-3'
rs10045431_R	5'-GCACTCCCACGTACCCCAT-3'
rs3212227_F	5'-GAGGAAAAGTGGGAAGATATTAAGC-3'
rs3212227_R	5'-AAGGCCCATGGCAACTTG-3'
rs6887695_F	5'-CTTCCTGCCTCCGCTAGCC-3'
rs6887695_A	5'-AACACCCCCTAGGTCACAA-3'
rs17860508_F	5'-GGCTGATGCTTGGAGATTGTGAT-3'
rs17860508_R	5'-GTCTGGATTGTGAAGTGGGAC-3'

Tabelle 6. Primer für die quantitative PCR bei *IL12B*.

Die bei der PCR für *PTPN2* verwendeten Primer und Sequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

SNP	Sequenz
rs7234029_F	5'-AGCACTACAGGTAGTCACATGGGTA-3'
rs7234029_R	5'-CCTTTTAAAATGTCAGCACCTTAG-3'
rs2542151_S	5'-GATGCCACGTGGGCGCTGT-3'
rs2542151_A	5'-GAGCGAAGTCCCTATCGCA-3'

Tabelle 7. Primer für die quantitative PCR bei *PTPN2*.

Primer für die qualitative PCR

Für die qualitative PCR standen dieselben Primer zur Verfügung, die auch im LightCycler®480 zum Einsatz kamen. Teilweise lieferten jedoch andere Kombinationen bessere Ergebnisse. In Tabelle 8 sind daher die hierbei für *IL12B* zum Einsatz kommenden Primer-Sequenzen zusammengefasst.

SNP	Sequenz
rs10045431_F	5'-GCTTAGGAGAGCTTGGTCCAT-3'
rs10045431_A	5'-GGAGGGGCCCAACCT-3'
rs3212227_F	5'-GAGGAAAAGTGAAGATATTAAGC-3'
rs3212227_R	5'-AAGGCCCATGGCAACTTG-3'
rs6887695_F	5'-CTTCTGCCTCCGCTAGCC-3'
rs6887695_A	5'-AACACCCCCTAGGTCACAA-3'
rs17860508_F	5'-GGCTGATGCTTGGAGATTGTGAT-3'
rs17860508_R	5'-GTCTGGATTGTGAAGTGGGAC-3'

Tabelle 8. Primer für die qualitative PCR bei *IL12B*.

Die folgende Tabelle 9 wiederum listet die für *PTPN2* verwendeten Primersequenzen auf.

SNP	Sequenz
rs7234029_F	5'-AGCACTACAGGTAGTCACATGGGTA-3'
rs7234029_R	5'-CCTTTTAAAATGTCAGCACCTTAG-3'
rs2542151_F	5'-CCTGCTCCTGTCTCCAAA-3'
rs2542151_R	5'-TACACGGTGAAGACCATTAC-3'

Tabelle 9. Primer für die qualitative PCR bei *PTPN2*.

Hybridisierungs sonden

Eingesetzt wurden Paare von Hybridisierungs sonden, von denen jeweils die eine am 3'-Ende mit Fluorescein markiert (FL) und die andere 5'-terminal mit dem Farbstoff LightCycler® Red

610 (LC610), LC640 oder LC670 markiert war und deren 3'-Hydroxylgruppe mit einer Phosphatgruppe (PH) gegen die nicht erwünschte Extension durch die Polymerase blockiert war. Die für *IL12B* verwendeten Hybridisierungs sonden und ihre Sequenzen sind in Tabelle 10 aufgelistet.

SNP	Sequenz
rs10045431_FL [C]	5'-AGCCCAG <u>C</u> ATTAAACTCTCAA—FL-3'
rs10045431_Anchor 640nm	5'-LC640-TGATGCCTTGGCCTTGAGACTAGAG—PH-3'
rs3212227_FL [C]	5'-GCTGTATTTGTATAGTT <u>C</u> GATGCTAA—FL-3'
rs3212227_Anchor 670nm	5'-LC670-TGCTCATTGAAACAATCAGCTAATTTATGT—PH-3'
rs6887695_FL [C]	5'-TCCAGACTATT <u>G</u> ACCACTACACTAC—FL-3'
rs6887695_Anchor 610nm	5'-LC610-CTGCTTCTCTCAAAGTACTTACCGAG—PH-3'
rs17860508_FL [gc]	5'-CTGTCTCCGAGAGAGGG <u>GCT</u> '—FL-3
rs17860508_Anchor 640nm	5'-LC640-CCCCACATTAGAACAACCTGCCAA—PH-3'

Tabelle 10. Hybridisierungssonden für *IL12B*.

Tabelle 11 zeigt die entsprechenden Sonden für *PTPN2*.

SNP	Sequenz
rs7234029_FL [G]	5'-GTTGTGACTTAC <u>C</u> CTGATGTTACAAT—FL-3'
rs7234029_Anchor 640nm	5'-LC640-CTGCTAGTGTGCATAACTGGGACTCAAATCC—PH-3'
rs2542151_FL [c]	5'-TCTCAGGAAGCGCCCGA—FL-3'
rs2542151_Anchor 610nm	5'-LC610-AAGGCATTGGCGAAGTGGGGCTAC—PH-3'

Tabelle 11. Hybridisierungssonden für *PTPN2*.

Bei den Experimenten zu *IL23R* kamen die folgenden, in Tabelle 12 aufgelisteten, Primer und Sonden mit der ebenfalls angegebenen Sondenmarkierung zum Einsatz.

	Polymorphismus	5'-Primer	3'-Primer	Sensor	Anchor	LCRed
1	rs1004819	rs1004819_S	rs1004819_A	rs1004819 [C]	rs1004819 Anc	610
2	rs7517847	rs7517847_F	rs7517847_B	rs7517847 [T]	rs7517847 Anc	670
3	rs10489629	rs10489629_F	rs10489629_B	rs10489629 [g]	rs10489629 Anchor	640
4	rs2201841	rs2201841_F	rs2201841_A	rs2201841 [C]	Anchor	640
5	rs11465804	rs11465804_F	rs11465804_A	rs11465804 [T]	Anchor	610
6	rs11209026	rs11209026_S	rs11209026_A	<i>IL23R</i> Sensor [A]mt	<i>IL23R</i> Anchor	640
7	rs1343151	rs1343151_S	rs1343151_A	rs1343151 [T]	Anchor	670
8	rs10889677	rs10889677_S	rs10889677_R	rs10889677 [C]	Anchor	610
9	rs11209032	rs11209032_F	rs11209032_A	rs11209032 [G]	Anchor	640
10	rs1495965	rs1495965_F	rs1495965_B	rs1495965 [G]	Anchor	670

Tabelle 12. Primer und Sonden für *IL23R*.

4.4 Verbrauchsmaterialien

Alle im Labor verwendeten Verbrauchsmaterialien zeigt Tabelle 13.

Material	Hersteller
LightCycler®480 Multiwell Plate 384	Roche, Mannheim
LightCycler®480 Multiwell Plate 96	Roche, Mannheim
LightCycler®480 Sealing Foil	Roche, Mannheim
Versiegelungsfolie Microseal B	Biozym, Wien, Österreich
Handschuhe, Naturkautschuklatex	Meditrade, Kiefersfelden
Handschuhe Vinyl 2000	Meditrade, Kiefersfelden
Handschuhe Nitril	Semperit, Wien, Österreich
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
Pipettenspitzen (12,5µl)	Matrix, Thermo Scientific, New Hampshire, USA
Reaktionsgefäße 1,6ml, 2,0ml	Biozym, Oldendorf
Wasser für Injektionszwecke 50ml	Delta Select, Pfullingen
LightCycler® 480, H ₂ O, PCR grade	Roche, Mannheim
Labortücher	Kimberly-Clark Europe, Kent, Großbritannien
Magnetischer Rührfisch	VWR International GmbH, Darmstadt
Wägeschalen blau	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt

Tabelle 13. Verbrauchsmaterialien.

4.5 Geräte und Software

Neben dem LightCycler®480 stand eine Vielzahl an Geräten zur Verfügung. Detailliert sind diese der folgenden Tabelle 14 zu entnehmen.

Gerät	Hersteller
LightCycler®480 Instrument 384	Roche, Mannheim
LightCycler®480 Block Kit 384	Roche, Mannheim
Pipettierroboter Freedom EVO	Tecan, Männedorf, Schweiz
ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop, Wilmington, USA
Allegra™25R Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Microfuge®18 Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Schüttler Vortex	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Sterilbank LaminAir	Holten, Allerød, Dänemark
Pipetten (2,5, 10, 20, 100, 200, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Biohit, Helsinki, Finnland
8-fach Pipette (12,5 µl)	Matrix, Thermo Scientific, New Hampshire, USA

Tabelle 14. Eingesetzte Geräte (Fortsetzung der Tabelle auf der folgenden Seite).

Gerät	Hersteller
PCR-Gerät	MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA
Gelelektrophoresekammer Sub Cell GT	Biorad, München
Elektrophoresegerät Power Pac	Biorad, München
Feinwaage	Adam Equipment, Kingston, Großbritannien
Variomag Elektronikrührer	Monotherm, Neolab, Heidelberg
Videodokumentationssystem Infinity 3000	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Eismaschine	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Abzugskammer	Waldner GmbH & Co. KG, Wangen
Mikrowelle	Sharp Electronics Corporation, Mahwah, USA

Tabelle 14. Eingesetzte Geräte (Fortsetzung).

Zur Auswertung der Daten und bei der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit kamen die in Tabelle 15 aufgelisteten Software-Programme zum Einsatz.

Software	Hersteller
Nano Drop	Nano Drop, Wilmington, USA
LightCycler®480 Basic Software	Roche, Mannheim
LightCycler®480 Genotyping Software	Roche, Mannheim
LightCycler®480 Quantification Software	Roche, Mannheim
LightCycler®480 LIMS/Bar-Code Module	Roche, Mannheim
Freedom EVOware	Tecan, Männedorf, Schweiz
PCR-Programm Dyad und Tetrad	Peltier Thermal Cyclers 2003
Microsoft®Excel 2003	Microsoft Office Corporation, Redmond, USA
Microsoft®Word 2003	Microsoft Office Corporation, Redmond, USA
Endnote®X4 2010	Thomson Reuters, New York, USA Universitätslizenz (LMU München)
Adobe®Photo Shop 11.0	Adobe Systems Software, San Jose, Kalifornien, USA

Tabelle 15. Im Rahmen der Experimente, Auswertungen und Ausarbeitung verwendete Software.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 DNA-Isolierung aus Blutproben

Von Blutproben aller Studienteilnehmer erfolgte die Isolierung genomischer DNA aus peripheren Leukozyten mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Standardprotokoll.

4.6.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration (bis 3700 ng/ μ l) wurde über UV/Vis-Analyse mit einem Spektralphotometer durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte mit einer Dauer von 10s bei einer Wellenlänge von 230 nm. Als Maß für die Reinheit der DNA diente der Quotient der optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm.

4.6.3 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In einem sterilen Reaktionsgefäß wurden für ein Endvolumen von 100 μ l folgende Substanzen vermischt (siehe Tabelle 16):

Volumen	Substanz	Endkonzentration
10,0 μ l	10x PCR-Reaktionspuffer (beinhaltet 15mM MgCl ₂)	→ Endkonzentration 1x
12,0 μ l	25 mM MgCl ₂	→ MgCl ₂ Endkonzentration 4,5 mM
2,0 μ l	dNTP	→ Endkonzentration 0,25 mM
2,5 μ l	5'-Primer 5,0 nmol (forward)	→ Endkonzentration 0,25 mM
2,5 μ l	3'-Primer 5,0 nmol (reverse)	→ Endkonzentration 0,25 mM
0,5 μ l	Taq-DNA Polymerase	
5,0 μ l	DNA	
ad 65,5 μ l	steriles Wasser	

Tabelle 16. Reaktionsgemisch für die qualitative Polymerase-Kettenreaktion.

Zur Optimierung des Ergebnisses wurde bei einem der Polymorphismen die Zusammensetzung aus Tabelle 17 verwendet. Die Q-Lösung beeinflusst dabei das Schmelzverhalten von Nukleinsäuren und kommt bei der Amplifikation besonders GC-reicher Proben zum Einsatz.

Volumen	Substanz	Endkonzentration
10,0 μ l	10x PCR-Reaktionspuffer (beinhaltet 15mM MgCl ₂)	→ Endkonzentration 1x
20,0 μ l	Q-Lösung, 5x	→ Endkonzentration 1x
12,0 μ l	25 mM MgCl ₂	→ MgCl ₂ Endkonzentration 4,5 mM
2,0 μ l	dNTP	→ Endkonzentration 0,25 mM
2,5 μ l	5'-Primer 5,0 nmol (forward)	→ Endkonzentration 0,25 mM
2,5 μ l	3'-Primer 5,0 nmol (reverse)	→ Endkonzentration 0,25 mM
0,5 μ l	Taq-DNA Polymerase	
5,0 μ l	DNA	
ad 45,5 μ l	steriles Wasser	

Tabelle 17. Alternatives Reaktionsgemisch mit 5-Q-Lösung für die qualitative PCR.

Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNA in einem PCR-Gerät mit folgendem, je nach Schmelztemperatur der beteiligten Primer beispielhaftem Programm vermehrt (Tabelle 18):

Vorgang	Temperatur	Dauer
	1. Denaturierung	95°C
Zyklen:	2. Denaturierung	94°C
	3. Primeranlagerung	65°C
35-fache Wiederholung der Schritte 2.-4.	4. Elongation	72°C
	5. Elongation	72°C
	6. Kühlung	8°C
		∞

Tabelle 18. Amplifikationsprotokoll der qualitativen PCR.

4.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um in der Etablierungsphase nach einer Real-Time-PCR (LightCycler® 480) mit neuen Primerpaaren zu überprüfen, ob das synthetisierte DNA-Amplifikat die gewünschte Größe besaß, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Abbildung 12).

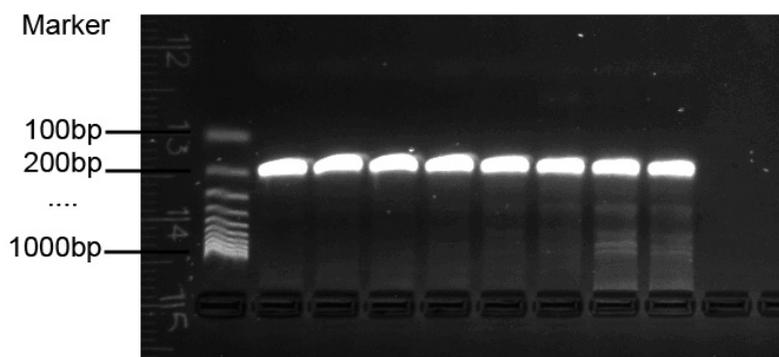


Abbildung 12. Beispielbild zur Gelelektrophorese: Unter UV-Licht sichtbar gemachte DNA-Banden im durch Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel. Gelelektrophorese des *IL12B*-SNP rs3212227 (Primer FR).

Auch eine Kontrolle von PCR-Produkten, welche für die Sequenzierung bestimmt waren, erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurden jeweils 5 µl der Probe mit 3 µl eines 10x Ladepuffers in die Taschen eines 2,5%igen Agarosegels, das mit 10 mg/ml Ethidiumbromid angereichert war, pipettiert und bei konstanter Spannung von 120 V in einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Zur Größenkontrolle wurde ein 100 bp Marker mit auf das Gel aufgetragen. Das PCR-Produkt wurde unter einem UV-Dokumentationssystem sichtbar gemacht und digital fotografiert.

In einem Messzylinder wurden für die Herstellung des Elektrophoresegels mit einem Endvolumen von 250 ml folgende Substanzen vermischt:

Volumen/Masse	Substanz
6,25 g	LE-Agarose
25 ml	TBE-Puffer, 10x
225 ml	H ₂ O (entsalzt)
4 µl	Ethidiumbromid (10mg/ml)
250 ml (Endvolumen)	

Tabelle 19. Rezeptur zur Herstellung eines Elektrophoresegels.

Ein weiterer Messzylinder wurde für die Herstellung des Elektrophoresepuffers mit einem Endvolumen von 2,0 l mit folgenden in Tabelle 20 zusammengefassten Substanzen befüllt:

Volumen	Substanz
200 ml	TBE-Puffer
1800 ml	H ₂ O (entsalzt)
30 µl	Ethidiumbromid
2,0 l (Endvolumen)	

Tabelle 20. Rezeptur zur Herstellung des Elektrophoresepuffers.

Weitere Materialien für die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Material	Hersteller
LE-Agarose	Biozym, Wien, Österreich
TBE-Puffer, 10x, 0,89 mol/l	Apothek e Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Auftragspuffer, 6x	Apothek e Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
DNA-Leiter 100 bp	Lonza, Basel, Schweiz

Tabelle 21. Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese.

4.6.5 Sequenzierung

Zunächst wurden PCR-Produktgröße und -menge durch eine Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Die Fragmente wurden anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Zur Verifizierung des spezifischen PCR-Produktes wurde eine Sequenzierung vorgenommen, welche der DNA-Sequenzierservice der Firma Sequiserve (Vaterstetten) übernahm. Sequiserve verwendete das ABI Prism 3730 Kapillarsequenziergerät und arbeitete mit der klassischen Kettenabbruchmethode nach Sanger.

4.7 Genotypisierung von SNPs mittels Real-Time-PCR

4.7.1 Genotypisierung von *IL12B*- und *PTPN2*-Polymorphismen

Vier *IL12B* Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (rs3212227, rs17860508, rs10045431 und rs6887695) und zwei *PTPN2*-SNPs (rs2542151 und rs7234029) wurden durch Anwendung von PCR, Schmelzkurvenanalyse und der Technik des Fluorescence Resonance Energy Transfer genotypisiert. Die Methodik ist detailliert unter 4.7.3 und 4.7.4 beschrieben.

Die SNPs rs3212227 und rs6887695 wurden aus der Studie von Cargill et al. [143] ausgewählt, wobei rs6887695 auch in der Studie von Parkes et al. [65] untersucht worden war. Der Polymorphismus rs10045431 ist der Arbeit von Barrett et al. [124] entnommen. rs17860508, ein SNP, der in der Promotor-Region von *IL12B* liegt, wurde aufgrund seiner möglichen funktionellen Relevanz für die Genexpression in die Studie eingeschlossen [184].

4.7.2 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-time-PCR)

Der LightCycler®480 ist ein Real-Time-PCR-System, das in Kombination mit der Schmelzkurventechnologie (4.7.3) zum Nachweis von DNA-Variationen (Genotypisierung) im Hochdurchsatz dient. Besonderheit der quantitativen PCR ist die direkte Messung der Produktmengen nach jedem Reaktionszyklus. Dies geschieht mit Hilfe der TaqMan®-Methode. Zu Grunde liegender Mechanismus ist der Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) (siehe 4.7.4).

In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Real-time PCR mit dem LightCycler®480 Genotyping Master Kit von Roche durchgeführt. Die folgende Tabelle 22 zeigt das Temperaturprofil und das angewendete PCR-Programm.

Vorgang	Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit (sec)
Denaturierung	1	95°C	600
Amplifizierung	45	95°C	5
		60°C	10
		72°C	10
Schmelzen	1	95°C	60
		42°C	120
		95°C	Kontinuierlich
Kühlen	1	40°C	15

Tabelle 22. Amplifikationsprogramm im Light-Cycler 480 (Roche).

Für die Genotypisierung wurden Reaktionsansätze verwendet, deren genaue Zusammensetzung in Tabelle 23 für alle *IL12B*-Polymorphismen aufgelistet ist.

SNP 1 + 3 <i>IL12B</i> rs10045431 + rs6887695		SNP 2 + 4 <i>IL12B</i> rs3212227 + rs17860508	
H ₂ O	420 µl	H ₂ O	438 µl
Primer R (SNP1)	60 µl	Primer R (SNP2)	60 µl
Primer S (SNP1)	30 µl	Primer F (SNP2)	30 µl
Sonde FL[C] (SNP1)	60 µl	Sonde FL[C] (SNP2)	60 µl
Sonde 640 (SNP1)	60 µl	Sonde 670 (SNP2)	60 µl
Primer F (SNP3)	60 µl	Primer F (SNP4)	60 µl
Primer A (SNP3)	30 µl	Primer R (SNP4)	12 µl
Sonde FL[C] (SNP3)	60 µl	Sonde sensorGC (SNP4)	60 µl
Sonde 610 (SNP3)	60 µl	Sonde 640 (SNP4)	60 µl
Master-Mix-Polymerase	240 µl	Master-Mix-Polymerase	240 µl
=1080 µl		= 1080 µl	

Tabelle 23. Verwendete Reaktionsansätze für *IL12B*

Tabelle 24 zeigt die entsprechenden Reaktionsansätze zur Genotypisierung der *PTPN2*-SNPs.

SNP 5 <i>PTPN2</i> rs7234029		SNP 6 <i>PTPN2</i> rs 2542151	
H ₂ O	630 µl	H ₂ O	630 µl
Primer F	60 µl	Primer S	60 µl
Primer R	30 µl	Primer A	30 µl
Sonde FL[G]	60 µl	Sonde FL[C]	60 µl
Sonde 640	60 µl	Sonde 670	60 µl
Master-Mix-Polymerase	240 µl	Master-Mix-Polymerase	240 µl
= 1080 µl		= 1080 µl	

Tabelle 24. Verwendete Reaktionsansätze für *PTPN2*

Es erfolgte eine Kontrolle von PCR-Produktgröße und PCR-Quantität durch eine Agarose-Gelelektrophorese. (siehe 4.6.4)

4.7.3 Schmelzkurventechnologie

Die Schmelzkurventechnologie mittels Hybridisierungssonden im LightCycler®480 ermöglicht die Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs). Dieses Verfahren basiert auf dem physikalischen Prozess der Dissoziation von Hybridisierungssonden.

Die Schmelzpunktbestimmung (T_m -Wert) erfolgt durch Schmelzkurvenanalyse. T_m kann experimentell und exakt mathematisch bestimmt werden. Es handelt sich um den Wendepunkt der Schmelzkurve. Am Ende jeder Elongationsphase sowie nach Abschluss der Real-Time PCR wird zunächst durch Erhitzen die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen aufgeschmolzen. Das Schmelzen der DNA kann dabei über fluoreszierende Farbstoffe, mit welchen die Hybridisierungssonden markiert sind, gemessen werden. Eine Schmelzkurve wird im Anschluss an den letzten PCR-Zyklus durch kontinuierliches Messen der Fluoreszenz während der Temperaturerhöhung erzeugt, wobei am Schmelzpunkt T_m 50% der DNA als Einzelstränge vorliegen.

T_m wird durch unterschiedlichste Faktoren beeinflusst. Hauptsächlich ist der GC-Anteil der zu untersuchenden DNA von Bedeutung, da es sich hier um dreifache Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Basen handelt. Je höher dieser ist, desto höher liegt auch der Schmelzpunkt. Ebenfalls Einfluss auf die Schmelztemperatur hat die Länge der Nukleinsäuren. Mit zunehmender Länge bedarf es einer höheren Temperatur, um die Sonden zu lösen. Zusätzlich beeinflussende Faktoren sind die Salzkonzentration und die $MgCl_2$ -Konzentration des Reaktionsgemischs.

4.7.4 HybProbe-Sondenformat und Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Die Mutationsanalyse erfolgte mittels HybProbe Sonden und dem zugrundeliegenden physikalischen Prozess des *Fluorescence Resonance Energy Transfers* nach Förster (FRET) [185]. Dabei wird die Energie eines durch kurzwelliges Licht angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Fluorescein als Donor-Fluorophor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (LightCycler®Red als Akzeptor-Fluorophor) übertragen. Letzterer gibt in der Folge Licht mit einer höheren Wellenlänge ab, welches detektiert werden kann (siehe Abbildung 13). Im Reaktionsgemisch werden zwei Oligonukleotide als Hybridisierungssonden (LightCycler®-Sonden) in Überschuss zugesetzt. Diese sind an den aufeinander zu gerichteten Enden mit Donor- und Akzeptorfluorophoren markiert. Sie lagern sich während eines PCR-Zyklus spezifisch an die DNA an. Die Bindung der Hybridisierungssonden an die DNA und die damit verbundene Annäherung der Sonden ermöglicht einen FRET. Nur für den Fall, dass Sensorsonde (Donorfluorophor) und Ankersonde (Akzeptorfluorophor) im Abstand von nur wenigen Nanometern binden, kann eine Anregung (Energietransfer) erfolgen und die Emission des Fluoreszenzsignals bestimmter Wellenlänge gemessen werden. Das FRET-Signal nimmt dabei in Abhängigkeit

von der DNA-Konzentration zu. Mit zunehmender Zyklenzahl steigen die Menge amplifizierter DNA und direkt proportional dazu auch die Intensität des Fluoreszenzsignals. Eine Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit ist dadurch möglich (quantitative PCR). Dies dient als Kontrolle der Effizienz des PCR-Laufs (Roche). Um genetische Varianten bestimmen zu können, muss DNA in ausreichender Menge vorliegen. Im LightCycler erfolgt daher zuvor eine Amplifikation der DNA.

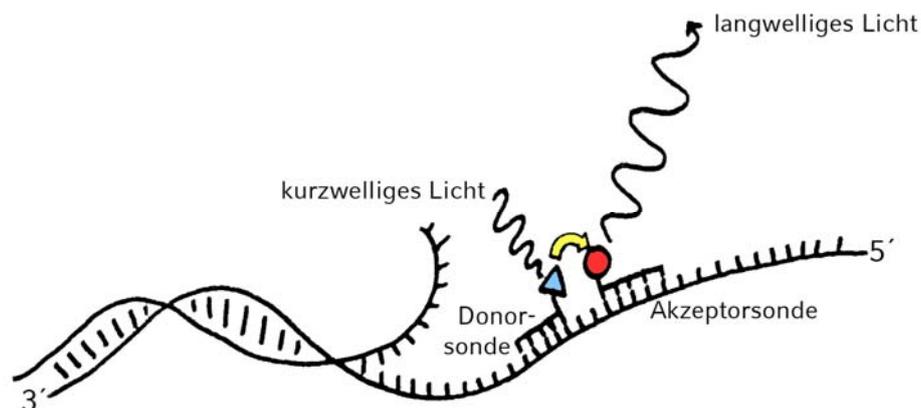


Abbildung 13. Schematische Darstellung des Fluorescence Resonance Energy Transfers (FRET): Ein die Sonde markierendes Fluorophor (blau/Dreieck) wird durch kurzwelliges Licht angeregt. Die Anregungsenergie wird strahlungsfrei, jedoch mit Verlusten von Donor- auf Akzeptorsonde (rot/Kreis) übertragen. Daher wird das detektierbare Fluoreszenzsignal mit längerer Wellenlänge vom Akzeptorfluorophor emittiert. Nur wenn beide Sonden in einem definierten Abstand binden, kommt es zu einem FRET.

Die als Sensor fungierende Sonde überdeckt die variable Sequenz. Dabei sollte die Mutationsstelle etwa in Mitte der Sonde liegen. Die zweite Sonde dient als Ankersonde. Für eine Fluoreszenzmarkierung der Ankersonden stehen verschiedene Wellenlängen – 610 nm, 640 nm und 670 nm– zur Verfügung (LC Red 610, LC Red 640, LC Red 670). Dies ermöglicht bei Bedarf einen sogenannten Multiplex Ansatz, einen gemischten Ansatz mit Primern und Sonden verschiedener SNPs.

Die Genotypisierung der vier Polymorphismen im *IL12B*-Gen erfolgte mittels zweier Duplexansätze. Um zu verhindern, dass sich die unterschiedlichen Signale im Endergebnis gegenseitig beeinflussen, erfolgte eine sogenannte Color Compensation. Dabei wird jeweils das Licht einer Wellenlänge herausgefiltert (Unterdrückung der Detektion durch Farbfilter), um die Beurteilbarkeit ohne Einfluss anderer Fluoreszenzsignale zu gewährleisten.

Jede Sonde besitzt Spezifität für eine der möglichen Basenabfolgen an der Position des Polymorphismus. Daran bindet die Sonde ideal (Perfect Match/vollständige Sequenzhomologie) und löst sich erst bei hohen Temperaturen wieder ab (hochschmelzend). Besteht eine Fehlpaarung (Mismatch), löst sich die Sonde bei niedrigeren Temperaturen (niederschmelzend). Die heterozygote Basenabfolge zeigt sich im Kurvenverlauf mit zwei Maxima. Die charakteristischen Kurvenverläufe mit ihren jeweils spezifischen

Schmelztemperaturen erlauben eine Differenzierung in niederschmelzend homozygot, hochschmelzend homozygot und zweigipfelig heterozygot (vgl. Abbildung 14).

Zur Optimierung der Kurvenverläufe und zur Sicherstellung der genauen Unterscheidung der Genotypen können die Sonden auf verschiedene Weisen modifiziert werden. Der Einbau von zusätzlichen Fehlpaarungen (Mismatch) ist ebenso möglich wie die Veränderung der Sondenspezifität. Als weitere Optimierungsstrategie des Kurvenverlaufs gilt die Asymmetrie der Primer. Durch Konzentrationserniedrigung des Forward- bzw. -erhöhung des Reverse-Primers wird die Synthese des Strangs, an den die Sonden binden, bevorzugt. Erhöht man demnach die Konzentration des Forwardprimers, erhöht sich auch verhältnismäßig der erste Schmelzgipfel der heterozygoten Kurve.

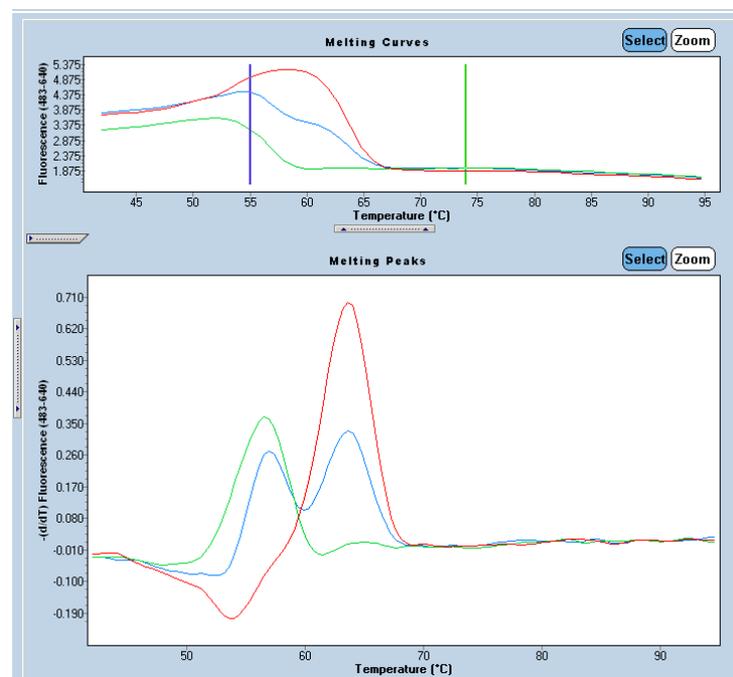


Abbildung 14. Beispiel aus den originalen Versuchsdaten: Light-Cycler-Schmelzkurven (oben) und zugehörige Ableitungen (unten) für den *IL12B*-SNP rs17860508 für die Kontrollprobanden (Rotkreuz-Kontrollen 2, 3 und 4).

4.7.5 Genotypisierung von *STAT4*- und *IL23R*-Polymorphismen

Zur Analyse der Gen-Gen-Interaktion wurden sieben *STAT4*-SNPs (rs11889341, rs7574865, rs7568275, rs8179673, rs10181656, rs7582694, rs10174238) und 10 *IL23R*-Polymorphismen (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026 = p.Arg381Gln, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965) mit Hilfe von PCR, Schmelzkurvenanalyse und FRET-Technologie in einem Light-Cycler®480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wie unter 4.7.3 und 4.7.4 beschrieben, genotypisiert. Die Ergebnisse dieser Genotypisierung standen aus früheren Studien zur Verfügung [186,187].

4.7.6 Genotypisierung von *NOD2*- und *ATG16L1*-Polymorphismen

Ergebnisse der Genotypisierung der wichtigsten drei mit M. Crohn assoziierten *NOD2* Polymorphismen p.Arg702Trp (rs2066844), p.Gly908Arg (rs2066845), und p.Leu1007fsX1008 (rs2066847) standen aus früheren Studien zur Verfügung. Ebenso lagen die Daten der Genotypisierung von neun *ATG16L1*-SNPs (rs13412102, rs12471449, rs6431660, rs1441090, rs2289472, rs2241880 [=T300A], rs2241879, rs3792106, rs4663396) aus vorangegangenen Arbeiten bereits vor [188].

4.8 *In silico*-Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Die *in silico*-Analyse bezeichnet ein rein theoretisches Verfahren, bei dem computerbasiert Vorhersagen zu bestimmten Wahrscheinlichkeiten getroffen werden können. Im vorliegenden Fall erfolgte eine *in silico*-Analyse zur Vorhersage möglicher, durch die *PTPN2* SNPs rs2542151 und rs7234029 hervorgerufenen, Veränderungen an potenziellen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren (TFBS, englisch *transcription factor binding sites*). Hierfür kam das im Internet verfügbare Programm TFSEARCH [262] zum Einsatz. Dieses Programm basiert auf der TRANSFAC Datenbank, die durch die GBF Braunschweig (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH) entwickelt wurde [189]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Schwellenwert für Bindungsstellen von 75 verwendet (Score = $100 \times (\text{gewichtete Summe} - \text{Min}) / (\text{Max} - \text{Min})$; max.score=100). Für beide *PTPN2*-Polymorphismen wurden Major- und Minor-Allel, inklusive der flankierenden 10 bp langen Sequenzen oberhalb und unterhalb, auf potenzielle Veränderungen der Bindungsstellen humaner Transkriptionsfaktoren untersucht. Für die vier *IL12B*-SNPs rs3212227, rs17860508, rs10045431 und rs6887695 kam ein identisches Verfahren zum Einsatz. Hier wurden Major- und Minor-Allele inklusive 15 bp langen Sequenzen *upstream* und *downstream* analysiert. Die Daten der vorliegenden *in silico*-Analyse wurden von Julia Diegelmann zur Verfügung gestellt.

4.9 Statistische Auswertung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine genetische Assoziationsstudie, welche den möglichen Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen und klinischen Krankheitsbildern untersucht. Der Vergleich eines Patientenkollektivs mit einer gesunden Kontrollpopulation bezüglich der Allel-, Genotyp- und Haplotypfrequenzen sollte dabei Aufschluss über signifikante Unterschiede geben. Den statistischen Auswertungen zu Grunde liegend wurde in der vorliegenden Studie als Nullhypothese ausnahmslos der Fall "kein Unterschied zwischen den zu vergleichenden Gruppen" angenommen. Alle Tests wurden zu einem (globalen) zweiseitigen Signifikanzniveau von 5% durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde somit als signifikant gewertet.

Die Datenanalyse erfolgte mittels der Software-Programme SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) und R-2.13.1. [259].

Alle genetischen Marker wurden jeweils in der Kontrollgruppe auf Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet und ggf. von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zum Vergleich kategorialer Variablen wurde der exakte Test nach Fisher herangezogen.

Die Trennschärfe bzw. *Power* der Tests wurde durch den *Genetic Power Calculator* ermittelt [190]. Post-hoc wurde eine Poweranalyse durchgeführt [260]. Odds Ratios wurden für das Minor-Allel eines jeden SNPs berechnet. Zur Abschätzung von relativen Risiken wurden Odds Ratios (OR) unter Angabe des jeweiligen 95%-Konfidenzintervalls berechnet. Multiple Testkorrektur wurde mittels der Bonferroni-Methode durchgeführt, d.h., das Signifikanz-Niveau wurde für die Anzahl der durchgeführten statistischen Tests wie folgt korrigiert: $p=0,05/n$, wobei n der Zahl der getesteten Hypothesen entspricht. Die Zahl der durchgeführten Tests (n) und der Schwellenwert für statistisch signifikante p-Werte sind unter jeder Tabelle, in der die Bonferroni-Korrektur angewendet wurde, angegeben.

Genotyp-Phänotyp-Assoziationen wurden mittels logistischer Regression im Programm „R“ (R-2.13.1.) beurteilt [259]. Die Haplotypen-Analyse erfolgte mittels der -hap-logic-Option auf PLINK [191] [261] bzw. mittels der *sliding-window*-Methode. Die beiden signifikanten SNPs (*PTPN2* rs2542151 und *PTPN2* rs7234029) der univariaten Assoziationsstudie wurden in ein logistisches Regressionsmodell zum Test Haplotyp-spezifischer Assoziationen aufgenommen. Eine Gen-Gen-Interaktion der verschiedenen SNPs wurde durch die Epistasis-Option ebenfalls auf PLINK untersucht. Diese Analyse basiert ebenfalls auf logistischer Regression.

5 Ergebnisse

5.1 Suszeptibilitäts-Analyse von *IL12B*- und *PTPN2*-Polymorphismen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Genotypisierung erfolgte mit dem Ziel festzustellen, ob in den Patientengruppen im Vergleich mit den gesunden Kontrollprobanden der jeweilige Polymorphismus unterschiedlich häufig auftritt. Lassen sich signifikante Differenzen in der Allelfrequenz erkennen, gilt dies als Beweis dafür, dass es sich bei dem jeweiligen Gen um ein Suszeptibilitäts-gen in der untersuchten Population handelt. Mit Minor-Allelfrequenz (=MAF von engl. *minor allele frequency*) wird im Folgenden die Häufigkeit des selteneren Allels bezeichnet.

5.1.1 *IL12B*-Polymorphismen und ihre Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Allelfrequenzen der *IL12B*-Polymorphismen (rs3212227, rs17860508, rs10045431, rs6887695) entsprachen in allen drei untersuchten Kollektiven (M. Crohn, C. ulcerosa und Kontrollen) dem vorhergesagten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Für *IL12B*-SNP rs6887695 ließ sich eine Tendenz zur Assoziation mit M. Crohn mit einer Frequenz des Minor C-Allels von 32,9 % ($p=0,066$, OR=1,41 [0,99-1,31]) und mit C. ulcerosa bei einer Minor-C-Allelfrequenz von 33,6 % ($p=0,092$, OR=1,18 [0,97-1,43]) im Vergleich zu 30,0 % in der Kontrollgruppe beobachten (siehe Tabelle 25).

SNP	Minor-Allel	M. Crohn n=913			C. ulcerosa n=318			Kontrollen n=965
		MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF
rs3212227	G	0,209	0,684	0,97 [0,82-1,13]	0,214	0,777	1,03 [0,83-1,29]	0,209
rs17860508	TTAGAG	0,485	0,974	1,00 [0,88-1,14]	0,489	0,854	1,02 [0,85-1,22]	0,484
rs10045431	A	0,271	0,258	0,92 [0,80-1,06]	0,252	0,083	0,83 [0,68-1,02]	0,288
rs6887695	C	0,329	0,066	1,41 [0,99-1,31]	0,336	0,092	1,18 [0,97-1,43]	0,300

Tabelle 25. Assoziationen von *IL12B*-Polymorphismen mit M. Crohn und C. ulcerosa in der durchgeführten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie. Minor-Allelfrequenzen (MAF), p-Werte der allelischen Testung und Odds Ratio (OR, dargestellt für das Minor-Allel) mit 95% Konfidenzintervall (CI) sind jeweils für den Vergleich von M. Crohn- und C. ulcerosa-Fällen mit der Kontrollkohorte angegeben. Das Minor-Allel entspricht dabei dem selteneren Allel. Tendenzen zur Assoziation ($p<0,10$) sind kursiv gedruckt.

Auch rs10045431 zeigte eine Tendenz zur Assoziation mit *C. ulcerosa* bei einer Häufigkeit des Minor A-Allels von 25,2 % in der *C. ulcerosa*-Patientengruppe ($p=0,083$, $OR=0,83$ [0,68-1,02]) verglichen mit 28,8 % in der Kontrollgruppe.

Für *IL12B*-SNP rs6887695 konnte eine signifikante Assoziation mit der Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen gezeigt werden. Wie in Tabelle 26 aufgeführt, war die Häufigkeit des Minor C-Allels des *IL12B*-SNP rs6887695 bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen 33,0 % ($p=0,035$; $OR=1,15$ [1,01-1,31]) im Vergleich zu 30,0 % in der Kontrollgruppe.

SNP	Minor Allel	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen n=1231			Kontrollen n=965
		MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF
rs3212227	G	0,206	0,820	0,98 [0,85-1,14]	0,209
rs17860508	TTAGAG	0,486	0,903	1,01 [0,89-1,14]	0,484
rs10045431	A	0,266	0,109	0,90 [0,78-1,02]	0,288
rs6887695	C	0,330	0,035	1,15 [1,01-1,31]	0,300

Tabelle 26. Assoziation von *IL12B*-Polymorphismen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Kategorie CED repräsentiert die aus M. Crohn und *C. ulcerosa* (Tabelle 25) zusammengefasste Kohorte. Signifikante Assoziationen sind fett gedruckt.

5.1.2 *PTPN2*-Polymorphismen und ihre Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Auch die Verteilung der Allelfrequenzen der *PTPN2*-Polymorphismen (rs2542151 und rs7234029) entsprach in allen drei Untergruppen (M. Crohn, *C. ulcerosa* und Kontrollen) dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es zeigten sich signifikante Assoziationen des *PTPN2*-SNPs rs2542151 sowohl mit M. Crohn als auch mit *C. ulcerosa* (siehe Tabelle 27). Die Häufigkeit des Minor G-Allels betrug dabei 18,2 % bei M. Crohn-Patienten ($p=1,95 \times 10^{-5}$; $OR=1,49$ [1,34-1,79]) und 16,4 % bei *C. ulcerosa*-Patienten ($p=3,87 \times 10^{-2}$, $OR=1,31$ [1,02-1,68]) im Vergleich zu 13,0 % in der Kontrollgruppe. Für den *PTPN2*-SNP rs7234029 ergab sich ebenfalls eine signifikante Assoziation mit M. Crohn mit einer Minor-G-Allelfrequenz von 17,7 % in der M. Crohn-Patientengruppe ($p=1,30 \times 10^{-3}$; $OR=1,35$ [1,13-1,62]) im Vergleich zu 13,7 % in der Kontrollgruppe. Zudem war die Tendenz zur Assoziation mit *C. ulcerosa* erkennbar bei einer Frequenz des Minor G- Allels von 16,7 % in der *C. ulcerosa*-

Patientengruppe ($p=7,53 \times 10^{-2}$, OR=1,26 [0,98-1,62]) verglichen mit 13,7 % bei den Kontrollen.

Dies spricht dafür, dass *PTPN2* in der deutschen Bevölkerung ein Suszeptibilitäts-gen sowohl für M. Crohn als auch für C. ulcerosa ist.

SNP	Minor Allel	M. Crohn <i>n</i> =905			C. ulcerosa <i>n</i> =318			Kontrollen <i>n</i> =908
		MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF
rs2542151	G	0,182	$1,95 \times 10^{-5}$	1,49 [1,34-1,79]	0,164	$3,87 \times 10^{-2}$	1,31 [1,02-1,68]	0,130
rs7234029	G	0,177	$1,30 \times 10^{-3}$	1,35 [1,13-1,62]	0,167	$7,53 \times 10^{-2}$	1,26 [0,98-1,62]	0,137

Tabelle 27. Assoziation von *PTPN2*-Polymorphismen mit M. Crohn und C. ulcerosa in der durchgeführten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie. Minor-Allelfrequenzen (MAF), p-Werte der allelischen Testung und Odds Ratio (OR, dargestellt für das Minor Allel) mit 95% Konfidenzintervall (CI) sind jeweils für M. Crohn und C. ulcerosa-Fälle im Vergleich mit den Kontrollen angegeben. Signifikante Assoziationen sind fett gedruckt.

5.2 Genotyp-Phänotyp-Analyse

Wesentliche Krankheitscharakteristika der Patienten, aufgeteilt nach den jeweils drei Genotypen (homozygot (Wildtyp), heterozygot, homozygot), werden in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben. Grundlegende Frage ist, ob die Merkmale bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens zwischen den verschiedenen Patientengruppen signifikante Unterschiede erkennen lassen, welche auf eine Assoziation des jeweiligen Polymorphismus mit dem zugehörigen Phänotyp hinweisen.

5.2.1 *IL12B*-Polymorphismen: Genotyp-Phänotyp-Analyse

Die Mehrheit veröffentlichter Metaanalysen genomweiter Assoziationsstudien, welche eine Assoziation mit *IL12B* zeigten, wurde an M. Crohn-Patienten mit vorwiegend ilealem Befall durchgeführt [113,124]. Um auszuschließen, dass nur ein spezieller Subphänotyp chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wie z.B. ilealer M. Crohn, mit *IL12B* assoziiert ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Assoziation von *IL12B*-Polymorphismen mit der anatomischen CED-Lokalisation untersucht. Die Genotyp-Phänotyp-Analyse zeigte eine schwache Assoziation von rs3212227 mit einem Kolonbefall bei M. Crohn ($p=0.04$), nicht jedoch mit ilealer Beteiligung. Folgende Tabelle 28 zeigt im Überblick Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analyse zur möglichen Assoziation der *IL12B*-Polymorphismen mit bestimmten Befallsmustern bei M. Crohn.

Anatomische Lokalisierung	rs3212227	rs17860508	rs10045431	rs6887695
L1 (ileal) (n=113)	0.688	0.898	0.814	0.414
L2 (colonic) (n=98)	0.040	0.585	0.338	0.207
L3 (ileocolonic) (n=556)	0.350	0.573	0.559	0.986
jegliche ileale Beteiligung (L1+L3) (n=669)	0.976	0.672	0.560	0.529

Tabelle 28. Assoziation von *IL12B*-Genmarkern mit der anatomischen Lokalisierung von M. Crohn eingeteilt nach Kriterien der Montreal Klassifikation [29]. Signifikante Werte (<0,05) sind fett gedruckt dargestellt.

In Tabelle 29 finden sich die Daten der Genotyp-Phänotyp-Analyse von *IL12B*-SNPs bzgl. des Befallsmusters der *C. ulcerosa*.

Anatomische Lokalisierung	rs3212227	rs17860508	rs10045431	rs6887695
ulzerierende Proktitis (E1) (n=24)	0.631	0.432	0.957	0.707
linksseitige <i>C. ulcerosa</i> (distale CU; E2) (n=96)	0.219	0.403	0.413	0.138
extensive <i>C. ulcerosa</i> (Pancolitis; E3) (n=140)	0.434	0.276	0.514	0.160

Tabelle 29. Assoziation von *IL12B*-Polymorphismen mit der anatomischen Lokalisierung von *C. ulcerosa* eingeteilt nach Kriterien der Montreal Klassifikation [29].

Für den *IL12B*-SNP rs6887695 konnte die Tendenz einer Assoziation mit M. Crohn und *C. ulcerosa* gezeigt werden (siehe oben). Aufgrund der Vermutung, dass sich daraus phänotypische Konsequenzen für beide Krankheitsbilder ergeben könnten, erfolgte für den SNP eine detailliertere Genotyp-Phänotyp-Analyse. M. Crohn-Patienten, die homozygote Träger des Minor C-Allels dieses Polymorphismus waren, wiesen signifikant häufiger einen nicht-stenosierenden, nicht-penetrierenden Krankheitsphänotypen auf als Träger des G-Allels (=kombinierte Gruppe aus heterozygoten C/G- und Wildtyp G/G-Trägern; $p=6,8 \times 10^{-5}$ (Tabelle 30)). Dieser Zusammenhang blieb auch nach der Bonferroni-Korrektur für multiple Testung signifikant. Homozygote C/C-Träger des *IL12B*-Polymorphismus rs6887695 litten auch seltener unter Stenosen als Träger des G-Allels ($p=0,038$) und es gab tendenziell seltener Patienten mit penetrierendem Phänotyp ($p=0,062$), weniger Fisteln ($p=0,085$) und seltener Operationen ($p=0,063$; (Tabelle 30)). Für *C. ulcerosa* zeigte sich unter den homozygoten C/C-Trägern des *IL12B*-SNPs rs6887695 signifikant häufiger eine linksseitige *C. ulcerosa* ($p=0,006$) und seltener ein ausgedehnter Befall ($p=0,029$) als in der kombinierten Gruppe aus heterozygoten C/G- und G/G-Trägern (Tabelle 31).

Die Ergebnisse der Analyse zur Assoziation des *IL12B*-Polymorphismus rs6887695 mit phänotypischen Ausprägung des M. Crohn sind in Tabelle 30 aufgeführt.

<i>IL12B</i> -SNP rs6887695	(1) CC	(2) CG	(3) GG	P _{CC}	OR _{CC} [95% CI]
	<i>n</i> =100	<i>n</i> =394	<i>n</i> =409		
Lokalisierung (<i>n</i> = 768)	<i>n</i> =80	<i>n</i> =331	<i>n</i> =357		
Terminales Ileum (L1)	11 (13,8 %)	55 (16,6 %)	46 (12,9 %)	1,000	0,92 [0,45-1,88]
Kolon (L2)	6 (7,5 %)	43 (13,0 %)	49 (13,7 %)	0,158	0,53 [0,20-1,30]
Ileum und Kolon (L3)	60 (75,0 %)	230 (69,5 %)	258 (72,3 %)	0,514	1,23 [0,70-2,17]
Oberer GI-Trakt (L4)	3 (3,8 %)	3 (0,9 %)	4 (1,1 %)	<i>0,076</i>	3,79 [0,76-16,69]
Verhalten ¹ (<i>n</i> =690)	<i>n</i> =72	<i>n</i> =293	<i>n</i> =325		
nicht-stenosierend &					
nicht-penetrierend (B1)	31 (43,1 %)	65 (22,2 %)	75 (23,1 %)	6,8x10⁻⁵*	2,84 [1,66-4,84]
stenosierend (B2)	14 (19,4 %)	87 (29,7 %)	85 (26,2 %)	0,160	0,63 [0,32-1,19]
penetrierend (B3)	27 (37,5 %)	141 (48,1 %)	165 (50,8 %)	<i>0,062</i>	0,61 [0,36-1,04]
(B2+B3)				9,5x10⁻⁵*	0,36 [0,21-0,62]
Einnahme von					
Immunsuppressiva ² (<i>n</i> =477/583)	50 (79,7 %)	202 (82,1 %)	225 (82,1 %)	0,604	0,84 [0,42-1,69]
Operation aufgrund von					
M. Crohn ³ (<i>n</i> =423/808)	35 (42,2 %)	188 (52,9 %)	200 (54,2 %)	<i>0,063</i>	0,63 [0,39-1,027]
Fisteln (<i>n</i> =398/825)	33 (39,3 %)	172 (47,8 %)	193 (50,7 %)	<i>0,085</i>	0,67 [0,41-1,08]
Stenosen (<i>n</i> =488/827)	42 (48,3 %)	221 (61,1 %)	225 (59,5 %)	0,038	0,62 [0,39-0,98]

Tabelle 30. Genotyp-Phänotyp-Analyse von SNP rs6887695 für Patienten mit M. Crohn. P_{CC}: p-Werte für die Tests auf Unterschiede zwischen den homozygoten Trägern des C-Allels (C/C) und Heterozygoten sowie Nicht-Trägern des C-Allels. OR_{CC}: korrespondierende Odds Ratios mit 95% Konfidenzintervallen (95% CI). Signifikante p-Werte (<0,05) sind fett gedruckt, p-Werte, die eine Tendenz zur Signifikanz zeigen, sind *kursiv* gedruckt. p-Werte, die mit einem Sternchen* gekennzeichnet sind, blieben auch nach der Bonferroni-Korrektur signifikant.

1 Das Krankheitsverhalten wurde nach der Montreal-Klassifikation definiert. Ein stenosierender Krankheitsphänotyp wurde definiert als Vorhandensein von Stenosen ohne penetrierendes Erkrankungsbild. Die Diagnose von Stenosen erfolgte chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch (mit Hilfe von MRI-Enteroklysmen).

2 Als Immunsuppressiva wurden Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat, Infliximab und/oder Adalimumab eingesetzt

3 Nur Operationen aufgrund von Problemen, die im Rahmen der Erkrankung mit M. Crohn auftraten (z.B. Fistelresektion, Kolektomie, Ileostomaanlage) wurden in die Bewertung eingeschlossen

Tabelle 31 zeigt die Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analyse zu rs6887695 und *C. ulcerosa*.

<i>IL12B</i> SNP rs6887695	(1) CC	(2) CG	(3) GG	P _{CC}	OR _{CC} [95% CI]
	n=34	n=145	n=138		
Lokalisierung					
(n=193)	n=25	n=94	n=74		
Proktitis (E1)	3 (12,0 %)	10 (10,6 %)	11 (14,9 %)	1,000	0,96 [0,21-3,78]
linksseitige CU (E2)	9 (36,0 %)	10 (10,6 %)	11 (14,9 %)	0,006*	3,94 [1,40-11,02]
(E1+E2)				0,030	[1,07-7,03]
extensive CU (E3)	13 (52,0 %)	74 (78,7 %)	52 (70,3 %)	0,029	0,36 [0,14-0,92]
Extra-intestinale					
Manifestationen (n=53/149)	3 (27,3 %)	26 (35,1 %)	24 (37,5 %)	0,747	0,66 [0,13-2,91]
Einnahme von					
Immunsuppressiva (n=201/267)	22 (78,6 %)	97 (77,6 %)	82 (71,9 %)	0,818	1,23 [0,45-3,57]
Abszesse (n=12/240)	2 (7,7 %)	6 (5,4 %)	4 (3,9 %)	0,365	1,77 [0,25-9,41]

Tabelle 31. Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analyse des *IL12B*-SNP rs6887695 bei Patienten mit *C. ulcerosa*. Für diese Patienten standen Daten zu phänotypischen Ausprägungen, basierend auf Kriterien der Montreal-Klassifikation, zur Verfügung. Zu jeder Variablen ist die Zahl der in die Berechnungen eingeschlossenen Patienten angegeben. P_{CC}: p-Wert angegeben für den Test auf Unterschiede zwischen homozygoten Trägern des C-Allels und Heterozygoten bzw. Nicht-Trägern des C-Allels. OR_{CC}: korrespondierende Odds Ratios mit 95% Konfidenzintervallen (95%CI). Signifikante p-Werte (<0,05) sind fett gedruckt.

5.2.2 *PTPN2*-Polymorphismen: Genotyp-Phänotyp-Analyse

Die Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analyse zu *PTPN2* sind in Tabelle 32, Tabelle 33, Tabelle 34 und Tabelle 35 dargestellt. Es ergab sich für den *PTPN2*-Polymorphismus rs2542151 eine Assoziation mit einem sehr frühen Erkrankungsbeginn von M. Crohn noch vor dem 16. Lebensjahr (A1) ($p=4.53 \times 10^{-2}$, OR=0.67 [0.45-0.99]) und mit einem sehr späten Erkrankungsbeginn (A3) ($p=1.89 \times 10^{-2}$, OR=0.53 [0.31-0.90]). Der SNP rs7234029 ist sowohl mit einem Auftreten von M. Crohn in jungen Jahren (A1) ($p=4.25 \times 10^{-2}$, OR=0.67 [0.46-0.99]) als auch mit einem strikturbildenden Phänotyp (B2) ($p=6.62 \times 10^{-3}$, OR=1.61 [1.14-2.27]) assoziiert. Des Weiteren zeigt sich eine signifikante Assoziation von rs7234029 mit einem späten Erkrankungsbeginn der *C. ulcerosa* (für A2: $p=3.47 \times 10^{-2}$, OR=2.24 [1.06-4.73], für A3: $p=2.51 \times 10^{-2}$, OR=2.70 [1.13-6.45]) und mit einem Risiko für Abszessbildung, ebenfalls bei *C. ulcerosa* ($p=3.94 \times 10^{-2}$, OR=3.47 [1.06-11.32]). Nach einer Bonferroni-Korrektur verloren jedoch alle genannten Assoziationen ihre Signifikanz.

PTPN2-SNP rs2542151	TT (n=611)	TG (n=258)	GG (n=36)	P_G	OR_G [95% CI]
Alter bei Diagnosestellung (in Jahren) (n=817)					
Mittelwert ± SD	25,32 ± 11,91	28,06 ± 13,48	25,19 ± 9,61	5,96 x10 ⁻²	0,75
Wertebereich (Range)	1 - 71	2 - 78	15 - 49		[0,56-1,01]
Alter bei Diagnosestellung (n=817)					
<=16 Jahre (A1) (n=168)	126 (22,7 %)	38 (16,1 %)	4 (14,8 %)	4,53 x10⁻²	0,67 [0,45-0,99] (A1 vs. A2)
17-40 Jahre (A2) (n=551)	368 (66,4 %)	161 (68,2 %)	22 (81,5 %)	0,285	0,79 [0,50-1,22] (A2 vs. A3)
> 40 Jahre (A3) (n=98)	60 (10,8 %)	37 (15,7 %)	1 (3,7 %)	1,89 x10⁻²	0,53 [0,31-0,90] (A1 vs. A3)
Lokalisierung (n=770)					
Terminales Ileum (L1) (n=113)	73 (14,3 %)	33 (14,4 %)	7 (21,9 %)	0,715	1,08 [0,71-1,64]
Kolon (L2) (n=97)	62 (12,2 %)	31 (13,5 %)	4 (12,5 %)	0,627	1,17 [0,72-1,74]
Ileum und Kolon (L3) (n=550)	366 (71,9 %)	163 (71,2 %)	21 (65,6 %)	0,682	0,93 [0,67-1,30]
oberer GI-Trakt (L4) (n=10)	8 (1,6 %)	2 (0,9 %)	0 (0 %)	0,360	0,48 [0,10-2,29]
Verhalten (n=747)					
nicht-stenosierend & nicht-penetrierend (B1) (n=172)	111 (24,3 %)	49 (23,6 %)	12 (42,9 %)	0,645	1,08 [0,76-1,55]
stenosierend (B2) (n=187)	123 (27,0 %)	57 (27,4 %)	7 (25,0 %)	0,941	1,01 [0,71-1,44]
Penetrierend (B3) (n=333)	222 (48,7 %)	102 (49,0 %)	9 (32,1 %)	0,729	0,95 [0,70-1,29]
Einnahme von Immunsuppressiva	nein: 65 (16,6 %)	35 (20,3 %)	5 (22,7 %)	0,237	0,77 [0,50-1,19]
(n=585)	ja: 326 (83,4 %)	137 (79,7 %)	17 (77,3 %)		
Operation aufgrund von M. Crohn	nein: 265 (48,7 %)	106 (44,7 %)	19 (59,4 %)	0,547	1,09 [0,82-1,47]
(n=813)	ja: 279 (51,3 %)	131 (55,3 %)	13 (40,6 %)		
Fisteln	nein: 290 (52,3 %)	121 (50,2 %)	18 (56,3 %)	0,699	1,06 [0,79-1,42]
(n=827)	ja: 264 (47,7 %)	120 (49,8 %)	14 (43,8 %)		
Stenosen	nein: 234 (42,0 %)	90 (37,5 %)	16 (50,0 %)	0,404	1,13 [0,84-1,53]
(n=829)	ja: 323 (58,0 %)	150 (62,5 %)	16 (50,0 %)		

Tabelle 32. Genotyp-Phänotyp-Analyse zu *PTPN2*-SNP rs2542151 bei Patienten mit M. Crohn. P_G, OR_G: p-Werte für eine Assoziation beim Vergleich von Trägern des G-Allels mit Individuen, die homozygote Träger von T sind. Ergebnisse zu einer Assoziation mit dem Alter bei Diagnosestellung sind am Median dichotomisiert. Unkorrigierte p-Werte <0,05 sind fett gedruckt. Keiner der p-Werte blieb nach der Bonferroni-Korrektur für multiple Testung signifikant. (Zahl der getesteten Hypothesen: n=15, Grenzwert für Signifikanz p<3,33x10⁻³).

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammenfassung der Daten zur Genotyp-Phänotyp-Analyse von *PTPN2*-SNP rs7234029 bei M. Crohn.

<i>PTPN2</i>-SNP rs7234029	AA (n=612)	AG (n=253)	GG (n=32)	P_G	OR_G [95% CI]
Alter bei Diagnosestellung (in Jahren) (n=811)					
Mittelwert ± SD	25,80 ± 12,36	26,77 ± 12,40	25,73 ± 12,52	0,197	0,82
Wertebereich (Range)	1-71	6-78	12-64		[0,61-1,11]
Alter bei Diagnosestellung (n=811)					
<=16 Jahre (A1) (n=168)	124 (22,5 %)	36 (15,3 %)	8 (30,8 %)	4,25x10⁻²	0,67 [0,46-0,99] (A1 vs. A2)
17-40 Jahre (A2) (n=546)	357 (64,9 %)	173 (73,6 %)	16 (61,5 %)	0,271	1,30 [0,81-2,09] (A2 vs. A3)
> 40 Jahre (A3) (n=97)	69 (12,5 %)	26 (11,1 %)	2 (7,7 %)	0,637	0,87 [0,50-1,53] (A1 vs. A3)
Lokalisierung (n=764)					
Terminales Ileum (L1) (n=113)	76 (14,8 %)	29 (12,6 %)	8 (38,1 %)	0,978	0,99 [0,65-1,52]
Kolon (L2) (n=96)	64 (12,5 %)	30 (13,0 %)	2 (9,5 %)	0,915	1,03 [0,65-1,61]
Ileum und Kolon (L3) (n=545)	364 (71,0 %)	170 (73,9 %)	11 (52,4 %)	0,740	1,06 [0,76-1,48]
Oberer GI (L4) (n=10)	9 (1,8 %)	1 (0,4 %)	0 (0 %)	0,157	0,22 [0,03-1,78]
Verhalten (n=686)					
nicht-stenosierend, nicht-penetrierend (B1) (n=170)	116 (25,4 %)	49 (23,0 %)	8 (42,1 %)	0,682	0,93 [0,64-1,34]
stenosierend (B2) (n=187)	110 (24,1 %)	72 (33,8 %)	5 (26,3 %)	6,62x10⁻³	1,61 [1,14-2,27]
penetrierend (B3) (n=329)	231 (50,5 %)	92 (43,2 %)	6 (31,6 %)	9,06x10 ⁻²	0,76 [0,56-1,04]
Einnahme von Immunsuppressiva (n=580)					
nein: 67 (17,2 %)	33 (18,8 %)	5 (33,3 %)	0,433	0,84 [0,54-1,30]	
ja: 322 (82,8 %)	143 (81,3 %)	10 (66,7 %)			
Operation aufgrund von M. Crohn (n=807)					
nein: 260 (47,6 %)	111 (47,2 %)	16 (61,5 %)	0,782	0,96 [0,71-1,29]	
ja: 286 (52,4 %)	124 (52,8 %)	10 (38,5 %)			
Fisteln (n=821)					
nein: 281 (50,4 %)	128 (54,2 %)	18 (66,7 %)	0,168	0,81 [0,61-1,09]	
ja: 277 (49,6 %)	108 (45,8 %)	9 (33,3 %)			
Stenosen (n=823)					
nein: 239 (42,8 %)	82 (34,3 %)	16 (61,5 %)	0,111	1,28 [0,95-1,72]	
ja: 319 (57,2 %)	157 (65,7 %)	10 (38,5 %)			

Tabelle 33. Genotyp-Phänotyp-Analyse des *PTPN2*-SNPs rs7234029 in der Kohorte der M. Crohn-Patienten. P_G, OR_G: p-Wert für eine Assoziation der Träger des G-Allels im Vergleich mit homozygoten Trägern von A. Assoziationswerte für das Alter bei Diagnosestellung wurde am Median dichotomisiert. Unkorrigierte p-Werte < 0,05 sind fett gedruckt dargestellt. Keiner der P-Werte blieb jedoch nach einer Korrektur nach Bonferroni für multiple Testung signifikant (Zahl der getesteten Hypothesen: n=15, resultierender Grenzwert für eine Signifikanz p < 3,33x10⁻³).

In Tabelle 34 sind die Daten zur Assoziation von rs2542151 mit ausgewählten phänotypischen Merkmalen der *C. ulcerosa* aufgeführt.

PTPN2-SNP rs2542151	TT (n=226)	TG (n=80)	GG (n=12)	P_G	OR_G[95% CI]
Geschlecht (n=318)					
männlich	125 (55,3 %)	36 (45,0 %)	5 (41,7 %)	8,03x10 ⁻²	1,54 [0,95-2,51]
weiblich	101 (44,7 %)	44 (55,0 %)	7 (58,3 %)		
Alter bei Diagnosestellung (in Jahren) (n=302)					
Mittelwert ± SD	29,45 ± 14,60	27,95 ± 14,13	25,08 ± 15,54	0,253	1,34 [0,81-2,21]
Wertebereich (Range)	2-81	4-73	9-68		
Alter bei Diagnosestellung (n=302)					
<=16 Jahre (A1) (n=59)	41 (19,1 %)	16 (21,3 %)	2 (16,7 %)	0,926	0,97 [0,51-1,83] (A1 vs. A2)
17-40 Jahre (A2) (n=183)	126 (58,6 %)	49 (65,3 %)	8 (66,7 %)	9,95x10 ⁻²	1,81 [0,89-3,67] (A2 vs. A3)
> 40 Jahre (A3) (n=60)	48 (22,3 %)	10 (13,3 %)	2 (16,7 %)	0,189	1,76 [0,76-4,07] (A1 vs. A3)
BMI (kg/m²) (n=209)					
Mittelwert ± SD	23,92 ± 4,74	23,87 ± 3,83	23,67 ± 4,71	0,995	1,00 [0,55-1,82]
Wertebereich (Range)	15-54	16-36	15-30		
Lokalisierung (n=200)					
Proktitis (E1) (n=24)	15 (12,0 %)	7 (10,6 %)	2 (22,2 %)	0,329	1,55 [0,64-3,70]
Linksseitige UC (E2) (n=96)	73 (58,4 %)	20 (30,3 %)	3 (33,3 %)	0,184	0,68 [0,38-1,20]
Extensive UC (E3) (n=80)	37 (29,6 %)	39 (59,1 %)	4 (44,4 %)	0,473	1,22 [0,83-1,80]
Extra-intestinale Manifestationen (n=191)					
nein: 87 (64,4 %)	33 (68,8 %)	5 (62,5 %)	0,652	0,86 [0,44-1,66]	
ja: 48 (35,6 %)	15 (31,3 %)	3 (37,5 %)			
Einnahme von Immunsuppressiva (n=268)					
nein: 50 (26,0 %)	14 (20,9 %)	2 (22,2 %)	0,394	1,32 [0,70-2,50]	
ja: 142 (74,0 %)	53 (79,1 %)	7 (77,8 %)			
Abszesse (n=240)					
nein: 160 (96,4 %)	61 (93,8 %)	7 (77,8 %)	0,151	2,35 [0,73-7,56]	
ja: 6 (3,6 %)	4 (6,2 %)	2 (22,2 %)			

Tabelle 34. Assoziation des *PTPN2*-SNP rs2542151 mit *C. ulcerosa*-Merkmalen. P_G, OR_G: p-Wert für eine Assoziation der Träger des T-Allels im Vergleich mit homozygoten Trägern von G. Assoziationswerte für das Alter bei Diagnosestellung und den BMI wurden am Median dichotomisiert. Keiner der p-Werte blieb jedoch nach einer Bonferroni-Korrektur für multiple Testung signifikant (Zahl der getesteten Hypothesen n=12, resultierender Grenzwert für eine Signifikanz p<4,17x10⁻³).

Die Genotyp-Phänotyp-Analyse bezog sich auch auf eine mögliche Assoziation von rs7234029 mit besonderen Merkmalen von *C. ulcerosa*. Die Daten hierzu finden sich in Tabelle 35.

PTPN2-SNP rs7234029	AA (n=220)	AG (n=83)	GG (n=11)	P_G	OR_G [95% CI]
Geschlecht (n=314)					
Männlich	119 (54,1 %)	42 (50,6 %)	5 (45,5 %)	0,506	1,18 [0,73-1,91]
Weiblich	101 (45,9 %)	41 (49,4 %)	6 (54,5 %)		
Alter bei Diagnosestellung (Jahre) (n=298)					
Mittelwert ± SD	29,95 ± 14,90	26,32 ± 13,49	30,50 ± 12,70	0,401	1,24 [0,75-2,05]
Wertebereich (Range)	3-81	2-73	14-57		
Alter bei Diagnosestellung (n=298)					
<16 Jahre (A1) (n=57)	37 (17,5 %)	19 (25,0 %)	1 (10,0 %)	0,558	1,21 [0,64-2,26] (A1 vs. A2)
17-40 Jahre (A2) (n=181)	125 (59,0 %)	49 (64,5 %)	7 (70,0 %)	3,47x10⁻²	2,24 [1,06-4,73] (A2 vs. A3)
> 40 Jahre (A3) (n=60)	50 (23,6 %)	8 (10,5 %)	2 (20,0 %)	2,51x10⁻²	2,70 [1,13-6,45] (A1 vs. A3)
BMI (kg/m²) (n=207)					
Mittelwert ± SD	23,97 ± 4,66	24,10 ± 4,26	22,90 ± 3,18	0,975	0,99 [0,54-1,82]
Wertebereich (Range)	15-54	15-36	20-29		
Lokalisierung (n=258)					
Proktitis (E1) (n=24)	13 (7,2 %)	11 (16,4 %)	0 (0 %)	7,75x10 ⁻²	2,15 [0,92-5,05]
Linksseitige UC (E2) (n=96)	71 (39,2 %)	20 (29,9 %)	5 (50,0 %)	0,305	0,74 [0,42-1,31]
Extensive UC (E3) (n=138)	97 (53,6 %)	36 (53,7 %)	5 (50,0 %)	0,960	0,99 [0,58-1,68]
Extra-intestinale Manifestationen (n=188)					
nein: 87 (66,4 %)	33 (63,5 %)	3 (60,0 %)	0,666	1,15 [0,60-2,21]	
ja: 44 (33,6 %)	19 (36,5 %)	2 (40,0 %)			
Einnahme von Immunsuppressiva (n=266)					
nein: 50 (26,5 %)	15 (22,4 %)	1 (10,0 %)	0,332	1,37 [0,72-2,60]	
ja: 139 (73,5 %)	52 (77,6 %)	9 (90,0 %)			
Abszesse (n=238)					
nein: 161 (97,0 %)	58 (92,1 %)	7 (77,8 %)	3,94x10⁻²	3,47 [1,06-11,32]	
ja: 5 (3,0 %)	5 (7,9 %)	2 (22,2 %)			

Tabelle 35. Assoziation des *PTPN2*-SNPs rs7234029 mit *C. ulcerosa*-Merkmalen. P_G, OR_G: p-Wert für eine Assoziation der Träger des G-Allels im Vergleich mit homozygoten Trägern von A. Assoziationswerte für das Alter bei Diagnosestellung und BMI wurden am Median dichotomisiert. Unkorrigierte p-Werte < 0,05 sind fett gedruckt dargestellt. Keiner der P-Werte blieb jedoch nach einer Bonferroni-Korrektur für multiple Testung signifikant (Zahl der getesteten Hypothesen: n=12, resultierender Grenzwert für eine Signifikanz p < 4,17x10⁻³).

5.3 Haplotyp-Analyse

5.3.1 Analyse von *IL12B*-Haplotypen bezüglich ihrer Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Bei der anschließend durchgeführten Haplotyp-Analyse in der CED-Kohorte konnten keine signifikanten Assoziationen der *IL12B*-Haplotypen mit Suszeptibilität bezüglich M. Crohn und *C. ulcerosa* gezeigt werden (Tabelle 36 und Tabelle 37). Der Haplotyp aller vier untersuchten Polymorphismen (rs3212227-rs17860508-rs10045431-rs6887695) ließ eine Tendenz zur Assoziation mit M. Crohn ($p=0.053$) erkennen, erreichte jedoch auch ohne eine Korrektur für multiple Testung keine statistische Signifikanz.

Haplotypen-Kombination	Omnibus p-Wert
rs3212227-rs17860508	0,957
rs17860508-rs10045431	0,333
rs10045431-rs6887695	0,168
rs3212227-rs17860508-rs10045431	0,219
rs17860508-rs10045431-rs6887695	0,202
rs3212227-rs17860508-rs10045431-rs6887695	<i>0,053</i>

Tabelle 36. Haplotypen von *IL12B*-SNPs in der M. Crohn-Fall-Kontroll-Gruppe und omnibus p-Werte für die Assoziation mit einer Suszeptibilität für M. Crohn. p-Werte, die eine Tendenz zur Assoziation zeigen, sind kursiv gedruckt.

Haplotypen-Kombination	Omnibus p-Wert
rs3212227-rs17860508	0,614
rs17860508-rs10045431	0,319
rs10045431-rs6887695	0,126
rs3212227-rs17860508-rs10045431	0,288
rs17860508-rs10045431-rs6887695	0,206
rs3212227-rs17860508-rs10045431-rs6887695	0,300

Tabelle 37. Haplotypen von *IL12B*-SNPs in der *C. ulcerosa*-Fall-Kontroll-Gruppe und omnibus p-Werte für eine Assoziation mit einer Suszeptibilität für *C. ulcerosa*.

5.3.2 Analyse von *PTPN2*-Haplotypen bezüglich ihrer Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Auch die von den *PTPN2*-SNPs rs2542151 und rs7234029 gebildeten Haplotypen wurden analysiert. Dabei wurde das Modell einer logistischen Regression für Haplotyp-spezifische Assoziationen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 dargestellt und sprechen für die stärkste Assoziation des TA-Haplotypen mit M. Crohn ($p=2,37 \times 10^{-5}$). Ähnliche Ergebnisse konnten für *C. ulcerosa* beobachtet werden, mit einem p-Wert von $p=1,52 \times 10^{-2}$ ist die Allelkombination TA am stärksten assoziiert (Tabelle 39).

<i>PTPN2</i> -SNP1	<i>PTPN2</i> -SNP2	Haplotyp	OR	95% CI	p-Wert
rs2542151	rs7234029	GG	1,42	1,04-1,93	$1,46 \times 10^{-3}$
rs2542151	rs7234029	TG	1,18	0,82-1,71	$2,93 \times 10^{-1}$
rs2542151	rs7234029	GA	1,45	0,92-2,32	$1,88 \times 10^{-2}$
rs2542151	rs7234029	TA	0,70	0,62-0,80	$2,37 \times 10^{-5}$

Tabelle 38. Frequenzen der Haplotypen bestehend aus den *PTPN2*-SNPs rs2542151 und rs7234029 in der M. Crohn Fall-Kontroll-Kohorte. OR = Odds Ratio; 95% CI = 95% confidence interval = Konfidenzintervall.

<i>PTPN2</i> -SNP1	<i>PTPN2</i> -SNP2	Haplotyp	OR	95% CI	p-Wert
rs2542151	rs7234029	GG	1,21	0,83-1,77	0,220
rs2542151	rs7234029	TG	1,34	0,77-2,33	0,147
rs2542151	rs7234029	GA	1,37	0,76-2,47	0,151
rs2542151	rs7234029	TA	0,76	0,63-0,91	0,015

Tabelle 39. Frequenzen der Haplotypen bestehend aus den *PTPN2*-SNPs rs2542151 und rs7234029 in der *C. ulcerosa* Fall-Kontroll-Kohorte. OR= Odds Ratio; 95% CI Confidence Interval=Konfidenzintervall.

5.4 Epistasis-Analyse

5.4.1 Analyse der Gen-Gen-Interaktion von *IL12B* mit dem *IL23R*- bzw. *STAT4*-Gen

Es erfolgte eine Analyse der Gen-Gen-Interaktion (=Epistasis) zwischen *IL12B* und weiteren M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen, welche an IL-12- und Th17-Signalwegen beteiligt sind. Hierzu gehören unter anderem Polymorphismen im *IL23R*- und *STAT4*-Gen [114,186,187]. Bei sechs der sieben analysierten *STAT4*-Polymorphismen (rs11889341, rs7574865, rs7568275, rs8179673, rs10181656 und rs7582694) konnte eine schwache, aber dennoch signifikante Assoziation ($p < 0,05$) mit dem *IL12B*-SNP rs6887695 und bzgl. M. Crohn-Suszeptibilität nachgewiesen werden (Tabelle 40). Nach Bonferroni-Korrektur blieb die Signifikanz jedoch für keine der Assoziationen bestehen. Eine Epistasis zwischen *IL23R*- und *IL12B*-Varianten ließ sich nicht zeigen (Tabelle 40).

<i>IL12B</i>-SNPs	rs3212227	rs17860508	rs10045431	rs6887695
<i>IL23R</i>-SNPs				
rs1004819	0,408	0,731	0,474	0,450
rs7517847	0,902	0,895	0,743	0,956
rs10489629	0,577	0,284	0,757	0,561
rs2201841	0,497	0,428	0,080	0,189
rs11465804	0,793	0,852	0,819	0,110
rs11209026= p.Arg381Gln	0,280	0,752	0,929	0,181
rs1343151	0,970	0,745	0,874	0,971
rs10889677	0,485	0,688	0,108	0,120
rs11209032	0,311	0,473	0,890	0,427
rs1495965	0,641	0,640	0,518	0,624
<i>STAT4</i>-SNPs				
rs11889341	0,732	0,092	0,160	0,025
rs7574865	0,845	0,069	0,223	0,031
rs7568275	0,725	0,115	0,229	0,045
rs8179673	0,659	0,120	0,160	0,035
rs10181656	0,618	0,115	0,230	0,040
rs7582694	0,818	0,085	0,162	0,021
rs10174238	0,354	0,200	0,625	0,247

Tabelle 40. Analyse der Gen-Gen-Interaktion zwischen *IL12B*- und *IL23R*- und *STAT4*-Varianten hinsichtlich ihrer Suszeptibilität zu M. Crohn.

5.4.2 Analyse der Gen-Gen-Interaktion zwischen *PTPN2* und den wichtigsten M. Crohn-Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*

Die anschließende Analyse der Gen-Gen-Interaktion erfolgte zwischen *PTPN2* und drei der wichtigsten CED-Suszeptibilitätsgene *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*. Aktuelle Studien zeigen eine mögliche funktionelle Interaktion dieser Gene. Eine GRAIL-Analyse konnte einen Zusammenhang zwischen dem *PTPN2*-verwandten Gen *PTPN22* und *NOD2* nachweisen [113]. Zudem reguliert *PTPN2* die Bildung von Autophagosomen in menschlichen Darmzellen, weshalb ein Zusammenhang mit *ATG16L1* naheliegt [171]. Eine schwache Epistasis konnte zwischen dem *PTPN2*-SNP rs2542151 und der *ATG16L1*-Variante rs2241879 ($p=2.37 \times 10^{-2}$) in der M. Crohn-Kohorte (Tabelle 41) sowie zwischen dem *PTPN2*-Polymorphismus rs7234029 und *ATG16L1* SNP rs4663396 ($p=4.68 \times 10^{-3}$) in der Patientengruppe mit *C. ulcerosa* (Tabelle 42) nachgewiesen werden. Nach der Bonferroni-Korrektur für multiple Testung bestand die Signifikanz dieser Assoziationen jedoch nicht

mehr. Eine Epistasis zwischen *PTPN2* und den M. Crohn-assoziierten Varianten der Gene *NOD2* und *IL23R* ließ sich ebenfalls nicht nachweisen.

Epistasis zwischen	<i>PTPN2</i> -SNP rs2542151	<i>PTPN2</i> -SNP rs7234029
<i>NOD2</i>-SNPs		
rs2066844=p.Arg702Trp	0,607	0,498
rs2066845=p.Gly908Arg	0,219	0,916
rs2066847=p.Leu1007fsX1008	0,208	0,276
<i>IL23R</i>-SNPs		
rs1004819	0,556	0,244
rs7517847	0,723	0,916
rs10489629	0,395	0,642
rs2201841	0,303	0,414
rs11465804	0,485	0,887
rs11209026=p.Arg381Gln	0,943	0,754
rs1343151	0,277	0,978
rs10889677	0,508	0,417
rs11209032	0,213	0,290
rs1495965	9,86x10 ⁻²	0,258
<i>ATG16L1</i>-SNPs		
rs13412102	0,620	0,358
rs12471449	0,419	0,383
rs6431660	5,73x10 ⁻²	0,394
rs1441090	0,389	0,437
rs2289472	0,102	0,404
rs2241880=p.Thr300Ala	8,07x10 ⁻²	0,570
rs2241879	2,37x10⁻²	0,382
rs3792106	0,303	0,930
rs4663396	9,76x10 ⁻²	0,109

Tabelle 41. Ergebnisse der Epistasis-Analyse zwischen *PTPN2*-SNPs und Markern in den Genen *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* in der M. Crohn Fall-Kontroll-Population. Unkorrigierte p-Werte <0,05 sind fett gedruckt dargestellt. Keiner der p-Werte blieb nach der Bonferroni-Korrektur für multiple Testung signifikant (Zahl der getesteten Hypothesen: n=44, resultierender Grenzwert für eine Signifikanz $p < 1,14 \times 10^{-3}$).

Die folgende Tabelle 42 zeigt die Daten zur Epistasis-Analyse von *PTPN2* jeweils mit ausgewählten Polymorphismen im *NOD2*-Gen, *IL23R*-Gen und *ATG16L1*-Gen bezogen auf die *C. ulcerosa* Fall-Kontroll-Gruppe.

Epistasis zwischen	<i>PTPN2</i>-SNP rs2542151	<i>PTPN2</i>-SNP rs7234029
<i>NOD2</i>-SNPs		
rs2066844=p.Arg702Trp	0,611	0,219
rs2066845=p.Gly908Arg	0,385	0,555
rs2066847=p.Leu1007fsX1008	0,137	0,522
<i>IL23R</i>-SNPs		
rs1004819	0,869	0,425
rs7517847	0,561	0,972
rs10489629	0,177	0,844
rs2201841	0,711	0,421
rs11465804	0,465	0,265
rs11209026=p.Arg381Gln	0,471	0,831
rs1343151	0,525	0,331
rs10889677	0,889	0,303
rs11209032	0,649	0,330
rs1495965	0,847	0,740
<i>ATG16L1</i>-SNPs		
rs13412102	0,553	0,749
rs12471449	0,762	8,21x10 ⁻²
rs6431660	0,298	0,104
rs1441090	0,455	0,544
rs2289472	0,392	0,100
rs2241880=p.Thr300Ala	0,536	0,615
rs2241879	0,345	0,423
rs3792106	0,787	0,714
rs4663396	0,217	4,68x10⁻³

Tabelle 42. Epistasis zwischen *PTPN2*-SNPs und Genmarkern, die im *NOD2*-, *IL23R*- und *ATG16L1*-Gen lokalisiert sind. Die Tabelle bezieht sich auf die *C. ulcerosa* Fall-Kontroll-Population. Unkorrigierte p-Werte <0,05 sind fett gedruckt dargestellt. Keiner der p-Werte blieb nach der Bonferroni-Korrektur für multiple Testung signifikant (Zahl der getesteten Hypothesen: n=44, Grenzwert für eine Signifikanz p<1,14x10⁻³).

5.5 Der Einfluss von *IL12B*-SNPs auf dermatologische Nebenwirkungen von Anti-TNF-Antikörpern bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

In einer weiteren Subanalyse wurden bei M. Crohn- und C. ulcerosa-Patienten, die mit Anti-TNF-Antikörpern therapiert wurden, Polymorphismen in den Genen *IL23R* und *IL12B* analysiert. Eine Anti-TNF-Therapie ist in seltenen Fällen mit einer Exazerbation einer bestehenden Psoriasis oder mit einer *de novo* Psoriasis verbunden. Die Ursachen dafür sind bislang nicht ausreichend verstanden und erscheinen paradox, da eine Anti-TNF-Therapie auch bei Patienten mit einer schweren Psoriasis und bei der Psoriasis-Arthritis mit gutem Erfolg eingesetzt wird.

IL12B und *IL23R* sind sowohl mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als auch mit Psoriasis assoziiert und daher in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse [112,113,114,143,186].

Von der Gesamtpopulation (n=1231) wurden 434 Patienten (M. Crohn n=331; C. ulcerosa n=103), die mit Anti-TNF-Antikörpern behandelt wurden untersucht. 416 der 434 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Studie mit Infliximab, 141 mit Adalimumab therapiert. 123 Patienten erhielten beide Medikamente.

Von den 434 unter Anti-TNF-Therapie stehenden Patienten entwickelten 21 psoriasiforme Hautläsionen (vgl. Abbildung 15).

Unter den 21 Patienten mit typischen Hautveränderungen litten 19 an einem M. Crohn und zwei an einer C. ulcerosa. 11 der 21 Betroffenen zeigten palmoplantare Psoriasis-ähnliche Läsionen der Haut. Bei weiteren sieben konnte eine Form der Psoriasis guttata festgestellt werden. 16 der 21 Betroffenen standen zum Zeitpunkt des Neuauftretens der Hautveränderungen unter Infliximab-Therapie, die weiteren fünf unter Adalimumab-Therapie. Auch die fünf Patienten, die aktuell einer Behandlung mit Adalimumab unterlagen, hatten in der Vorgeschichte Infliximab erhalten.

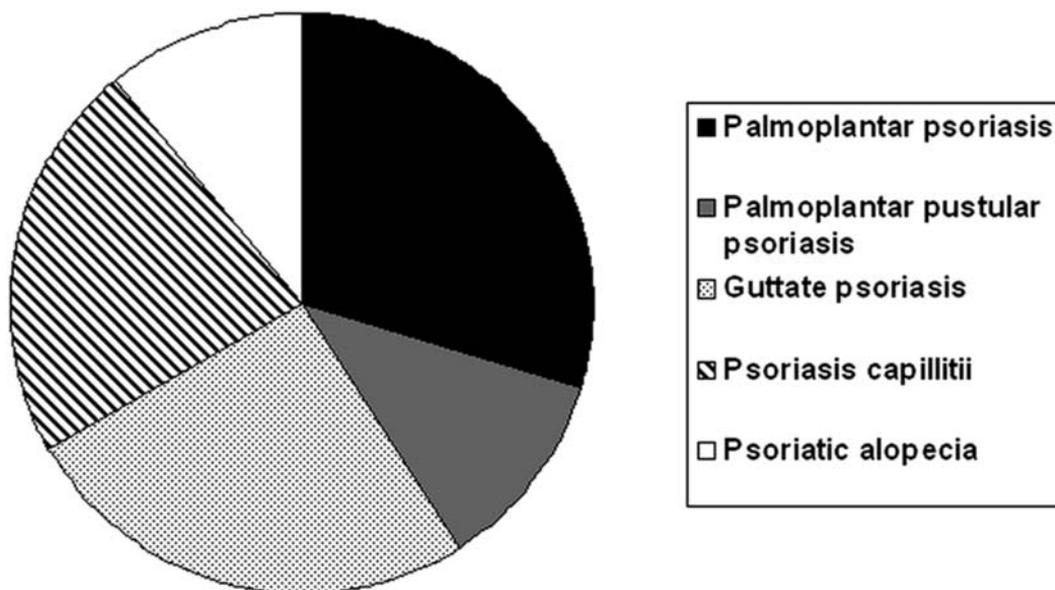


Abbildung 15. Spektrum Anti-TNF-induzierter psoriasiformer Hautläsionen. Die Grafik zeigt, welche Hautareale bei den 21 Patienten mit Anti-TNF-induzierten Psoriasis-ähnlichen Hautläsionen genau betroffen waren. Neun Patienten entwickelten eine Form der Psoriasis capillitii (n=6) oder Alopecie (n=3). Unter diesen neun Patienten hatten n=1 eine Psoriasis guttata, n=1 eine palmoplantare Psoriasis pustulosa und n=2 eine palmoplantare Psoriasis. Bei drei der Patienten war die Hauptdiagnose Alopecie (n=1) oder Psoriasis capillitii-ähnliche Läsionen der Kopfhaut (n=2). Daher zeigt die Grafik 27 betroffene Hautareale bei nur 21 Patienten (palmoplantare Psoriasis: n=8; palmoplantare pustulöse Psoriasis: n=3; Psoriasis guttata: n=7; Psoriasis am Kapillitium: n=6; psoriasiforme Alopecie: n=3). Originalgrafik (Figure 2) aus [192].

Bei allen Betroffenen, bei denen eine topische Therapie nicht zur Besserung der Hautveränderungen geführt hatte, erfolgte zunächst ein Therapiewechsel innerhalb der Klasse der Anti-TNF-Antikörper. Die Umstellung von Infliximab auf Adalimumab oder von Adalimumab auf Certolizumab führte jedoch lediglich bei einem Patienten zu einer geringgradigen Verbesserung. Bei einem weiteren Betroffenen kam es dabei sogar zu einer Verschlechterung der Hautveränderungen. Aufgrund dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass sich psoriasiforme Hautläsionen bei allen Arten von Anti-TNF-Antikörpern entwickeln können.

Patienten mit hochgradigen psoriasiformen Hautläsionen, bei denen eine topische dermatologische Therapie und der Wechsel von Infliximab auf Adalimumab (bzw. Certolizumab) nicht zur gewünschten Besserung führte, wurden auf eine systemische Therapie mit dem Anti-IL-12/IL-23-Antikörper Ustekinumab umgestellt.

Alle sieben Patienten (100%), die mit Ustekinumab behandelt wurden, zeigten deutliche Verbesserungen der Hautläsionen im Verlauf der Therapie. Die Krankheitsaktivität des M. Crohn (gemessen am *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI)) war bei der Mehrheit der

Patienten stabil in Remission (CDAI<150). Lediglich bei einem Patienten musste eine Aktivitätszunahme des M. Crohn beobachtet werden. Bei ihm wurde jedoch auch eine *Campylobacter jejuni*-Infektion diagnostiziert, was der Grund für die Verschlechterung sein könnte. In Tabelle 43 sind die klinischen und demographischen Daten der Patienten aufgeführt, die mit dem Anti-IL-12/IL-23-Antikörper Ustekinumab therapiert wurden.

Patient Nr.	Alter	Geschlecht	CED-Art	Art der Hautläsion	CDAI vor Ustekinumab	CDAI in Woche 16*	Veränderung der Hautläsionen
2	28	M	MC	Palmoplantare Psoriasis pustulosa, Psoriasis capillitii	N/A	84	++
3	27	W	MC	Diffuse Alopezie	0 (komplette Remission)	0	+++
9	22	M	MC	Palmoplantare Psoriasis, Alopezie	62	101	++
11	20	M	MC	Psoriasis guttata, Psoriasis capillitii	69	69†	++
12	30	W	MC	palmoplantare Psoriasis pustulosa	49	183‡	++
14	61	M	MC	Psoriasis capillitii, Anzeichen von Psoriasis und Lupus erythematodes	0 (komplette Remission)	50§	+++
20	40	W	MC	Palmoplantare Psoriasis, Psoriasis capillitii	313	214•	++

Tabelle 43. Klinische und demographische Daten der Patienten, die mit dem Anti-IL-12/IL-23-Antikörper Ustekinumab behandelt wurden [192].

Der Schweregrad der M. Crohn-Erkrankung wurde anhand des CDAI bewertet. Die klinische Verbesserung der psoriasiformen Hautläsionen wurden von einem unabhängigen Dermatologen anhand eines semiquantitativen *Scores* beurteilt (- verschlechtert, 0 gleichbleibend, + leichte Besserung, ++ deutliche Verbesserung, +++ abgeheilt)

*Der CDAI wurde in der 16. Woche nach zwei Ustekinumab-Injektionen erhoben (am Tag der dritten Injektion jedoch noch vor der dritten Ustekinumab-Injektion)

† Dieser Patient trägt ein Stoma. Daher wurde der CDAI erhoben ohne die Stuhlfrequenz in den angegebenen CDAI-Wert einzubeziehen.

‡ Bei diesem Patienten wurde in der 16. Woche eine *Campylobacter jejuni*-Infektion diagnostiziert.

§ drei Ustekinumab-Injektionen (45 mg in Woche 0; 45 mg in Woche 4; 90 mg in Woche 10).

• noch vor der 16. Woche wurde dieser Patient mit Prednisolon behandelt, da es zu einem Wiederaufflammen der Erkrankung kam (20mg für eine Woche, anschließende Dosisreduktion um 2,5mg pro Woche)

MC=Morbus Crohn, W=weiblich, M=männlich, CED= chronisch entzündliche Darmerkrankung,

Ein repräsentatives Beispiel der palmoplantaren Läsionen vor und nach der Therapie mit Ustekinumab zeigt Abbildung 16.

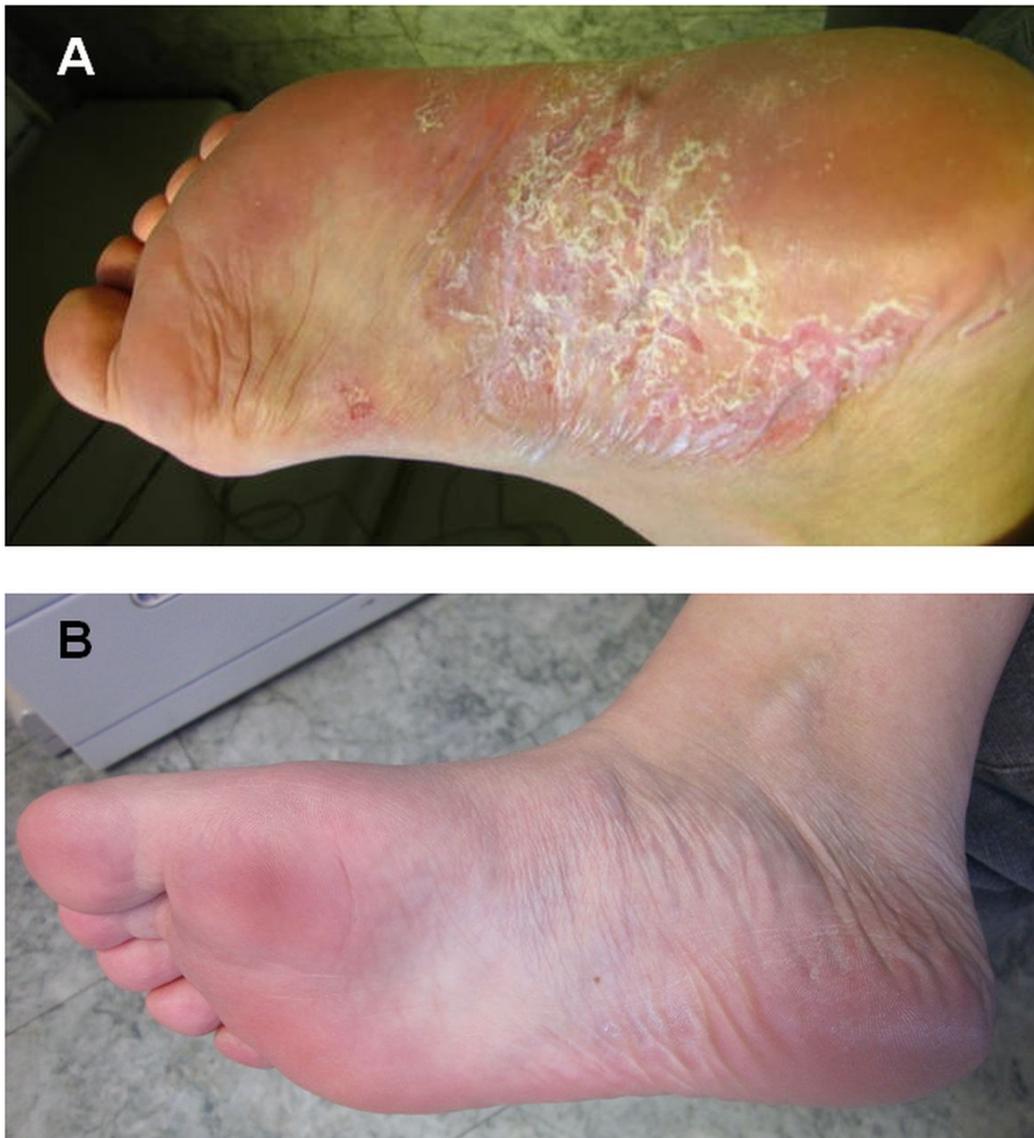


Abbildung 16. Anti-TNF-induzierte, palmoplantare, psoriasiforme Hautläsionen bei einer weiblichen Patientin mit M. Crohn. Bild A zeigt die hochgradigen, durch Influximab-Therapie ausgelösten, plantaren Psoriasis-ähnlichen Hautläsionen. Bild B zeigt die vollständige Abheilung der Hautveränderungen nach einer Therapie mit Ustekinumab und Alitretinoin. Originalfoto (*Figure 9*) aus [192].

Aufgrund des exzellenten Ansprechens auf die Anti-IL-12/IL-23-Therapie mit Ustekinumab bei allen Patienten mit Anti-TNF-induzierten Hautläsionen und der gemeinsamen Assoziation von *IL23R*- und *IL12B*-SNPs mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis erfolgte eine Genotyp-Analyse. Ziel dabei war zu klären ob *IL23R* und *IL12B*-Genvarianten mit Anti-TNF-induzierten psoriasiformen Hautläsionen assoziiert sind. In der betrachteten Studienpopulation hatte keiner der Patienten Familienangehörige mit schwerer Psoriasis.

Tabelle 44 zeigt die detaillierten Ergebnisse der analysierten *IL12B*-Polymorphismen rs3212227, rs6887695, rs2082412 und rs10045431. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Minor-Allelfrequenzen der *IL12B*-SNPs nachgewiesen werden.

<i>IL12B</i> -SNP	MAF in		MAF		Anzahl		Häufigkeit		Genotyp
	Fällen	Kontrollen	p-Wert Fälle vs. Kontrollen	Genotyp	Fälle	Kontrollen	Fälle	Kontrollen	p-Wert Fälle vs. Kontrollen
rs3212227	0,167	0,217	0,562	AA	15	201	0,71	0,61	0,488
				AC	5	113	0,24	0,34	0,475
				CC	1	15	0,05	0,05	1,000
rs6887695	0,333	0,330	1,000	GG	8	150	0,38	0,45	0,653
				GC	12	145	0,57	0,44	0,262
				CC	1	37	0,05	0,11	0,713
rs2082412	0,190	0,216	0,847	GG	14	208	0,67	0,62	0,818
				GA	6	114	0,29	0,34	0,812
				AA	1	16	0,05	0,05	1,000
rs10045431	0,167	0,243	0,351	CC	14	198	0,67	0,58	0,502
				CA	7	117	0,33	0,35	1,000
				AA	0	24	0,00	0,07	0,381

Tabelle 44. Assoziationen der *IL12B*-SNPs mit psoriasiformen Hautläsionen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. MAF=Minor-Allelfrequenzen. Auszug aus *Table 4* in [192].

Als Fälle werden alle Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bezeichnet, die unter Anti-TNF-Therapie psoriasiforme Hautläsionen entwickelten. Kontrollen sind jene Patienten, die unter Anti-TNF-Therapie keine neuen Hautveränderungen aufwiesen.

5.6 *In silico*-Analyse bezüglich der Modulation des Bindungsverhaltens von Transkriptions-Faktoren durch *IL12B*- und *PTPN2*-SNPs

5.6.1 Der Einfluss von *IL12B*-SNPs auf das Bindungsverhalten von Transkriptions-Faktoren und die Genexpression von *IL12B*

Um herauszufinden, ob Polymorphismen in der *IL12B*-Region das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren an die DNA und dadurch die Genexpression beeinflussen, analysierten wir die *IL12B*-SNPs rs3212227, rs17860508, rs10045431 und rs6887695 inklusive der umgebenden Sequenzen auf potenzielle Bindungsstellen. Details zur Durchführung finden sich unter Material und Methoden (siehe 4.8). Tabelle 45 zeigt die Ergebnisse. Die größten Unterschiede für Bindungsraten des Major- und Minor-Allel wurden für rs6887695 gefunden, dem einzigen SNP, der in unserer Studienkohorte mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen insgesamt assoziiert war. Bei homozygoten Trägern des Minor-Allels von

rs6887695 fielen (wie oben beschrieben) zudem signifikante Assoziationen mit spezifischen phänotypischen Merkmalen von M. Crohn und C. ulcerosa auf. Es war zu erwarten, dass die Transkriptionsfaktoren HSF1, HSF2, MZF1 und Oct-1 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an die Sequenz, die das Major G-Allel beinhaltet, binden. Das vorhergesagte Bindungsverhalten an das Minor C-Allel war dagegen wesentlich geringer (Tabelle 45). Im Gegensatz dazu war für den Transkriptionsfaktor ROR α die Bindungsrate für das Minor C-Allel höher (Tabelle 45).

Demzufolge könnte das unterschiedliche Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren in dieser Genregion – gefolgt von unterschiedlicher Gen-Transkription – ein Grund für die krankheitsmodifizierenden Einflüsse dieses SNPs sein, die wir in unserer Genotyp-Phänotyp-Analyse beobachten konnten.

Beschriftung zu Tabelle 43 auf der folgenden Seite:

Tabelle 45. Überblick über mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Genregion, welche die analysierten *IL12B*-Polymorphismen rs6887695, rs10045431, rs17860508 und rs3212227 beherbergt. Bindungsraten, die sich zwischen dem Major- und Minor-Allel um mehr als 5 Punkte unterscheiden, sind fett gedruckt. Werte, die um mehr als 10 Punkte abweichen, sind fett kursiv abgebildet. Der Schwellenwert der Bindungsraten des jeweiligen Allels wurde mit 75 festgelegt.

‡ Verschiedene Konsensussequenzen für ein und denselben Transkriptionsfaktor kommen durch Ableitung der Sequenzen aus unterschiedlichen Matrizen in der TRANSFAC Datenbank zustande [189].

* Für rs17860508 existieren mehr als zwei Allele. Die angegebenen Daten für das Major-Allel beinhalten die höchsten Werte von allen vier nicht-Minor Allelen (-, G, GC, TTAGA). &=Werte für das GC-Allel; #=Werte für das (-) Allel; §=Werte für das TTAGA Allel

UTR=*untranslated region*

Nukleotid-Codes: K=G oder T, M=A oder C, R=A oder G, S=C oder G, W=A oder T, N=A, G, C oder T

<i>IL12B</i> SNP	Faktor	Konsensussequenz [‡]	Lage bezüglich SNP (5' to 3')	Bindungswahrscheinlichkeit für das Major-Allel	Bindungswahrscheinlichkeit für das Minor-Allel
rs6887695 (ca. 65 kb oberhalb von <i>IL12B</i>):					
GTGTAGTGTAGTGGT[C/G]AATAGTCTGGATTTA					
	HSF2	NGAANNWTCK	-1 bis +8	85,9	68,6
	AML-1a	TGCGGT	-6 bis -1	85,4	85,4
	MZF1	NGNGGGGA	-6 bis +1	84,3	67,0
	Oct-1	NNGAATATKCANNNN	-5 bis +9	82,5	70,6
	AML-1a	TGCGGT	-14 bis -9	81,4	81,4
	AML-1a	TGCGGT	-9 bis -4	81,4	81,4
	Th1/E4	NNNNGNRTCTGGMWTT	-1 bis +14	80,4	80,8
	HSF1	RGAANRTTCN	-1 bis +8	79,0	62,7
	RORalpha	NWAWNNAGGTCAN	-10 bis +2	64,4	75,9
rs10045431 (ca. 57 kb oberhalb von <i>IL12B</i>):					
GCAGGCACAGCCCAG[A/C]ATTAAACTCTCAAAT					
	Oct-1	CWNAWTKWSATRYN	-2 bis +11	79,6	75,5
	SRY	AAACWAM	+4 bis +10	77,3	77,3
	Pbx-1	ANCAATCAW	-2 bis +6	75,5	69,6
	Sp1	GRGGCRGGGW	-11 bis -2	75,3	75,3
	Tst-1/Oct-6	NNKGAWTWANANTKN	-4 bis +10	70,8	81,2
rs17860508* (ca. 2,7 kb oberhalb von <i>IL12B</i>):					
AATGTGGGGGCCACA[-G/GC/TTAGA/TTAGAG]CCTCTCTCGGAGACA					
	GATA-3 [§]	NNGATARGN	0 bis +9	82,5	74,1
	AML-1a	TGCGGT	-6 bis -1	83,7	83,7
	AML-1a	TGCGGT	-13 bis -8	82,7	82,7
	MZF1	NGNGGGGA	-13 bis -6	80,9	80,9
	Oct1 [§]	NNRTAATNANNN	-6 bis +1	79,3	77,5
	Sp1 [#]	GRGGCRGGGW	-7 bis +3	75,3	61,6
rs3212227 (3'-UTR von <i>IL12B</i>):					
TGTATTTGTATAGTT[A/C]GATGCTAAATGCTCA					
	C/EBP	NNTKTGGWNANNN	-13 bis -1	87,7	87,7
	Brn-2/Oct-3	NNCATNSRWAATNMRN	-1 bis +16	85,1	83,2
	TATA	NCTATAAAAR	-11 bis -2	84,7	84,7
	SRY	AAACWAM	-10 bis -4	80,9	80,9
	Oct-1	TNTATGNTAATT	-1 bis +10	80,2	79,6
	Tst-1/Oct-6	NNKGAWTWANANTKN	0 bis +14	79,2	77,1
	CDP CR	NATYGATSSS	-3 bis +6	78,5	73,1
	Oct-1	CWNAWTKWSATRYN	-7 bis +6	77,6	83,7
	SRY	AAACWAM	-15 bis -9	77,3	77,3
	C/EBP	NNTKTGGWNANNN	-1 bis +10	76,2	76,9
	CDP CR	NATYGATSSS	-5 bis +4	75,3	73,1
	SRY	NWWAACAAWANN	-9 bis +2	71,8	76,2

5.6.2 Der Einfluss von *PTPN2*-SNPs auf das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren und die Genexpression von *PTPN2*

Wir untersuchten ferner, ob die beiden *PTPN2*-SNPs (inklusive der umgebenden Sequenzen - wie im Methodenteil unter 4.8 detaillierter beschrieben) zu Veränderungen an den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (*transcription factor binding sites*) führen. Die vorliegende *in silico*-Analyse zeigte für den *PTPN2*-SNP rs7234029 Unterschiede zwischen Major- und Minor-Allel bezüglich der Bindungswahrscheinlichkeiten diverser Transkriptionsfaktoren, darunter GATA-1, GATA-2, GATA-3, HSF2, NF- κ B, C/EBP, E4BP3, SREBP und HLF. Während die Transkriptionsfaktoren GATA-1, GATA-2, GATA-3 und HSF2 voraussichtlich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an die Sequenz, die das Major-Allel beinhaltet, binden, fiel die theoretisch ermittelte Wahrscheinlichkeit für die Bindung an das Minor G-Allel bedeutend geringer aus (Tabelle 46). Im Gegensatz dazu war die Bindungswahrscheinlichkeit für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, C/EBP, E4BP4, SREBP und HLF für das Minor G-Allel höher. Details sind in Tabelle 46 dargestellt. Für den SNP rs2542151, der ca. 5,5 kb unterhalb von *PTPN2* lokalisiert ist, konnten keine großen Unterschiede bezüglich der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Die detaillierten Ergebnisse sind hier nicht aufgeführt.

Transkriptionsfaktor	Bindungswahrscheinlichkeit Major-Allel (A)	Bindungswahrscheinlichkeit Minor-Allel (G)	Konsensussequenz	Lage bzgl. SNP
GATA-X	95,2	80,1	NGATAAGNMNN	-2 bis +8
GATA-1	94,8	80,2	NNCWGATARNNNN	-5 bis +7
GATA-2	85,8	65,8	NNNGATRNNN	-4 bis +5
GATA-3	83,4	64,1	NNGATARNG	-3 bis +5
HSF2	75,0	62,2	NGAANNWTCK	-3 bis +6
NF-κB	68,5	79,4	GGGAMTTYCC	-1 bis +8
C/EBP	69,5	78,5	NGWNTKNKGAAKNSAYA	-8 bis +9
E4BP4	65,7	76,0	NRTTAYGTAAYN	-6 bis +5
SREBP	67,2	75,0	NATCACGTGAY	-6 bis +4
HLF	66,9	75,0	RTTACTYAAT	-5 bis +4

Tabelle 46. Potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Genregion, die den *PTPN2* SNP rs7234029 beherbergt. Die *in silico*-Analyse erfolgte mit dem Programm TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Dargestellt sind nur diejenigen Bindungsstellen, die beim Vergleich beider Allele in der Bindungsrate mehr als 5 Punkte abwichen. Werte, die mehr als 10 Punkte Abweichung aufwiesen, sind fett gedruckt. Der Schwellenwert für die Bindungsrate jedes Alleles wurde auf 75 festgelegt. Nukleotid-Codes: K=G oder T, M=A oder C, R=A oder G, S=C oder G, W=A oder T, N=A, G, C oder T.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit analysiert den Einfluss von *IL12B*- und *PTPN2*-Genvarianten auf die Krankheitssuszeptibilität von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Beide Gene sind von großer Relevanz für zwei wichtige, an der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligte Signalkaskaden. Diese Studie hatte zum Ziel, zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von M. Crohn und C. ulcerosa beizutragen. Die erhobenen Daten könnten zu neuen Therapiestrategien beitragen, die nicht nur bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zur Anwendung kommen, sondern auch für weitere Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sind.

6.1 Die Rolle des *IL12B*-Gens bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

6.1.1 *IL12B* als Suszeptibilitäts-gen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Ergebnisse und Grenzen der Assoziationsstudie

Im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse, welche Varianten im *IL12B*-Gen als potenzielle Suszeptibilitätsloci in einer großen deutschen CED-Kohorte untersuchte. Ein Schwerpunkt lag in der Untersuchung möglicher epistatischer Interaktionen mit wichtigen Gen-Varianten des IL-12- und IL-23/Th17- Signalwegs wie *IL23R* und *STAT4*. Es konnte dabei gezeigt werden, dass der *IL12B*-SNP rs6887695 schwach mit allgemeiner CED-Suszeptibilität assoziiert ist ($p=0,035$). Dabei ist die Tendenz sowohl zu einer Assoziation mit M. Crohn als auch mit C. ulcerosa erkennbar. Außerdem wurde bei der Genotyp-Analyse der vier untersuchten *IL12B*-SNPs eine Tendenz zur Assoziation mit M. Crohn ($p=0,05$) festgestellt. Betrachtet man diese Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller GWAS, die klare Hinweise auf eine Assoziation geben [112,113], kann *IL12B* als etabliertes Suszeptibilitäts-gen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen angesehen werden. Im Gegensatz zu den sehr großen Patientenzahlen in den GWAS, war die Gesamtzahl unserer Studienteilnehmer ($n=2196$) geringer. Dies führte zu einer limitierten *Power*, insbesondere in der C. ulcerosa-Kohorte. So zeigt eine *Power*-Kalkulation für die seltenste *IL12B*-Variante rs3212227, die von einer OR von 1,2 und einer Allelfrequenz von 0,20 ausgeht, dass unsere Studie in der M. Crohn-Kohorte eine *Power* von 63,1% hat, ein nominal signifikantes Ergebnis ($\alpha = 0,05$) zu ermitteln. Für die C. ulcerosa-Kohorte liegt die *Power* lediglich bei 38,2%. Basierend auf den Ergebnissen unserer Studie kann man jedoch feststellen, dass die Stärke einer potenziellen Assoziation von *IL12B* mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mehrere Zehnerpotenzen schwächer ist, als die in derselben Kohorte

untersuchte Assoziation mit *IL23R* und anderen Hauptsuszeptibilitätsgenen wie *NOD2* und *ATG16L1* (Tabelle 47). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass IL-23R (kodiert von *IL23R*) eine wichtigere Rolle bei der Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen zukommt, als IL-12/23p40 (kodiert von *IL12B*). Dies stimmt auch mit den jüngsten zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen veröffentlichten Metaanalysen überein [112,113]. Diese zeigten für *IL23R* deutlich stärkere CED-Assoziations-Signale als für *IL12B*.

SNP	Minor-Allel	M. Crohn			C. ulcerosa			Kontrollen
		MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF	p-Wert	OR [95 % CI]	MAF
<i>IL12B</i> rs3212227	G	0,209	0,684	0,97 [0,82-1,13]	0,214	0,777	1,03 [0,83-1,29]	0,209
<i>IL12B</i> rs17860508	TTAGAG	0,485	0,974	1,00 [0,88-1,14]	0,489	0,854	1,02 [0,85-1,22]	0,484
<i>IL12B</i> rs10045431	A	0,271	0,258	0,92 [0,80-1,06]	0,252	0,083	0,83 [0,68-1,02]	0,288
<i>IL12B</i> rs6887695	C	0,329	0,066	1,41 [0,99-1,31]	0,336	0,092	1,18 [0,97-1,43]	0,300
<i>NOD2</i> rs2066843	T	0,390	3,01 x 10⁻⁵	1,48 [1,23-1,78]	0,300	0,967	1,01 [0,85-1,19]	0,299
<i>NOD2</i> rs2076756	G	0,380	4,01 x 10⁻⁶	1,54 [1,28-1,86]	0,270	0,374	1,09 [0,94-1,27]	0,286
<i>NOD2</i> rs2066844	T	0,089	1,43 x 10⁻⁶	2,07 [1,53-2,79]	0,046	0,749	0,92 [0,60-1,40]	0,050
<i>NOD2</i> rs2066845	G	0,042	1,10 x 10⁻²	1,72 [1,14-2,60]	0,022	1,000	0,94 [0,51-1,73]	0,024
<i>NOD2</i> rs2066847	insC	0,121	1,88 x 10⁻¹⁴	5,03 [3,54-7,15]	0,022	0,391	0,76 [0,42-1,37]	0,028
<i>IL23R</i> rs1004819	T	0,360	1,92 x 10⁻¹¹	1,56 [1,37-1,78]	0,314	3,81 x 10⁻³	1,27 [1,08-1,50]	0,265
<i>IL23R</i> rs7517847	G	0,356	1,86 x 10⁻⁹	0,68 [0,60-0,77]	0,381	3,78 x 10⁻⁴	0,76 [0,65-0,88]	0,448
<i>IL23R</i> rs11209026	A	0,030	8,04 x 10⁻⁸	0,43 [0,31-0,59]	0,049	3,61 x 10⁻²	0,70 [0,50-0,98]	0,068
<i>ATG16L1</i> rs2241880	A	0,410	3,70 x 10⁻⁶	0,74 [0,65-0,84]	0,449	7,60 x 10⁻²	0,87 [0,74-1,02]	0,242

Tabelle 47. Überblick über die Assoziationssignale von *IL12B* im Vergleich zu den Assoziationssignalen von drei der am stärksten mit M. Crohn assoziierten Gene *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1* in der Münchner CED-Fall-Kontroll-Kohorte. Minor-Allelfrequenzen (MAF), p-Wert der allelischen Testung, Odds Ratios (OR, dargestellt für das Minor-Allel) mit 95% Konfidenzintervall (CI) sind jeweils für die M. Crohn- und C. ulcerosa-Fall-Kontroll Gruppe angegeben. Details der Analysen von *NOD2*, *IL23R* and *ATG16L1* wurden in vorausgegangenen Studien publiziert [186,188,193].

Vergleichbare kleinere Studien (Tabelle 48) konnten keine Assoziation von *IL12B*-SNPs mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen demonstrieren oder zeigten lediglich schwache Assoziationen entweder mit M. Crohn oder C. ulcerosa [194,195,196]. Doch auch größeren Studien, wie der von Festen et al. mit 1455 C. ulcerosa-Patienten und 1902 Kontrollen durchgeführten Studie, gelang es nicht, eine Assoziation von *IL12B* mit C. ulcerosa zu zeigen [197]. Dies zeigt deutlich, dass sehr große Patientenkohorten nötig sind, um zuverlässig Assoziationen mit diesen Genloci zu zeigen. Es ist also davon auszugehen, dass *IL23R* als genetischer Modulator der Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen einen größeren Einfluss hat als *IL12B*. Daraus könnte eine größere pathogenetische Bedeutung von IL-23R exprimierenden Th17-Zellen im Vergleich zu Th1-Zellen, die sich unter dem Einfluss von IL-12 differenzieren und entwickeln, abgeleitet werden.

Aktuell gibt es noch wenige Daten, inwiefern *IL12B* die Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen funktionell beeinflussen könnte. Eine kürzlich erschienene Studie konnte zeigen, dass bei Mäusen ein Polymorphismus in der kodierenden Region von murinem *Ii12b* die IL-12p70 und IL-23-Heterodimerbildung begünstigt [198]. Die Autoren vermuten, dass die hohe Syntheserate von IL-12/23-Zytokinen - aus effizientem Bindungsverhalten resultierend - zu einem raschen Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort führt. Dadurch wird das homeostatische Gleichgewicht gestört, was letztendlich in einer gesteigerten CED-Suszeptibilität resultiert [198]. Möglicherweise modifizieren noch weitere Genvarianten die IL-12-Expression. So konnte kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bei M. Crohn-Patienten, die zwei mutierte *NOD2*-Allele aufweisen, erhöhte Basalspiegel von IL-12p40 nachgewiesen werden können [199].

Erstautor	Ethnische Gruppe	<i>IL12B</i> SNP (rs Nummer)	Kontrollen (n)	M. Crohn (n)	M. Crohn versus Kontrollen (p-Wert)	C. ulcerosa (n)	C. ulcerosa versus Kontrollen	Ref.
Anderson	Kaukasier (Meta-Analyse)	rs6871626	15056 (vs. MC) 19718 (vs. CU)	6333	$P_{\text{meta}}=6,08 \times 10^{-12}$	6687	$P_{\text{meta}} 1,02 \times 10^{-8}$	[112]
		rs6556412			$P_{\text{meta}}=5,37 \times 10^{-14}$		$P_{\text{meta}} 1,69 \times 10^{-5}$	
		rs943072					$P_{\text{meta}} 1,05 \times 10^{-6}$	
Franke	Kaukasier (Meta-Analyse)	rs6556412	14026	15694	$5,37 \times 10^{-14}$	-	-	[113]
Parkes	Europäische Abstammung	rs6887695	2024	1182	$P_{\text{rep}}=8,4 \times 10^{-5}$	-	-	[65]
Peter	Ashkenazi Juden	rs6887695	503	369	0,81	-	-	[195]
		rs10045431			0,59			
Yamazaki	Japan	rs6887695	470	484	0,035 (im rezessiven Modell) 0,12 (allelisch)	-	-	[200]
Marquez	Spanien	rs6887695	547	344	0,137	363	0,007	[201]
Weersma	Niederlande/ Belgien	rs6887695	1086 (vs. MC) 1045 (vs. CU)	1621	$1,51 \times 10^{-3}$	1442	$3,62 \times 10^{-2}$	[202]
van der Heide	Niederlande	rs6887695	976	310	0,023	-	-	[203]
Szperl	Niederlande	rs41292470, (früher erwähnt als rs17860508)	1085	-	-	940	0,025	[204]
	Finnland		312			345	0,06	
	kombiniert		1397			1285	0,003	
Barrett	Kaukasier (Meta-Analyse)	rs10045431	4829	3230	$p\text{-scan } 8,80 \times 10^{-9}$	-	-	[124]
					p-repliziert $3,66 \times 10^{-6}$			
					p-kombiniert $3,86 \times 10^{-13}$			
Ferguson	Neuseeland/ Kaukasier	rs1363670	407	339	0,338	-	-	[196]
		rs6887695			0,358			
Wang	WTCCC (europäische Abstammung)	rs1363670	1480	1748	$6,89 \times 10^{-6}$	-	-	[120,183,205]
	Ped-IBD (europäische Abstammung)	rs6556412	4250	647	$1,14 \times 10^{-3}$			
	CDCC (europäische Abstammung)	rs10045431	2507	1083	$6,02 \times 10^{-7}$			
	CHOP-CD-AA (Afroamerikaner)	rs1422878	527	40	$1,253 \times 10^{-2}$			
McGovern	Italien	rs10045431	826	-	-	993	0,024	[206]
	Niederlande		754			1016	0,023	
	kombiniert		1500			2009	$1,4 \times 10^{-3}$	
Festen	Niederlande	Keine rs-Nummer genannt	1902	-	-	1455	Keine Assoziation für <i>IL12B</i> gezeigt	[197]
Törkvist	Schweden	rs10045431	1460	736	0,27	935	0,20	[194]
Anderson	Großbritannien	rs10045431	3028	1560		2527	$5,21 \times 10^{-4}$	[207]
Fisher	Großbritannien kombiniert mit WTCCC Ergebnissen	rs6556416 (als proxy für rs10045431)	1492 + 1470 (WTCCC Kontrollen)	-	-	1740 + 1841 (WTCCC Fälle)	$6,8 \times 10^{-4}$	[208]
		rs6887695				$1,6 \times 10^{-3}$		
Glas	Deutschland	rs6887695	965	913	0,066	318	0,092	Vorliegende Studie
		rs3212227			0,684		0,777	
		rs10045431			0,258		0,083	
		rs17860508			0,974		0,854	

Tabelle 48. Überblick über die zu *IL12B* und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erschienenen Studien. MC=M. Crohn, CU= C. ulcerosa, Kontr.=Kontrollen, Ref.= Referenz/Literaturangabe, WTCCC=Wellcome Trust Case Control Consortium, rep=repliziert, meta=Meta-Analyse.

6.1.2 Die Assoziation von *IL12B*-Polymorphismen mit phänotypischen Merkmalen

Die initialen GWAS betrachteten vornehmlich M. Crohn-Patienten mit ilealem Morbus Crohn. Es galt auszuschließen, dass sich Assoziationen, die in jüngsten GWAS-Meta-Analysen identifiziert wurden, nur auf bestimmte Subphänotypen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen konzentrierten. Daher führten wir eine detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse mit besonderer Beachtung des Merkmals „anatomische Lokalisation der Erkrankung“ durch.

Interessanterweise ergab diese Untersuchung eine Assoziation des *IL12B*-SNPs rs3212227 mit Kolonbefall, nicht aber mit ilealem M. Crohn. Höchstwahrscheinlich prädisponieren viele der Suszeptibilitätsloci, die sowohl mit M. Crohn als auch mit *C. ulcerosa* assoziiert sind, für einen gemeinsamen Phänotyp mit prädominantem Kolonbefall (und nicht ilealem Befall) bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Diese These wird von der in vorliegender Studie nachgewiesenen Assoziation des *IL12B*-SNPs rs3212227 mit Kolonbefall und der Tendenz für eine Assoziation von rs6887695 sowohl mit M. Crohn als auch mit *C. ulcerosa* unterstützt.

Auch eine neuseeländische Studie zeigte ähnliche Ergebnisse. Träger des Minor C-Allels des *IL12B*-SNPs rs6887695 zeigten ein vermindertes Risiko für einen ilealen Krankheitsbefall [196]. Eine weitere, kürzlich publizierte Studie analysierte denselben SNP (rs6887695) und mündete in der Vermutung, dass zusätzliche Umweltfaktoren einen Einfluss auf das Risikoverhalten dieses *IL12B*-SNPs bezüglich M. Crohn haben. Es wurden insbesondere Unterschiede in der genetischen Assoziation zwischen rauchenden und nicht-rauchenden M. Crohn-Patienten untersucht. Die Ergebnisse legten eine komplexe Gen-Umwelt-Interaktion nahe, da eine Assoziation des *IL12B*-SNPs rs6887695 mit nicht-rauchenden, aber nicht mit rauchenden Patienten nachgewiesen werden konnte [203].

Auch in unserer (unter 5.5 beschriebenen) Subanalyse zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Umweltfaktor Rauchen und Anti-TNF-induzierten psoriasiformen Hautläsionen bei M. Crohn- und *C. ulcerosa*-Patienten. Rauchen konnte dabei als ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Psoriasis-ähnlichen Hautveränderungen identifiziert werden [192].

6.1.3 Ergebnisse der Epistasis-Analyse: *IL12B* in der Interaktion mit anderen M. Crohn-Suszeptibilitäts-Genen

Unsere Epistasis-Analyse identifizierte eine schwache Gen-Gen-Interaktion zwischen dem *IL12B*-SNP rs6887695 mit sieben der acht untersuchten *STAT4*-Genvarianten ($p < 0,05$).

Angesichts der Tatsache, dass *STAT4* den wichtigsten *downstream* lokalisierten Transkriptionsfaktor von IL-12 darstellt, ist dieser Zusammenhang von großer Bedeutung. Kritisch anzumerken sind allerdings die begrenzte Probandenzahl und die grenzwertige Signifikanz dieser Interaktion, die nach der Bonferroni-Korrektur verschwand. Daher bedarf es weiterer Analysen der beschriebenen Gen-Gen-Interaktion in größeren Kohorten oder großer GWAS-Meta-Analysen, um diesen Zusammenhang zu bestätigen bzw. zu widerlegen.

Es gilt jedoch auch zu beachten, dass GWAS durch das Problem multipler Tests ebenfalls limitiert sind, während die vorliegende Studie auf einer Einzelhypothese (=Assoziation von *IL12B* mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen) basiert. Sie untersuchte SNPs im *IL12B*-Gen, welches die IL-12-p40-Untereinheit kodiert und dessen Interaktion mit *STAT4*. Angesichts der großen Zahl an SNPs, welche in GWAS analysiert werden, ist der Faktor zur Korrektur multipler Tests viel größer als er in der hier vorgestellten Studie war. Dies könnte dazu führen, dass potenzielle, tatsächlich vorhandene, Gen-Gen-Interaktionen durch die Bonferroni-Korrektur eliminiert würden. Zudem wurde in der Studie von Anderson et al. keine formelle Testung auf Epistasis durchgeführt [112]. Auch in dem von Franke et al. veröffentlichten Artikel [113] wurde lediglich eine Epistasis zwischen den 71 signifikant mit M. Crohn assoziierten Loci untersucht, nicht jedoch mit *STAT4*.

6.1.4 Ausblick: neue Ansätze zur Therapie Anti-TNF-induzierter psoriasiformer Hautläsionen, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und weiterer Autoimmunerkrankungen

In Anbetracht seiner Schlüsselfunktion für das Entzündungsgeschehen scheint die Blockade des IL-23-Signalwegs ein geeignetes Mittel zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu sein [209]. Abbildung 17 zeigt Vertreter der IL-12-Zytokinfamilie darunter die beiden heterodimeren Interleukine IL-23 und IL-12 mit der gemeinsamen p40-Untereinheit, die als Angriffspunkt neuer Therapiemethoden dient.

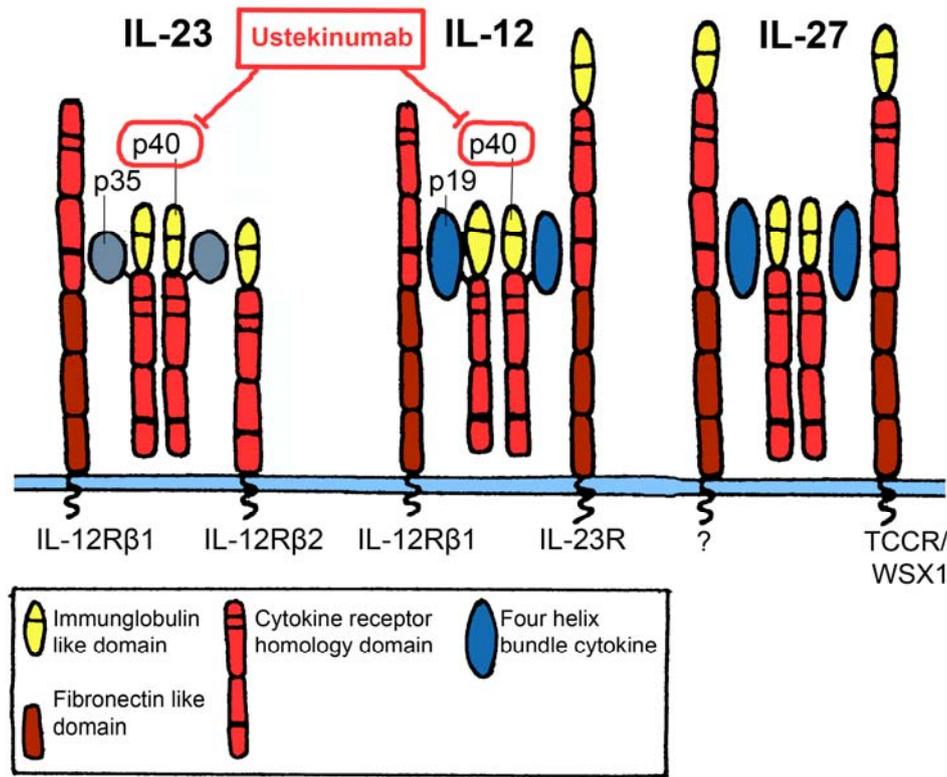


Abbildung 17. Schematische Darstellung der wichtigsten Vertreter der IL-12-Zytokinfamilie und ihrer Struktur: die beiden heterodimeren Moleküle IL-23 und IL-12 teilen sich dieselbe p40-Untereinheit. Diese p40-Untereinheit ist Angriffspunkt neuer Therapieansätze für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Nicht dargestellt ist das ebenfalls zur IL-12-Zytokinfamilie gehörende IL-35. Eigene Grafik auf der Grundlage von [132,210].

M. Crohn scheint in seiner aktiven Entzündungsphase auf eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern anzusprechen, die sich gegen die p40-Untereinheit sowohl von IL-12 als auch von IL-23 richten und deren Funktion beeinträchtigen. Mannon et al. führten eine Studie durch, bei der sich zeigte, dass eine Therapie mit p40-Antikörpern zu klinischer Remission führen kann. Obwohl sich die Behandlungsergebnisse im Langzeitverlauf als nicht signifikant erwiesen, konnten *in vitro* Effekte der Antikörper-Therapie auf die Zytokin-Sekretion beobachtet werden. So bewirkten Antikörper gegen die p40-Untereinheit eine verminderte Produktion Th1-vermittelter Entzündungsmediatoren. In den Zellen der Lamina propria des Darms kam es zur reduzierten Sekretion von IL-12 sowie von IFN- γ und TNF- α [211].

Sandborn et al. konnten schließlich in einer 2008 veröffentlichten Placebo-kontrollierten Studie eine Wirksamkeit von Ustekinumab, einem monoklonalen Antikörper gegen die p40-Untereinheit von IL-12/IL-23 bestätigen [212]. Auch bei Patienten mit einem gegenüber der Anti-TNF-Therapie resistenten M. Crohn konnte ein klinisches Ansprechen auf die Therapie mit Ustekinumab gezeigt werden [213]. Die Wirksamkeit der Antikörpertherapie bestätigt,

dass IL-12/IL-23 bei der aktiven Entzündungsreaktion von M. Crohn eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Da IL-12- und IL-23-Signalwege jedoch auch wichtig für die bakterielle Abwehrreaktion und Regulation anderer Signalkaskaden sind, gilt es, Therapiekomplicationen und insbesondere das Infektionsrisiko besonders zu beachten [209].

Mehrere Studien konnten eine Assoziation von *IL12B*- (rs3212227, rs6887695 und rs10045431) sowie von *IL23R*-Polymorphismen mit Psoriasis zeigen [143,147,214,215]. Ein weiterer mit Psoriasis in Zusammenhang stehender *IL12B*-SNP ist rs2082412 [216]. Die übereinstimmende Assoziation der Gene *IL12B* und *IL23R* mit M. Crohn, Psoriasis und atopischer Dermatitis [217] lässt darauf schließen, dass genetische Varianten, die Einfluss auf den Entzündungsverlauf nehmen, zur Pathogenese mehrerer Erkrankungen beitragen.

Ustekinumab als Anti-IL-12/IL-23-Antikörper scheint dabei nicht nur eine Bedeutung in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zuzukommen sondern auch in der Behandlung von Komplikationen einer Anti-TNF-Therapie. Anti-TNF- α -Antikörper wie Infliximab und Adalimumab kommen in der Therapie von M. Crohn und C. ulcerosa derzeit standardmäßig zum Einsatz. Obwohl diese Anti-TNF-Antikörper als sicher gelten, weisen aktuelle Studien darauf hin, dass bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die Anti-TNF-Therapie Psoriasis-ähnliche Hautläsionen verursachen kann [192,218].

Angesichts dieser Problematik führte unsere Arbeitsgruppe eine Analyse durch, die maßgeblich zum Verständnis Anti-TNF-induzierter, psoriasiformer Hautläsionen bei M. Crohn- und C. ulcerosa-Patienten beitragen sollte [192]. In der prospektiven Studie entwickelten fast 5% der mit Anti-TNF-Antikörpern behandelten CED-Patienten (n=434) psoriasiforme Hautläsionen. Bei allen 434 Patienten wurde eine detaillierte Genotyp-Analyse der mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis-assoziierten *IL23R*- und *IL12B*-Genvarianten durchgeführt. Dabei ergaben sich für keinen der *IL12B*-SNPs signifikante Unterschiede in der Minor-Allelfrequenz zwischen Fällen (Patienten mit neu aufgetretenen Anti-TNF-induzierten Hautläsionen) und Kontrollen (Anti-TNF-Antikörper-behandelte CED-Patienten ohne neuauftretene Hautveränderungen).

Für *IL23R* hingegen ergaben sich bei zwei Polymorphismen (rs11209026 und rs7530511) Auffälligkeiten unter den mit Ustekinumab erfolgreich therapierten Patienten mit psoriasiformen Hautläsionen. Die Genotypisierungen der *IL23R*-SNPs erfolgten im Rahmen der Dissertationsarbeit von Herrn Matthias Friedrich und waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Nominell ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede bei den Minor-Allelfrequenzen zwischen Fällen und Kontrollen. Es fiel jedoch auf, dass alle Patienten mit

schweren Hautläsionen und/oder Anti-TNF-induzierter Alopezie, die eine Ustekinumab-Therapie benötigten, Träger des G/G-Wildtyps der seltenen kodierende Variante des *IL23R*-SNP rs11209026 (p.Arg381Gln) waren. Der Wildtyp-Status dieses SNP ist mit einer erhöhten Th17-Zytokin-Produktion assoziiert [219,220,221,222], während bei Trägern des Minor-Allels die Sekretion von Th17-Zytokinen wie beispielsweise IL-22 reduziert ist [223].

Dies spricht dafür, dass bei der Pathogenese der psoriasiformen Hautläsionen Th17-Zellen von Bedeutung sind. Dass *IL23R* eine Rolle in der Pathogenese von Psoriasis-ähnlichen Hautläsionen spielt, wurde auch in einer weiteren kleineren Studie zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei Kindern vermutet [224]. *IL23R* scheint demnach nicht nur in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, sondern auch in der durch Anti-TNF-Therapie getriggerten Psoriasis von größerer Bedeutung zu sein als *IL12B* [192].

Auch für den *IL23R*-SNP rs75305511 (p.Leu310Pro) konnte bei allen sieben Patienten, die eine Ustekinumab-Therapie benötigten, eine tendenziell größere Zahl an C/T-Heterozygoten festgestellt werden (42,9%). Diese ergab sich im Vergleich mit dem Anteil an C/T-Heterozygoten unter den mit Anti-TNF-Antikörpern behandelten Patienten ohne Hautläsionen (42,9% vs. 21,6%, $p=0,05$) [192].

Bisher ist die Pathogenese der psoriasiformen Hautläsionen nicht vollständig verstanden. Angesichts der Tatsache, dass TNF- α eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis zukommt, scheint es paradox, dass es unter Anti-TNF-Therapie zu psoriasiformen Hautveränderungen kommen kann.

Eine Hypothese besagt, dass plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) eine Rolle bei der Bildung Anti-TNF-Antikörper-induzierter Psoriasis-ähnlicher Hautläsionen spielen könnten [225]. Ein Vorkommen von pDCs, welche IFN- α produzieren, konnte in psoriasiformen Läsionen bereits beschrieben werden [226]. TNF- α hemmt die Reifung von pDC-Zellen und dementsprechend auch die Produktion von IFN- α [227]. Eine Anti-TNF-Therapie könnte demnach zur unbegrenzten IFN- α -Produktion durch pDCs führen. Abbildung 18 zeigt eine Übersicht über zelluläre Interaktionen, beteiligte Zytokine und Angriffspunkte von therapeutisch eingesetzten Antikörpern bei der Pathogenese psoriasiformer Hautläsionen.

Andere Studien vermuten, dass eine durch Anti-TNF-Therapie veränderte Lymphozyten-Migration durch CXCR3-Expression zu psoriasiformen Hautveränderungen beitragen könnte [228].

Alle Patienten mit psoriasiformen Hautläsionen sprachen in der Studie unserer Arbeitsgruppe gut auf die Therapie mit dem Anti-IL-12/IL-23-Antikörper Ustekinumab an, der sich sowohl

gegen Th1- als auch gegen Th17-Zellen richtet. Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte eine detaillierte histologische Analyse der Hautveränderungen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sich die betreffenden psoriasiformen Hautläsionen durch ein charakteristisches Bild aus einer erhöhten Zahl an IFN- γ produzierenden Th1-Zellen und IL-17A/IL-22-sezernierenden Th17-Zellinfiltraten auszeichnen [192].

Damit ergeben sich Ähnlichkeiten zum Zytokin-Profil der „echten“ Psoriasis vulgaris. Auch hier konnte eine erhöhte Expression der Th17-Zytokine IL-17A und IL-22 gezeigt werden [229,230]. Demnach scheint es Ähnlichkeiten in der Pathogenese der Psoriasis und Anti-TNF-induzierter, psoriasiformer Hautläsionen zu geben.

Eine erhöhte IL-17A-Expression konnte signifikant öfter in den sehr schweren Formen der Psoriasis-ähnlichen Hautläsionen detektiert werden, welche eine Ustekinumab-Therapie nötig machten. Seltener fand sich die verstärkte Expression von IL-17A bei Läsionen, die auf topische Therapie ansprachen [192]. Zwei vor Kurzem veröffentlichte Studien konnten zeigen, dass eine Therapie mit Antikörpern, die sich gegen IL-17A oder seinen Rezeptor IL-17RA richten, wirksam in der Behandlung der Psoriasis ist [231,232]. Neben IL-17A spielt auch IL-22 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis [229,233]. Letzteres verstärkt die Expression von proinflammatorischen Genen in Keratinozyten [234]. Klinische Studien zur Erprobung von Fezakinumab, einem Antikörper, der sich gegen IL-22 richtet, sind aktuell noch nicht abgeschlossen.

Aus den Ergebnissen der histologischen Analyse unserer Arbeitsgruppe folgt die Vermutung, dass Th1- und Th17-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese Anti-TNF-induzierter Hautläsionen spielen. Weitere Studien mit größeren Fallzahlen sind jedoch nötig um diese Hypothese zu bestätigen.

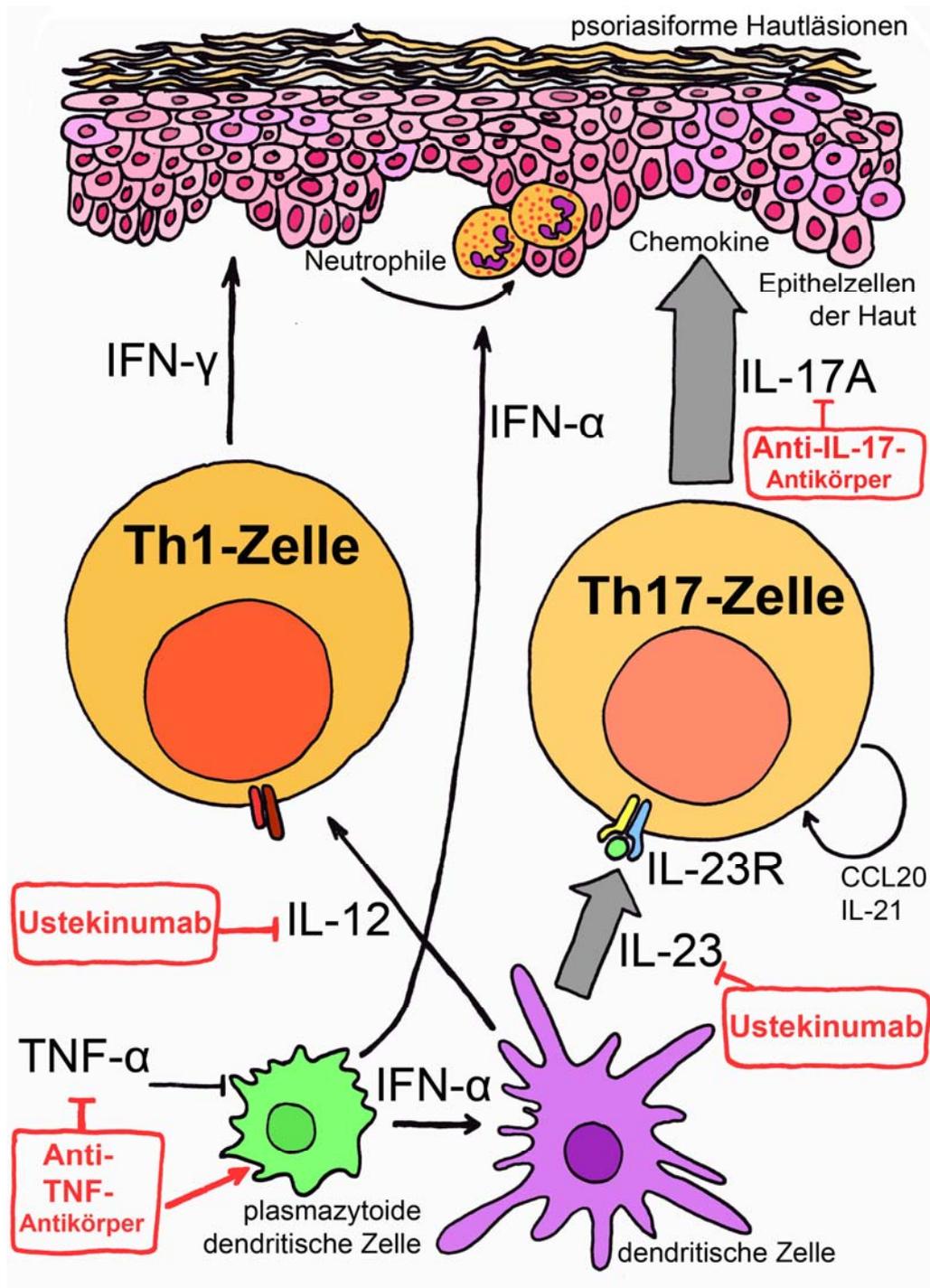


Abbildung 18. Die Pathogenese Anti-TNF-induzierter psoriasiformer Hautläsionen. Dargestellt sind Zellen und Zytokine, die an der Entstehung der Hautveränderungen beteiligt zu sein scheinen. Zudem sind die Angriffspunkte verschiedener Antikörper und ihr möglicher Einfluss gezeigt (in rot).

Aktuell ist Ustekinumab in Europa, den USA und Kanada nur für Psoriasis zugelassen. Zur Therapie des M. Crohn kam es bisher nur in klinischen Studien zum Einsatz [211,212]. Erste Studien belegen wie oben beschrieben auch einen positiven Effekt von Ustekinumab auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen [213]. In unserer Studie zu psoriasiformen Hautläsionen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte bei allen

Patienten eine rasche Verbesserung der Hautveränderungen nach den ersten zwei Injektionen von Ustekinumab beobachtet werden. Zudem konnte durch den Einsatz von Ustekinumab die Entzündungsaktivität von M. Crohn mindestens konstant gehalten werden. Höchstwahrscheinlich ist aber zur Therapie von M. Crohn eine höhere Dosis von Ustekinumab nötig als zur Behandlung der Hautläsionen. Diese Vermutung wird derzeit in Studien untersucht.

Eine Hemmung von IL-23 reduziert die IL-17A- und IL-22-Produktion und die Th17-induzierte Haut- und Darminfektion. Inhibiert man IL-12, führt dies zu reduzierter Th1-induzierter IFN- γ -Expression. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen von Patienten mit Psoriasis-ähnlichen Läsionen, der Schwere der Hautveränderungen und der hohen Entzündungsaktivität des M. Crohn (bzw. der C. ulcerosa) bei der Mehrzahl der Betroffenen wurde im Rahmen unserer Studie auf eine Unterbrechung der Anti-TNF-Therapie verzichtet [192]. Dennoch vermuten Rahier et al., dass ein Beenden der Anti-TNF-Therapie bei vielen Patienten wirksam wäre [218]. Bei einem Patienten in der Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gegen Ende des Ustekinumab-Injektions-Intervalls ein Wiederaufflammen der Hautläsionen beobachtet werden. Daher muss angenommen werden, dass wenigstens bei einigen Patienten eine Unterbrechung der Anti-TNF-Therapie nicht ausreicht, um die psoriasiformen Hautläsionen zum Abheilen zu bringen [192].

Angesichts des hier gezeigten hervorragenden Ansprechens der psoriasiformen Hautläsionen auf die Anti-IL-12/IL-23-Therapie kann davon ausgegangen werden, dass Ustekinumab eine sinnvolle Alternative zur gewohnten Anti-TNF-Therapie bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Anti-TNF-induzierten Hautläsionen darstellt. Es sind jedoch auch hier weitere Studien mit größeren Fallzahlen nötig, um diese Vermutung zu bestätigen.

Eine Assoziation von *IL12B*- und *IL23R*-SNPs mit weiteren Autoimmunerkrankungen ist bekannt. Die Etablierung einer Anti-IL12/IL-23-Therapie wäre demnach auch für diese von Bedeutung. Dabei gibt es auch Ansätze einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen p19. Eine spezifische Blockade von IL-23 durch einen monoklonalen Antikörper gegen p19 stellte sich im Colitis-Mausmodell als effektiv heraus [235]. Zu überprüfen bleibt, ob diese Therapieoption auch beim Menschen erfolgversprechend ist.

In einem Mausmodell für Multiple Sklerose, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), konnte ebenfalls die Wirksamkeit eines IL-23/p19-spezifischen Antikörpers gezeigt werden. Eine Therapie, die sich gezielt gegen IL-23 richtet, erweist sich also wirksam gegen autoimmune Entzündungsprozesse im ZNS [236].

6.1.5 Funktionelle Konsequenzen von *IL12B*-SNPs in der *in silico*-Analyse

Bisher ist unklar, welcher der *IL12B*-SNPs die „wahre“ krankheitsverursachende Variation darstellt. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eine detaillierte *in silico*-Analyse von *IL12B*-Genvarianten durchgeführt und mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen betrachtet. Für rs6887695 konnte unter den vier analysierten *IL12B*-Polymorphismen die größte Wahrscheinlichkeit für Veränderungen der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen gezeigt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Genotypisierungs-Analyse überein, in der nur rs6887695 mit einer generellen Suszeptibilität für chronisch entzündliche Darmerkrankungen assoziiert war. Ferner zeigt sich eine potenzielle Epistasie mit *STAT4*-SNPs.

Für rs6887695 prognostizierte die *in silico*-Analyse Veränderungen im Bindungsverhalten der Transkriptionsfaktoren HSF1, HSF2, MZF1, Oct-1 und ROR α . HSF1 spielt im Mausmodell der *dextran-sulfate-sodium*(DSS)-induzierten Colitis eine protektive Rolle [237].

MZF1 und Oct-1 sind Transkriptionsregulatoren von SERPINA3 [238,239], das als eines der vom Epithel exprimierten Gene bei der antibakteriellen Abwehr eine wichtige Rolle spielt [240].

Zusätzlich geht die *in silico*-Analyse von einer stärkeren Bindung des Transkriptionsfaktors ROR α an das Minor-C-Allel aus. Interessant ist, dass ROR α zusammen mit ROR γ t eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Th17-Zellen spielt. Th17-Zellen sind an der Pathogenese von M. Crohn und C. ulcerosa unmittelbar beteiligt [47]. Dieser Zusammenhang könnte die Assoziation von rs6887695 mit einer erhöhten CED-Suszeptibilität erklären, welche im Rahmen der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnte. Obwohl die Gruppe der Th17-Zellen als proinflammatorische T-Zell-Population gilt, können ihre Haupteffektor-Zytokine IL-17A und IL-22 unter bestimmten Bedingungen auch eine protektive Funktion übernehmen [137,241,242,243,244].

Weitere Studien deuten darauf hin, dass ROR α nicht nur proinflammatorische Effekte zuzuschreiben sind, sondern dass ROR α auch als negativer Regulator von Entzündungsantworten fungiert [245]. Beispielsweise inhibiert ROR α beim Menschen die TNF- α -induzierte IL-6-, IL-8- und COX-2- Expression in glatten Muskelzellen. Über eine reduzierte p65-Translokation wirkt ROR α negativ auf den NF- κ B-Signalweg [245].

Diese Erkenntnisse könnten im Zusammenhang mit den Ergebnissen unserer Genotyp-Phänotyp-Analyse stehen. In dieser präsentierte sich ein weniger schwerer Krankheits-Phänotyp für homozygote Träger des Minor C-Allels des *IL12B*-SNPs rs6887695. M. Crohn-

Patienten, die homozygote C/C-Träger dieses Polymorphismus waren, hatten signifikant häufiger eine nicht-stenosierende, nicht-penetrierende Erkrankung als Träger des G-Allels ($p=6,8 \times 10^{-5}$), und C/C-homozygote C. ulcerosa-Patienten hatten seltener eine ausgedehnte C. ulcerosa als Träger des G-Allels ($p=0,029$).

IL12B ist ein weiteres Beispiel für ein gemeinsames Suszeptibilitätsgen für M. Crohn und C. ulcerosa. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse unserer Studie unterstützt, welche eine Tendenz für rs6887695 für eine Assoziation sowohl mit M. Crohn als auch mit C. ulcerosa zeigen. Von den aktuell 163 bekannten CED-Suszeptibilitätsgenloci gibt es mindestens 110 Suszeptibilitätsloci, die für beide Entitäten prädisponieren [86,112,113]. Dabei fällt auf, dass sich unter den am stärksten assoziierten M. Crohn- und C. ulcerosa-Suszeptibilitätsloci eine Reihe von Genen befindet, die mit dem IL-23/Th17-Signalweg in Verbindung stehen, darunter *IL12B* [66]. Ähnlich wie *IL23R* ist auch *IL12B* ein mit weiteren CED-assoziierten Erkrankungen geteiltes Suszeptibilitätsgen. Dazu gehören die Psoriasis [143] und die Spondylitis ankylosans [145]. Die Wechselbeziehung könnte eine Erklärung für die gesteigerte Inzidenz dieser extraintestinalen Manifestationen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen darstellen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass *IL12B*-Varianten im Gegensatz zu Th17-Zell-modifizierenden und stark mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten *IL23R*-Genvarianten in der deutschen Bevölkerung eine geringere Rolle in der Suszeptibilität zu M. Crohn und C. ulcerosa spielen. Das legt nahe, dass IL-23R-exprimierenden Th17-Zellen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine größere Bedeutung zukommt als Th1-Zellen. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse großer GWAS [112,113,124] unterstützt, in denen sich ebenfalls eine stärkere Assoziation von *IL23R* mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigte als für *IL12B*-Genvarianten. Dennoch identifizierten die GWAS *IL12B* eindeutig als CED-Suszeptibilitätsgen.

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte *IL12B in silico*-Analyse und die Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analyse lassen vermuten, dass rs6887695 mit hoher Wahrscheinlichkeit ein CED-assoziiertes Polymorphismus ist. Homozygote C/C-Träger dieses SNPs waren gegen stenosierende und penetrierende Formen von M. Crohn geschützt und zeigten seltener ausgedehnte Formen der C. ulcerosa. Dem mag die Veränderung im Bindungsverhalten diverser Transkriptionsfaktoren (darunter ROR α) zugrunde liegen, wie auch unsere *in silico*-Analyse vorhersagte.

Für rs6887695 konnte eine mögliche Epistasis mit *STAT4* gezeigt werden. Da *STAT4* den wichtigsten *downstream* lokalisierten Transkriptionsfaktor von IL-12 kodiert, würde dies

erstmalig eine Verbindung auf der Ebene der Genetik zwischen IL-12 und STAT4 herstellen. Eine schematische Darstellung der IL-12-vermittelten Signaltransduktion und des Zusammenhangs mit STAT4 ist Abbildung 19 zu entnehmen.

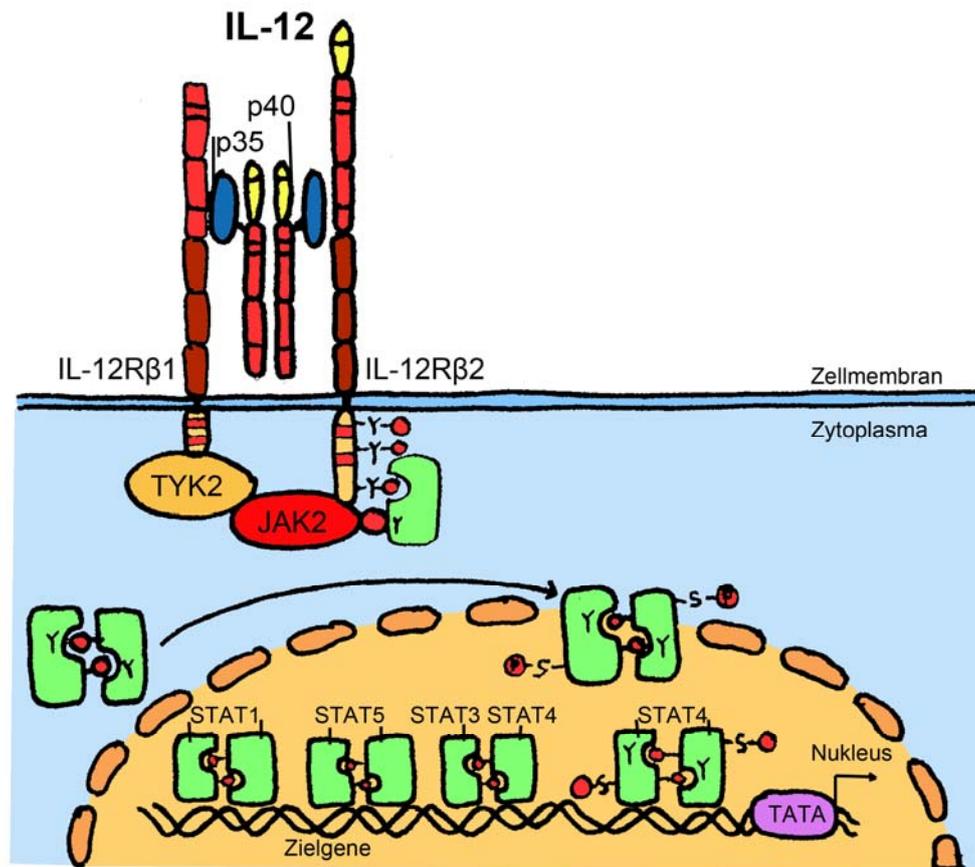


Abbildung 19. Der IL-12-Rezeptor und zugehörige Wege der Signaltransduktion. Die Signaltransduktion des IL-12-Rezeptors induziert die Tyrosin-Phosphorylierung der Janus-Kinasen JAK2 und TYK2, die im Gegenzug STAT1 (= *signal transducer and activator of transcription 1*), STAT3, STAT4 und STAT5 phosphorylieren. Spezifische Effekte auf zellulärer Ebene entstehen hauptsächlich durch die IL-12-vermittelte STAT4-Aktivierung. Eigene Grafik auf der Grundlage von [132].

Ähnlich der Assoziation des *STAT4*-SNPs rs7574865 mit Kolon-Befall [187], fand sich eine Assoziation des *IL12B*-SNPs rs3212227 mit einem erhöhten Risiko für einen Kolonbefall bei M. Crohn. Basierend auf der Gen-Gen-Interaktion, die in der vorliegenden Studie für *IL12B* und *STAT4* gezeigt werden konnte, sollten große Meta-Analysen (beispielsweise durch das *International IBD Genetics Consortium*), die auch hier gezeigte Daten einschließen könnten, die mögliche Epistasie zwischen den Hauptsuszeptibilitätsgenen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen detaillierter untersuchen. Diese Gen-Gen-Interaktion könnte ein zentraler Pathomechanismus bei der Pathogenese der Erkrankungen sein. Außerdem bedarf es einer Erstellung von detaillierten „Genkarten“ (*fine mapping*) und funktioneller Studien um die „wahren“, krankheitsverursachenden *IL12B*-Varianten und deren pathogenetische Rolle bei der CED-Suszeptibilität zu identifizieren.

6.2 Die Rolle des *PTPN2*-Gens bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

6.2.1 *PTPN2* als gemeinsames Suszeptibilitätsgen von M. Crohn und C. ulcerosa

Die vorliegende Studie an einer großen deutschen CED-Kohorte konnte bestätigen, dass es sich bei *PTPN2* um ein Suszeptibilitätsgen sowohl für M. Crohn, als auch für C. ulcerosa handelt. *PTPN2* reiht sich somit in die Zahl der bisher 163 entdeckten Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen ein, von denen mindestens 110 mit beiden Entitäten assoziiert sind [86,112,113]. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Erkenntnisse verschiedener Studien, in denen eine Assoziation von *PTPN2* mit M. Crohn gezeigt worden war [65,113,124,183]. Eine erst kürzlich von Anderson et al. publizierte Meta-Analyse beschreibt eine Assoziation von *PTPN2*-SNP rs1893217 mit C. ulcerosa und legt die Vermutung nahe, dass es sich bei *PTPN2* um ein Suszeptibilitätsgen sowohl für M. Crohn, als auch für C. ulcerosa handelt [112]. Diese Annahme stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Der *PTPN2*-Polymorphismus rs1893217, für den eine Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte [112,113], ist in vollständigem Kopplungsungleichgewicht mit dem *PTPN2*-SNP rs2542151, der in dieser Arbeit ebenfalls analysiert wurde. Eine kleinere Analyse aus Neuseeland konnte eine Assoziation von *PTPN2* mit M. Crohn zeigen, nicht aber vom verwandten Gen *PTPN22* [246]. Weitere Studien an einer italienischen [247] und einer niederländisch-belgischen Kohorte [202] konnten *PTPN2* ebenfalls als Suszeptibilitätsgen für M. Crohn bestätigen.

6.2.2 Die krankheitsmodifizierende Rolle von *PTPN2* für M. Crohn und C. ulcerosa

Verschiedene Studien vermuten für *PTPN2*-Genvarianten eine krankheitsmodifizierende Rolle. Die Genotyp-Phänotyp-Analyse von Morgan et al. an den Daten einer neuseeländischen Kohorte beispielsweise ergab einen Zusammenhang zwischen dem *PTPN2*-Polymorphismus rs2542151 und hohem Alter (> 40 Jahre) bei Erstdiagnose. Außerdem wurde eine Assoziation dieses SNPs mit entzündlichem und penetrierendem Verhalten, sowie mit der Notwendigkeit einer Darmresektion und einer positiven Raucheranamnese offengelegt [246]. Eine kanadische Studie konnte einen Zusammenhang des *PTPN2*-SNP rs2542151 mit Kolon-Befall bei M. Crohn (p=0,016) zeigen [248].

Durch eine ausführliche Genotyp-Phänotyp-Analyse ließ sich auch im Rahmen der vorliegenden Studie eine Assoziation des *PTPN2*-SNP rs7234029 mit einem Stenosenbildenden Phänotyp bei M. Crohn-Patienten nachweisen ($p=6,62 \times 10^{-3}$; OR=1,61 [1,14-2,27]). Zugleich konnte gezeigt werden, dass rs7234029 und rs2542151 mit dem Alter bei Erstdiagnose assoziiert sind. Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur verloren die meisten dieser Assoziationen jedoch ihre Signifikanz, was gegen eine spezifische krankheitsmodifizierende Rolle von *PTPN2* spricht, wie sie für *NOD2* gezeigt werden konnte. In Anbetracht der Tatsache, dass *PTPN2* prädisponierend sowohl für M. Crohn als auch für *C. ulcerosa* wirkt, liegt die Vermutung nahe, dass eine Assoziation mit vorwiegender Entzündungslokalisation im Kolon existiert. Es gab jedoch in der hier durchgeführten Genotyp-Phänotyp-Analyse keinerlei Anhaltspunkte für einen derartigen Zusammenhang.

6.2.3 Die Gen-Gen-Interaktion von *PTPN2* mit den wichtigsten CED-Suszeptibilitätsgenen *NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*

In der Epistasis-Analyse untersuchten wir die Gen-Gen-Interaktion zwischen *PTPN2* und den drei Hauptsuszeptibilitätsgenen für M. Crohn (*NOD2*, *IL23R* und *ATG16L1*). Für diese Gene konnte in einer kürzlich erschienenen GWAS die stärkste Assoziation unter allen bis dahin 71 identifizierten Risikogenen für M. Crohn gezeigt werden [113]. Sowohl *PTPN2* als auch *IL23R* prädisponieren für verschiedene Autoimmunerkrankungen. Dennoch konnte keine Epistasis zwischen den beiden Genen nachgewiesen werden.

IL23R ist nicht nur mit M. Crohn und *C. ulcerosa* assoziiert [113,114], sondern auch mit Psoriasis [143], Spondylitis ankylosans [66] und M. Behçet [249]. Für *PTPN2* wurde eine Assoziation mit juveniler idiopathischer Arthritis [173], rheumatoider Arthritis und Zöliakie [113,176] ebenso nachgewiesen wie für Diabetes Typ 1 [174,183] und M. Basedow [174]. Diese genetischen Zusammenhänge sind eine mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten mehrerer verschiedener Autoimmunerkrankungen bei CED-Patienten.

Autophagie ist ein wichtiger homöostatischer Prozess, der in allen eukaryotischen Zellen stattfindet und bei dem es zum geordneten Abbau der Zellbestandteile durch die Zelle selbst kommt. Zytoplasmatische Bestandteile wie Zellorganellen, Proteine und Pathogene werden in Membranvesikeln, sogenannten Autophagosomen, sequestriert und zu den Lysosomen zum Abbau transportiert. Die Autophagie (oder Autophagozytose) dient dem Gleichgewicht zwischen der Produktion neuer und dem Abbau alter Zellbestandteile, ermöglicht den Abbau von Bakterien, Viren und Fremdeiweißen, die sich in der Zelle anhäufen, und spielt eine Rolle

bei der Antigen-Präsentation sowie bei der Entwicklung von Lymphozyten. Damit trägt die Autophagie maßgeblich zur Regulation der Immunantwort bei. Zunehmend werden genetische Zusammenhänge zwischen Autophagie-Genen und einer Suszeptibilität zu infektiösen und entzündlichen Erkrankungen identifiziert. So konnten GWAS eine Assoziation von SNPs in Autophagie-regulierenden-Genen wie *ATG16L1*, *IRGM* und *NOD2* mit einem erhöhten M. Crohn-Risiko zeigen [65,115,119,124,250,251].

Interessant war vor allem der Zusammenhang, welcher in unserer Epistasis-Analyse zwischen dem *PTPN2*-SNP rs2542151 und dem *ATG16L1*-SNP rs2241879 ($p=0,024$) in der M. Crohn-Kohorte und zwischen dem *ATG16L1*-SNP rs4663396 und dem *PTPN2*-SNP rs7234029 ($p=4,68 \times 10^{-3}$) in der *C. ulcerosa*-Kohorte nachgewiesen werden konnte. Nach Bonferroni-Korrektur ging dieser jedoch verloren. Vorausgegangene Arbeiten, darunter auch Studien unserer eigenen Arbeitsgruppe, geben Hinweise darauf, dass Autophagie-Gene wie *ATG16L1* und *IRGM* eine wichtige Rolle bei der Suszeptibilität des M. Crohn, nicht jedoch bei der Suszeptibilität von *C. ulcerosa* spielen. Betrachtet man nun die Epistasis zwischen dem *ATG16L1*-SNP rs4663396 und dem *PTPN2*-SNP rs7234029 in der *C. ulcerosa*-Kohorte, lässt unsere Studie Rückschlüsse zu, dass Autophagie-Gene - in Kombination mit „echten“ Suszeptibilitätsgenen wie *PTPN2* - auch eine Rolle bei der Suszeptibilität mit *C. ulcerosa* spielen könnten. Die eher schwache Epistasis beider Gene bedarf jedoch der Bestätigung in größeren Replikationsstudien.

Angesichts aktueller Erkenntnisse, dass *PTPN2* die Autophagosomen-Bildung in menschlichen Darmepithelzellen reguliert [171], gewinnt die mögliche Epistasis zwischen *PTPN2* und *ATG16L1* noch mehr an Bedeutung. Scharl et al. konnten zeigen, dass ein *knockdown* von *PTPN2* in fehlerhafter Autophagosomen-Bildung und dysfunktioneller Autophagozytose resultiert [171]. Dies führte zu gesteigerten intrazellulären Spiegeln von *Listeria monocytogenes* und demzufolge zu einer gesteigerten Apoptose von Darmepithelzellen als Antwort auf TNF- α und IFN- γ [171].

Ähnliche Ergebnisse konnten für Fibroblasten der Lamina propria des Kolons gefunden werden, die von M. Crohn-Patienten isoliert worden waren, welche Träger des M. Crohn-assoziierten *PTPN2*-SNP rs2542151 sind [171]. Dieser Polymorphismus ist der in unserer Studie am stärksten mit M. Crohn assoziierte SNP. In der von Scharl et al. durchgeführten Studie, schützte das Vorhandensein des M. Crohn-assoziierten *ATG16L1*-SNP rs2241880 vor der TNF- α /IFN- γ -vermittelten Steigerung der *PTPN2*-Protein-Expression, welche zu fehlerhafter Autophagosomenbildung führte [171]. Intestinale Biopsien von Crohn-Patienten, die entweder mit M. Crohn assoziierte *ATG16L1*-oder *PTPN2*-SNPs aufwiesen, zeigten

unterschiedliche Expressionsmuster von LC3B, einem Marker für Autophagie-Membranen [171]. Aus diesem Grunde vermuteten Scharl et al., dass eine kombinierte fehlerhafte Funktion beider M. Crohn-Suszeptibilitätsgene *PTPN2* und *ATG16L1* zur Pathogenese von M. Crohn beitragen könnte [171]. Unsere Ergebnisse, die eine Epistasie zwischen den beiden M. Crohn-assoziierten Genen *PTPN2* und *ATG16L1* zeigen konnten, unterstützen diese Hypothese. Außerdem gibt es Beweise, dass *PTPN2* die Muramyl-Dipeptid(MDP)-induzierte Autophagosomenbildung reguliert [252]. Durch diese Experimente wird offengelegt, dass die M. Crohn-assoziierte *PTPN2*-Variante rs1893217 zu einer gestörten Autophagozytose führt [252]. Betrachtet man die Tatsache, dass *ATG16L1* und der MDP-Rezeptor *NOD2* während des Prozesses der Autophagie interagieren [253], könnten M. Crohn-assoziierte *PTPN2*-Polymorphismen das M. Crohn-Risiko erhöhen, indem sie die *ATG16L1*-/*NOD2*-vermittelte Autophagozytose beeinflussen.

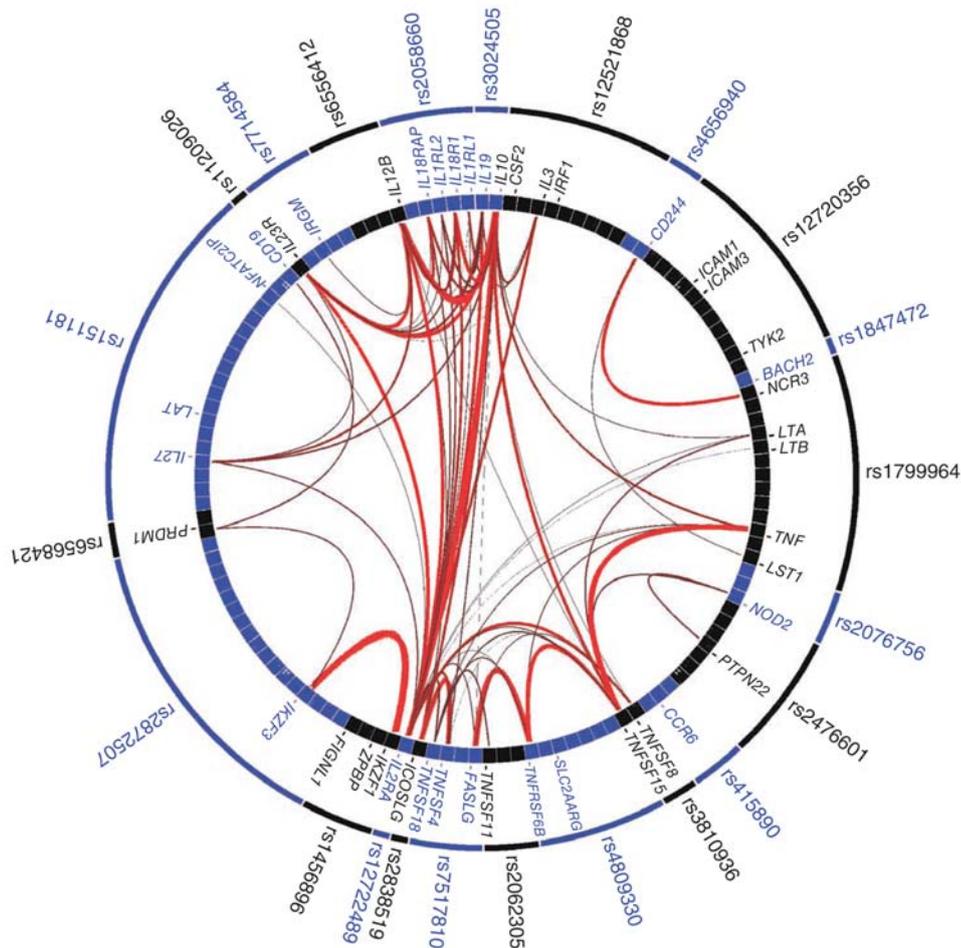


Abbildung 20. Zusammenhänge zwischen ausgewählten M. Crohn-Suszeptibilitäts-Genen, GRAIL-Analyse, Darstellung aus [113].

Eine von Franke et al. durchgeführte GRAIL-Analyse konnte zudem einen „Link“ zwischen dem *PTPN2*-verwandten Gen *PTPN22* und *NOD2* feststellen [113]. Abbildung 20 gibt die graphische Darstellung der GRAIL-Analyse wieder. Dennoch gelang es nicht, auf genetischer Ebene eine Gen-Gen-Interaktion zwischen *PTPN2* und den drei wichtigsten M. Crohn-assoziierten *NOD2*-Varianten p.Arg702Trp (rs2066844), pGly908Arg (rs2066845) und p.Leu1007fsX1008 (rs2066847) nachzuweisen. Weitere Studien vermuten, dass *PTPN2* generell eine protektive Rolle im Darm spielt, indem es den IFN- γ -induzierten Signalweg beeinflusst, daraus folgende Barrieredefekte limitiert [46] und indem es die TNF- α -Antwort moduliert [254].

6.2.4 Funktionelle Konsequenzen von *PTPN2* in der *in silico*-Analyse

Um mögliche funktionelle Konsequenzen der *PTPN2*-SNPs, welche die CED-Suszeptibilität modulieren, genauer zu untersuchen, wurde eine *in silico*-Analyse durchgeführt. Der Schwerpunkt lag auf potenziellen Veränderungen der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Im Rahmen der *in silico*-Analyse konnte gezeigt werden, dass der *PTPN2*-SNP rs7234029 die Bindungsstellen diverser Transkriptionsfaktoren moduliert, darunter GATA-3, NF- κ B, C/EBP und E4BP4. Für diese konnte ein Einfluss auf Entzündungsprozesse nachgewiesen werden [255,256,257,258].

GATA-3 ist einer der Transkriptionsfaktoren, die bei der Differenzierung von Th2-Zellen von großer Bedeutung sind [255]. Th2-Zellen spielen wiederum eine grundlegende Rolle bei der Pathogenese von *C. ulcerosa*.

NF- κ B sorgt für die Hochregulation der Genexpression vieler proinflammatorischer Zytokine darunter auch IL-12 [256].

C/EBP wird zusammen mit NF- κ B durch eine Signalvermittlung via *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) aktiviert, welche auf pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs) oder wirtseigene *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) reagieren. Beide Transkriptionsfaktoren spielen daher eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen.

E4BP4 ist für die Entwicklung Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und CD8 α + dendritischer Zellen unerlässlich. Es spielt ferner eine Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen, bei der Polarisierung von CD4+ T-Zell-Antworten und beim B-Zell-Klassenwechsel zu IgE [257]. Interessant ist, dass E4BP4 möglicherweise auch die IL-12-Expression moduliert [258], welche eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von M. Crohn spielt.

Die vorhergesagte Bindungswahrscheinlichkeit der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, C/EBP und E4BP4 war für das M. Crohn-assoziierte Minor-Allel des *PTPN2*-SNPs rs7234029 stärker als für das protektive Major-Allel. Dies lässt vermuten, dass ein höheres M. Crohn-Risiko teilweise durch eine stärkere Aktivierung dieser proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren moduliert wird.

Bei der *in silico*-Analyse handelt es sich um ein rein theoretisches Verfahren. Die computergenerierten Daten geben erste Hinweise darauf, inwieweit das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden könnte. Da sich in der vorliegenden *in silico*-Analyse deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten zeigten, ist eine experimentelle Überprüfung vielversprechend. Sie sollte zur Bestätigung der Vermutungen erfolgen. Auch vor dem Hintergrund diverser Studien, die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) eine Rolle als wichtigem negativen Regulator der Entzündungsreaktion zuweisen konnten, wäre eine weitere Untersuchung der PTPs und funktioneller Konsequenzen in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sinnvoll. Denn eine Hochregulation von PTPs könnte eine potenzielle Möglichkeit zur Kontrolle überschießender Immunreaktionen darstellen [170].

Zusammenfassend bestätigt sich *PTPN2* als gemeinsames Suszeptibilitätsgen für M. Crohn und *C. ulcerosa*. Die Genotyp-Phänotyp-Analyse konnte keinen eindeutigen Phänotyp identifizieren, der mit den untersuchten Polymorphismen assoziiert ist. Eine mögliche Assoziation von *PTPN2*-SNP rs7234029 mit einem stenosierenden Phänotyp bei M. Crohn-Patienten bedarf daher weiterer Bestätigung in einer größeren Kohorte oder durch Meta-Analysen. Aktuell werden diese durch das *Subphenotyping Committee* des *International IBD Genetics Consortium* organisiert.

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte *in silico*-Analyse prognostizierte, dass das erhöhte M. Crohn-Risiko durch rs7234029 mit einer vermehrten Aktivierung von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, C/EBP und E4BP4 vergesellschaftet sein könnte. Außerdem zeigt sich eine wahrscheinliche Interaktion zwischen *PTPN2* und *ATG16L1* bezüglich ihrer Suszeptibilität zu M. Crohn und *C. ulcerosa*. Dies muss jedoch aufgrund des eher schwachen Zusammenhangs weiter untersucht werden. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse einer vor Kurzem erschienenen funktionellen Studie, die eine maßgebliche Rolle für *PTPN2* in der Autophagosomenbildung humaner intestinaler Epithelzellen zeigen konnte [171]. Das gibt Hinweis darauf, dass verschiedene mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verbundene Signalwege zu gemeinsamen funktionellen Endpunkten wie etwa Autophagie zusammenlaufen könnten. In

der Folge ergibt sich bei den betroffenen Patienten eine erhöhte Suszeptibilität mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Die folgende Grafik (Abbildung 21) zeigt einen abschließenden Überblick über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene *IL12B* und *PTPN2* und deren Funktion in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Es handelt sich dabei um ein hypothetisches Modell mit einer stark vereinfachten Darstellung komplexer Signalwege, die im Rahmen dieser Dissertation detaillierter diskutiert wurden. Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cell*=APC) werden durch Darmpathogene aktiviert und sezernieren Zytokine, die zur Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen führen. Dabei induziert IL-12 insbesondere die Entwicklung von Th1-Zellen, die ebenso wie die unter IL-23-Einfluss entstehenden Th17-Zellen bei der Pathogenese des M. Crohn von Bedeutung sind. Th2-Zellen, die an der Krankheitsentstehung der C. ulcerosa beteiligt sind, differenzieren sich unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren GATA3 und STAT6. Die vorliegende *in silico*-Analyse konnte zeigen, dass *PTPN2* wahrscheinlich Einfluss auf das Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktors GATA3 hat. Zudem schreiben Scharl et al. in diversen Studien *PTPN2* eine entscheidende Rolle in der Regulierung der chronischen Entzündung zu. Bei einem *knockdown* von *PTPN2* nimmt die IFN- γ -induzierte Dephosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 zu [46]. *PTPN2* nimmt also vermutlich Einfluss auf STAT1 und STAT3. Eine Fehlfunktion von *PTPN2* scheint die Th1-Zell-Differenzierung ebenso wie die Th17-Zellentwicklung zu begünstigen. Zusätzlich ist *PTPN2*, ebenso wie *ATG16L1* am Prozess der Autophagie beteiligt. *PTPN2* spielt dabei insbesondere bei der Autophagosomen-Bildung eine wichtige Rolle [171]. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte hierzu eine schwache Gen-Gen-Interaktion der beteiligten Gene *PTPN2* und *ATG176L1* nachgewiesen werden. *IL12B* kodiert die p40-Untereinheit von IL-23 und IL-12. Beide Interleukine spielen eine Rolle bei der Differenzierung von T-Zellen. Die durchgeführte Epistasis-Analyse konnte erstmalig auf genetischer Ebene eine Interaktion zwischen *IL12B* und *STAT4* zeigen.

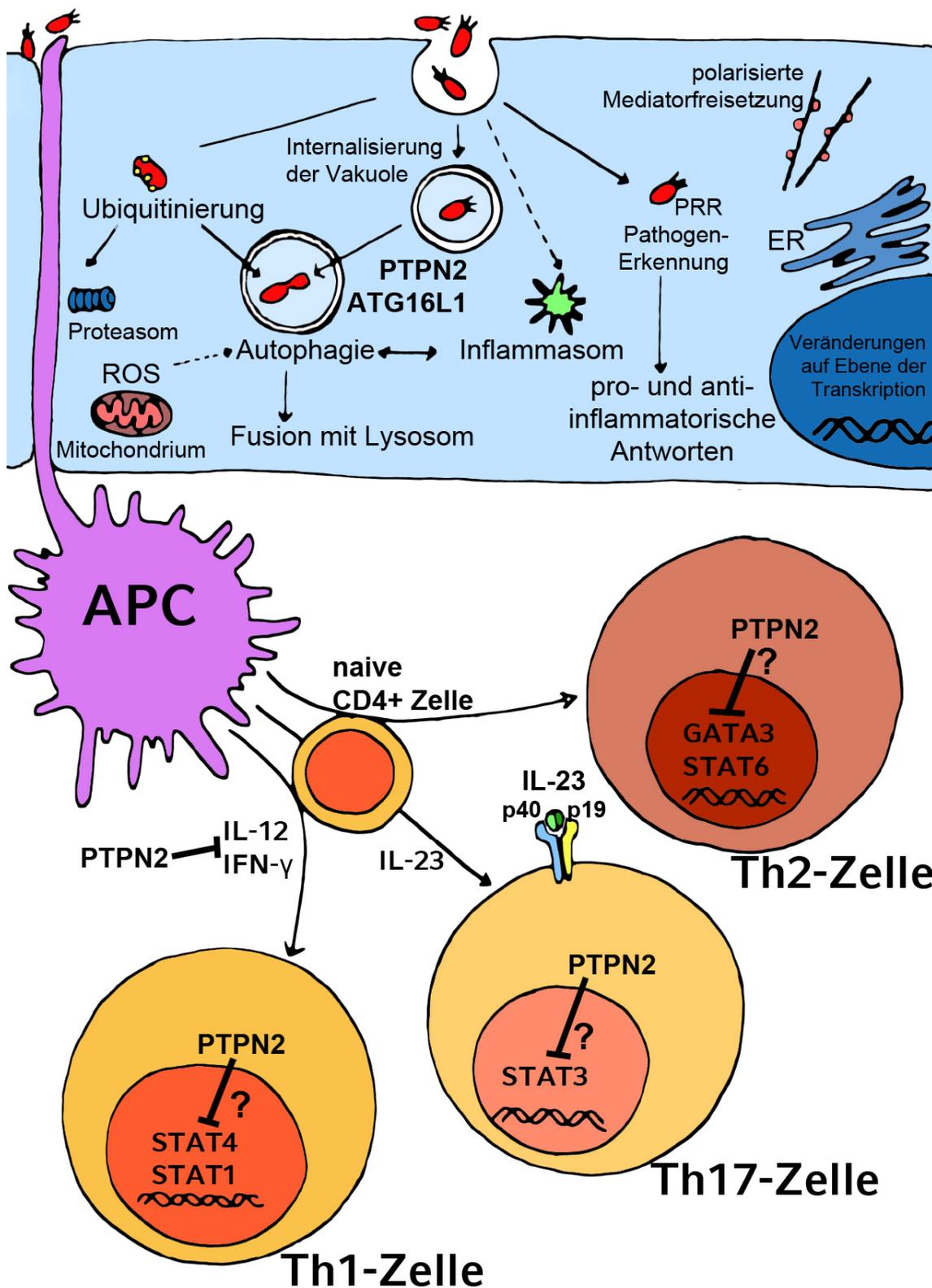


Abbildung 21. Hypothetisches Modell zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genen *IL12B* und *PTPN2* und der Funktion ihrer Genprodukte in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Vereinfacht dargestellt sind Funktionen des intestinalen Immunsystems, darunter intrazelluläre Programme zur Erkennung und Abwehr von pathogenen Keimen sowie Einflussfaktoren bei der Entwicklung von T-Zellen im intestinalen Immunsystem. Der genaue funktionelle Einfluss von *PTPN2* auf die jeweiligen weiteren Faktoren ist nach wie vor nicht ausreichend geklärt. Die grafische Darstellung beruht daher teilweise auf Hypothesen, welche weiterer Bestätigung bedürfen. Eigene Grafik auf der Grundlage von [51,66,87,172].

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von *IL12B*- und *PTPN2*-Polymorphismen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED). Ziel war es, die Bedeutung der *IL12B*-Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) rs3212227, rs6887695, rs10045431, rs17860508 und der *PTPN2*-SNPs rs2542151 sowie rs7234029 für M. Crohn und C. ulcerosa zu untersuchen. Dazu erfolgten an DNA-Proben einer großen deutschen Patienten-Kohorte für jeden Polymorphismus eine Genotypisierung, detaillierte Genotyp-Phänotyp-Analyse, Epistasis-Analyse sowie eine Haplotyp-Analyse. Um zu verifizieren, ob es im Zusammenhang mit den oben genannten SNPs auch zu Veränderungen des Bindungsverhaltens von Transkriptionsfaktoren und damit zum Einfluss auf die Genexpression kommt, wurde eine *in silico*-Analyse durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass sowohl *IL12B* als auch *PTPN2* in der deutschen Bevölkerung für chronisch entzündliche Darmerkrankungen prädisponieren. *IL12B* kodiert die p40-Untereinheit, die sowohl Teil von IL-12B als auch von IL-23 ist. Es zeigte sich, dass *IL12B*-Varianten im Gegensatz zu Th17-Zell-modifizierenden und stark mit CED assoziierten *IL23R*-Genvarianten in der deutschen Bevölkerung eine eher untergeordnete Rolle bzgl. der Suszeptibilität für M. Crohn und C. ulcerosa spielen. Das legt nahe, dass IL-23R-exprimierenden Th17-Zellen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine größere Bedeutung zukommt als Th1-Zellen.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Subanalyse, die den Einfluss von *IL12B*- und *IL23R*-Polymorphismen auf Anti-TNF-induzierte psoriasiforme Hautläsionen bei CED-Patienten untersuchte. Hier zeigte sich keine Assoziation der *IL12B*-SNPs aber Auffälligkeiten unter den *IL23R*-Polymorphismen. Das sehr gute Ansprechen der Hautveränderungen auf den Einsatz von Anti-IL-12/IL-23-Antikörpern, könnte auch wegweisend für neue Ansätze in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, insbesondere beim Vorliegen bestimmter *IL23R*-SNPs, sein.

Die *IL12B*-*in silico*-Analyse und die Ergebnisse der erstmaligen detaillierten Genotyp-Phänotyp-Analyse in Deutschland lassen vermuten, dass rs6887695 mit hoher Wahrscheinlichkeit ein krankheitsverursachender Polymorphismus ist. Homozygote C/C-Träger dieses SNPs waren gegen stenosierende und penetrierende Formen von M. Crohn geschützt und zeigten seltener ausgedehnte Formen der C. ulcerosa. Dem könnte, wie in unserer *in silico*-Analyse vorhergesagt, eine Veränderung im Bindungsverhalten diverser Transkriptionsfaktoren (darunter ROR α) zugrunde liegen.

Die vorliegenden Daten zeigen eine potenzielle Epistasie des *IL12B*-Gens (rs6887695) mit dem *STAT4*-Gen und stellen erstmalig auf Ebene der Genetik eine mögliche Verbindung zwischen IL-12 und STAT4 her. *STAT4* kodiert dabei den wichtigsten *downstream* lokalisierten Transkriptionsfaktor von IL-12. Zudem fand sich eine Assoziation des *IL12B*-SNPs rs3212227 mit einem erhöhten Risiko für einen Kolonbefall bei M. Crohn. Die Gen-Gen-Interaktion zwischen *IL12B* und *STAT4* könnte ein zentraler Mechanismus bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sein. Dies sollte im Rahmen größerer Meta-Analysen (beispielsweise durch das *International IBD Genetics Consortium*), die auch hier gezeigte Daten einschließen könnten, detaillierter untersucht werden. Außerdem bedarf es eines sogenannten *fine mappings* und funktioneller Studien um die „wahren“ krankheitsverursachenden *IL12B*-Varianten zu identifizieren und deren pathogenetische Rolle bei der CED-Suszeptibilität nachzuweisen.

Auch *PTPN2* bestätigt sich als Suszeptibilitätsgen für M. Crohn und C. ulcerosa. Die Genotyp-Phänotyp-Analyse konnte jedoch im Gegensatz zur *IL12B*-Analyse keinen eindeutigen Phänotyp identifizieren, der mit den untersuchten *PTPN2*-Polymorphismen assoziiert ist. Eine mögliche Assoziation des *PTPN2*-SNP rs7234029 mit einem stenosierenden Phänotyp bei M. Crohn-Patienten bedarf daher einer weiteren Bestätigung in einer größeren Kohorte oder durch Meta-Analysen. Aktuell werden diese durch das *Subphenotyping Committee* des *International IBD Genetics Consortium* organisiert.

Die *in silico*-Analyse prognostizierte, dass das erhöhte Crohn-Risiko durch *PTPN2*-SNP rs7234029 mit einer vermehrten Aktivierung von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, C/EBP und E4BP4 vergesellschaftet ist und zeigt eine wahrscheinliche Interaktion zwischen *PTPN2* und *ATG16L1* bezüglich ihrer Suszeptibilität für M. Crohn und C. ulcerosa. Dies sollte jedoch aufgrund des eher schwachen Zusammenhangs weiter untersucht werden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass diese Erkenntnisse die Ergebnisse einer vor Kurzem erschienenen funktionellen Studie unterstützen. Darin wird *PTPN2* eine maßgebliche Rolle in der Autophagosomenbildung humaner intestinaler Epithelzellen zugeschrieben. Es gibt also Hinweise darauf, dass verschiedene mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verbundene Signalwege zu gemeinsamen funktionellen Endpunkten wie etwa Autophagie zusammenlaufen könnten.

Eine Assoziation von *IL12B* und *PTPN2* mit weiteren Autoimmunerkrankungen ist bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind daher nicht nur in Bezug auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen relevant, sondern werden auch von Bedeutung für das allgemeine Verständnis von Autoimmunerkrankungen sein.

8 Abkürzungen und Begriffe

ANCA	anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
ASCA	anti-Saccharomyces-cervisiae Antikörper
ATG16L1	Autophagy-related protein 16L1
AZA	Azathioprin
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzgl.	bezüglich
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
<i>CTLA4</i>	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4-Gen
CU	Colitis ulcerosa
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii/ et aliae/ et alia lateinisch „und andere“
FACR	Fellow of the American College of Radiology
FRCR	Fellow of the Royal College of Radiologists
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GI	Gastrointestinaltrakt

GRAIL	Gene Relationships Across Implicated Loci
GWAS	Genome Wide Association Study = genomweite Assoziationsstudie
HLA	human leucocyte antigen
IL12B	Interleukin-12B
IL23R	Interleukin-23R
i.v.	intravenös
Kontr.	Kontrolle/n
ku	kilou, u ist dabei die atomare Masseneinheit und entspricht im amerikanischen Sprachgebrauch der Einheit Da=Dalton
lat.	lateinisch
LC	Light Cycler
LE	low electroendosmosis (LE-Agarose)
MAF	Minor-Allelfrequenz
MC	Morbus Crohn
MCP-1	macrophage chemoattractant protein 1
ml	Milliliter
6-MP	6-Mercaptopurin
n	Anzahl
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NLS	Nuclear localization sequence/signal
<i>NRG1</i>	Neuregulin 1-Gen
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OR	Odds Ratio
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> = Pathogen-assozierte molekulare Muster
pDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>

PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTPN2	Protein-Tyrosin-Phosphatase Non-Receptor Type 2
PTPN22	Protein-Tyrosin-Phosphatase Non-Receptor Type 22
Ref.	Referenz
ROR	<i>Retinoid-related orphan receptor</i>
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden (von engl. <i>seconds</i>)
SNP	Single Nucleotid Polymorphismus
spp.	lat. <i>species pluralis</i>
STAT	Signal Transduction and Activation of Transcription
Tbc	Tuberkulose
TBE	TBE-Puffer = TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCCR	T-cell cytokine receptor = T-Zell Zytokin-Rezeptor
TC-PTP	T-Zell Protein-Tyrosin-Phosphatase
Th	T-Helferzellen
TLR	toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u.a.	und andere
u.v.a.m.	und viele andere mehr
vgl.	vergleiche
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1. Charakteristika zur Unterscheidung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.	19
Tabelle 2. Demographische Daten der Studienpopulation.	48
Tabelle 3. Alter bei Diagnosestellung, Befallsmuster und klinisches Bild von M. Crohn kategorisiert nach der Montreal-Klassifikation. Modifiziert nach [29].	48
Tabelle 4. Maß der Krankheitsaktivität und Ausbreitung von C. ulcerosa eingeteilt nach der Montreal- Klassifikation für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	49
Tabelle 5. PCR-Materialien und PCR-Kits.	50
Tabelle 6. Primer für die quantitative PCR bei <i>IL12B</i>	50
Tabelle 7. Primer für die quantitative PCR bei <i>PTPN2</i>	51
Tabelle 8. Primer für die qualitative PCR bei <i>IL12B</i>	51
Tabelle 9. Primer für die qualitative PCR bei <i>PTPN2</i>	51
Tabelle 10. Hybridisierungssonden für <i>IL12B</i>	52
Tabelle 11. Hybridisierungssonden für <i>PTPN2</i>	52
Tabelle 12. Primer und Sonden für <i>IL23R</i>	52
Tabelle 13. Verbrauchsmaterialien.	53
Tabelle 14. Eingesetzte Geräte.	54
Tabelle 15. Im Rahmen der Experimente, Auswertungen und Ausarbeitung verwendete Software.	54
Tabelle 16. Reaktionsgemisch für die qualitative Polymerase-Kettenreaktion.....	55
Tabelle 17. Alternatives Reaktionsgemisch mit 5-Q-Lösung für die qualitative PCR.	55
Tabelle 18. Amplifikationsprotokoll der qualitativen PCR.	56
Tabelle 19. Rezeptur zur Herstellung eines Elektrophoresegels.	57
Tabelle 20. Rezeptur zur Herstellung des Elektrophoresepuffers.	57
Tabelle 21. Materialien für die Agarose-Gelelektrophorese.	57
Tabelle 22. Amplifikationsprogramm im Light-Cycler 480 (Roche).	58
Tabelle 23. Verwendete Reaktionsansätze für <i>IL12B</i>	59
Tabelle 24. Verwendete Reaktionsansätze für <i>PTPN2</i>	59

Tabelle 25. Assoziationen von <i>IL12B</i> -Polymorphismen mit M. Crohn und <i>C. ulcerosa</i> in der durchgeführten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie.	65
Tabelle 26. Assoziation von <i>IL12B</i> -Polymorphismen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	66
Tabelle 27. Assoziation von <i>PTPN2</i> -Polymorphismen mit M. Crohn und <i>C. ulcerosa</i> in der durchgeführten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie.	67
Tabelle 28. Assoziation von <i>IL12B</i> -Genmarkern mit der anatomischen Lokalisierung von M. Crohn eingeteilt nach Kriterien der Montreal Klassifikation [29].	68
Tabelle 29. Assoziation von <i>IL12B</i> -Polymorphismen mit der anatomischen Lokalisierung von <i>C. ulcerosa</i> eingeteilt nach Kriterien der Montreal Klassifikation [29].	68
Tabelle 30. Genotyp-Phänotyp-Analyse von SNP rs6887695 für Patienten mit M. Crohn....	69
Tabelle 31. Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analyse des <i>IL12B</i> -SNP rs6887695 bei Patienten mit <i>C. ulcerosa</i>	70
Tabelle 32. Genotyp-Phänotyp-Analyse zu <i>PTPN2</i> -SNP rs2542151 bei Patienten mit M. Crohn.....	71
Tabelle 33. Genotyp-Phänotyp-Analyse des <i>PTPN2</i> -SNPs rs7234029 in der Kohorte der M. Crohn-Patienten.....	72
Tabelle 34. Assoziation des <i>PTPN2</i> -SNP rs2542151 mit <i>C. ulcerosa</i> -Merkmalen.	73
Tabelle 35. Assoziation des <i>PTPN2</i> -SNPs rs7234029 mit <i>C. ulcerosa</i> -Merkmalen.....	74
Tabelle 36. Haplotypen von <i>IL12B</i> -SNPs in der M. Crohn-Fall-Kontroll-Gruppe und omnibus p-Werte für die Assoziation mit einer Suszeptibilität für M. Crohn.....	75
Tabelle 37. Haplotypen von <i>IL12B</i> -SNPs in der <i>C. ulcerosa</i> -Fall-Kontroll-Gruppe.	75
Tabelle 38. Frequenzen der Haplotypen bestehend aus den <i>PTPN2</i> -SNPs rs2542151 und rs7234029 in der M. Crohn Fall-Kontroll-Kohorte.....	76
Tabelle 39. Frequenzen der Haplotypen bestehend aus den <i>PTPN2</i> -SNPs rs2542151 und rs7234029 in der <i>C. ulcerosa</i> Fall-Kontroll-Kohorte.	76
Tabelle 40. Analyse der Gen-Gen-Interaktion zwischen <i>IL12B</i> - und <i>IL23R</i> - und <i>STAT4</i> -Varianten hinsichtlich ihrer Suszeptibilität zu M. Crohn.....	77
Tabelle 41. Ergebnisse der Epistasis-Analyse zwischen <i>PTPN2</i> -SNPs und Markern in den Genen <i>NOD2</i> , <i>IL23R</i> und <i>ATG16LI</i> in der M. Crohn Fall-Kontroll-Population.	78
Tabelle 42. Epistasis zwischen <i>PTPN2</i> -SNPs und Genmarkern, die im <i>NOD2</i> -, <i>IL23R</i> - und <i>ATG16LI</i> -Gen lokalisiert sind. Die Tabelle bezieht sich auf die <i>C. ulcerosa</i> Fall-Kontroll-Population.....	79
Tabelle 43. Klinische und demographische Daten der Patienten, die mit dem Anti-IL-12/IL-23-Antikörper Ustekinumab behandelt wurden.	82

Tabelle 44. Assoziationen der <i>IL12B</i> -SNPs mit psoriasiformen Hautläsionen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. MAF=Minor-Allelfrequenzen.	84
Tabelle 45. Überblick über mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Genregion, welche die analysierten <i>IL12B</i> -Polymorphismen rs6887695, rs10045431, rs17860508 und rs3212227 beherbergt.	85
Tabelle 46. Potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Genregion, die den <i>PTPN2</i> SNP rs7234029 beherbergt.	87
Tabelle 47. Überblick über die Assoziationssignale von <i>IL12B</i> im Vergleich zu den Assoziationssignalen von drei der am stärksten mit M. Crohn assoziierten Gene <i>NOD2</i> , <i>IL23R</i> und <i>ATG16L1</i> in der Münchner CED-Fall-Kontroll-Kohorte.	89
Tabelle 48. Überblick über die zu <i>IL12B</i> und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erschienenen Studien.	91
Abbildung 1. Verteilung des Entzündungsmusters bei M. Crohn (links) und C. ulcerosa (rechts).	14
Abbildung 2. Zwei Therapiestrategien im Vergleich: Step-up (links) versus Top-down (rechts).	24
Abbildung 3. Multifaktorielle Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.	27
Abbildung 4. Schema der intestinalen Barriere.	31
Abbildung 5. Suszeptibilitätsgene für M. Crohn und C. ulcerosa und ihre Funktion im mukosalen Immunsystem.	35
Abbildung 6. Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (schwarz), M. Crohn (rot) und C. ulcerosa (blau). Modifiziert nach [62].	36
Abbildung 7. Das Ungleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Zytokine beim M. Crohn. Eigene Darstellung auf der Grundlage von [43].	38
Abbildung 8. Die Entwicklung von T-Helfer(Th)1-, Th2-, Th17- und regulatorischen T(Treg)- Zellen aus naiven CD4+ Zellen. Eigene Grafik auf der Grundlage von [43].	39
Abbildung 9. Interaktionen zwischen den Zytokinen, die bei M. Crohn von Th17-Zellen, antigenpräsentierenden Zellen (APC) und intestinalen Epithelzellen freigesetzt werden.	41
Abbildung 10. Grafik zur Funktion von PTPs in der Zelle.	42
Abbildung 11. Diverse Studien belegen die Suszeptibilität von <i>PTPN2</i> auf Chromosom 18 mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Dies lässt auf einen engen Zusammenhang von Erkrankung und Genetik schließen.	45
Abbildung 12. Beispielbild zur Gelelektrophorese.	56
Abbildung 13. Schematische Darstellung des Fluorescence Resonance Energy Transfers (FRET):	61

Abbildung 14. Beispiel aus den originalen Versuchsdaten: Light-Cycler-Schmelzkurven und zugehörige Ableitungen für den <i>IL12B</i> -SNP rs17860508	62
Abbildung 15. Spektrum Anti-TNF-induzierter psoriasiformer Hautläsionen.	81
Abbildung 16. Anti-TNF-induzierte, palmoplantare, psoriasiforme Hautläsionen bei einer weiblichen Patientin mit M. Crohn.	83
Abbildung 17. Der IL-12-Rezeptor und zugehörige Wege der Signaltransduktion.	102
Abbildung 18. Schematische Darstellung der wichtigsten Vertreter der IL-12-Zytokinfamilie und ihrer Struktur.	94
Abbildung 19. Die Pathogenese Anti-TNF-induzierter psoriasiformer Hautläsionen.	98
Abbildung 20. Zusammenhänge zwischen ausgewählten M. Crohn-Suszeptibilitäts-Genen	106
Abbildung 21. Hypothetisches Modell zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene	110
Abbildung 22. Standardisierter Patientenfragebogen (Seite 1 von 2).....	120
Abbildung 23. Standardisierter Patientenfragebogen (Seite 2 von 2).....	121

10 Anhang

DIE GRAU UNTERLEGTEN FELDER NICHT AUSFÜLLEN!!

Name
 Vorname
 Adresse
 Datum

1.	Wann sind Sie geboren?	Geburtsdatum	
	Wie alt sind Sie?Jahre	Alter Jahre	
			0-16	<input type="checkbox"/>	A1
			17-40	<input type="checkbox"/>	A2
		>40	<input type="checkbox"/>	A3	

2.	Geschlecht	Geschlecht		
	Männlich	<input type="checkbox"/>	Männlich	<input type="checkbox"/>
	Weiblich	<input type="checkbox"/>	Weiblich	<input type="checkbox"/>

3.	Wie groß sind Sie? cm	Größe cm	BMI
	Wie viel wiegen Sie? kg	Gewicht kg	

4.	Wie alt waren Sie, als das erste Mal bei Ihnen M. Crohn oder Colitis ulcerosa diagnostiziert wurde? Jahre	Alter bei DiagnosestellungJahre	
	Seit wie langer Zeit leiden Sie unter dieser Krankheit? Jahre	0-16	<input type="checkbox"/>	A1
			17-40	<input type="checkbox"/>	A2
			>40	<input type="checkbox"/>	A3
			Krankheitsdauer Jahre	

5.	Kreuzen Sie jene an, die Sie mal genommen haben oder zur Zeit noch nehmen:	Immunsuppressive Medikamente		
	Azathioprin (Imurek, Azafalk, Zytrim, Azathiadura)	<input type="checkbox"/>	Azathioprin	<input type="checkbox"/>
	6-Mercaptopurin (Puri-Nethol, 6-MP)	<input type="checkbox"/>	6-Mercaptopurin	<input type="checkbox"/>
	6-Thioguanin (Thioguanin, Lanvis)	<input type="checkbox"/>	6-Thioguanin	<input type="checkbox"/>
	Methotrexat (Lantarel, MTX, Metex, Farnitrexat)	<input type="checkbox"/>	Methotrexat	<input type="checkbox"/>
	Infliximab (Remicade)	<input type="checkbox"/>	Infliximab	<input type="checkbox"/>
	Adalimumab (Humira)	<input type="checkbox"/>	Adalimumab	<input type="checkbox"/>

6.	Wurden Sie schon mal am Magen-Darm-Trakt operiert?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Chirurgischer Eingriff am Magen-Darm-Trakt	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Wenn ja, wo?		Wenn ja, wo?	
	Wurde Ihnen der Blinddarm entfernt?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Appendektomie	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

7.	Kreuzen Sie an, was Sie haben oder hatten:	Komplikationen				
	Fisteln (allgemein)	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Fisteln (allgemein)	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Perianale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Perianale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Entero-enterale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Entero-enterale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Entero-vesikale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Entero-vesikale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Entero-vaginale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Entero-vaginale	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Entero-kutane	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Entero-kutane	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>

8.	Haben Sie Stenosen?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Stenosen	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Wenn ja, wo?		Wenn ja, wo?	

Abbildung 22. Standardisierter Patientenfragebogen der in der vorliegenden Studie zur Abfrage phänotypischer Merkmale diente (Seite 1 von 2).

9.	Haben Sie Abszesse?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Abszesse	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Wenn ja, wo?		Wenn ja, wo?	
10.	Leiden Sie unter:			Extraintestinale Manifestationen		
	Nicht-medikamentoes induzierte Arthropathien	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Arthropathien	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Augenbeteiligung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Augenbeteiligung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Hautbeteiligung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Hautbeteiligung	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Nicht-medikamentoes induzierte Gallenkrankheit	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Gallenkrankheit	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
11.	Rauchen Sie?			Raucheranamnese		
	Ja	<input type="checkbox"/>		Ja	<input type="checkbox"/>	
	Nein	<input type="checkbox"/>		Nein	<input type="checkbox"/>	
	Ich habe geraucht	<input type="checkbox"/>		Ex	<input type="checkbox"/>	
	Wieviele Jahre?.....Wieviele Packung pro Tag?			Pack years		
12.	Leidet oder hat jemand in Ihrer Familie an M. Crohn oder Colitis ulcerosa gelitten?	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	Familienanamnese		
	Wenn ja, wer? (Mutter, Vater, ...)		Wenn ja, wer?	
<u>NUR AUSFÜLLEN, WENN SIE AN COLITIS ULCEROSA ERKRANKT SIND:</u>						
13.	Welche Abschnitte Ihres Darmes sind bei der Colitis ulcerosa befallen?			Krankheitslokalisation		
	Proctitis	<input type="checkbox"/>		Proctitis	<input type="checkbox"/>	L1
	Linksseitige Colitis	<input type="checkbox"/>		Linksseitige Colitis	<input type="checkbox"/>	L2
	Pancolitis	<input type="checkbox"/>		Pancolitis	<input type="checkbox"/>	L3
<u>NUR AUSFÜLLEN, WENN SIE AN MORBUS CROHN ERKRANKT SIND:</u>						
13.	Welche Abschnitte Ihres Darmes sind beim Morbus Crohn befallen?			Krankheitslokalisation		
	Terminales Ileum	<input type="checkbox"/>		Terminales Ileum	<input type="checkbox"/>	L1
	Colon	<input type="checkbox"/>		Colon	<input type="checkbox"/>	L2
	Ileocolon	<input type="checkbox"/>		Ileocolon	<input type="checkbox"/>	L3
	Oberer Magen-Darm-Trakt	<input type="checkbox"/>		Obere Magen-Darm-Trakt	<input type="checkbox"/>	L4
14.	Welche Komplikationen sind bei Ihnen aufgetreten?			Krankheitsverhalten		
	Keine Stenosen, keine Fisteln	<input type="checkbox"/>		Ø Stenosen, Ø Fisteln	<input type="checkbox"/>	B1
	Stenosen	<input type="checkbox"/>		Stenosen	<input type="checkbox"/>	B2
	Fisteln	<input type="checkbox"/>		Fisteln	<input type="checkbox"/>	B3
	Perianale Fistel	<input type="checkbox"/>		Perianale Fistel	<input type="checkbox"/>	p
BEMERKUNGEN:						

Abbildung 23. Standardisierter Patientenfragebogen, der in der vorliegenden Studie zur Abfrage phänotypischer Merkmale diente (Seite 2 von 2).

11 Danksagung

Allen voraus gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Stephan Brand, der mir nicht nur dieses Thema überlassen hat, sondern mich stets tatkräftig unterstützte und in seiner Begeisterung ein großes Vorbild war. Auch für die Gelegenheit, diese Arbeit auf zwei internationalen Kongressen in Barcelona und Chicago vorstellen zu dürfen, bedanke ich mich an dieser Stelle.

Ich danke Dr. med. Dipl. Biol. Jürgen Glas, meinem Betreuer, der mir mit fachlichem Rat und seiner Unterstützung bei den praktischen Arbeiten im Labor zur Seite stand und einen großen Beitrag zur Veröffentlichung der Daten leistete.

Mein weiterer Dank gilt Johannes Stallhofer, der mich in die Methodik einarbeitete und für Fragen stets ein offenes Ohr hatte. Julia Diegelmann gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der *in silico*-Analyse und für die Überlassung der Daten. Meinen Mitdoktoranden danke ich für die Zusammenarbeit und gegenseitige Motivation. Frau Melinda Nagy, Herrn Martin Wetzke und weiteren Beteiligten danke ich für die Genotypisierung und Bereitstellung der Daten zu den *STAT4*-, *IL23R*- und weiteren Polymorphismen. Herrn Matthias Friedrich danke ich für die Überlassung der Daten der *IL23R*-Genotypisierung des Psoriasisprojektes. Bei Herrn Andreas Wollenberg bedanke ich mich für die Bereitstellung der Fotos zu psoriasiformen Hautläsionen. Simone Pfennig, Peter Lohse, PD Dr. Julia Seiderer-Nack und der gesamten CED-Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die geleisteten Vorarbeiten hinsichtlich des Patientenkollektivs und der Datenbank unserer Patienten- und Kontrollkohorte. Auch für die Zusammenarbeit während meiner Arbeit bedanke ich mich. Frau Darina Czamara gilt mein Dank für die zuverlässige und fachkundige Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Prof. Heesemann und Prof. Reincke gilt mein Dank für finanzielle und ideelle Förderung im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der LMU München. Bei Frau Prof. Katja Radon möchte ich mich für ihre Einführung in wissenschaftliches Schreiben bedanken.

Marion Koelle gilt mein herzlicher Dank für die fachkundige Unterstützung im Grafikdesign zu jeder Tages- und Nachtzeit. Bedanken möchte ich mich auch bei allen, die mir beim Korrekturlesen der Arbeit zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern, die mir meine Ausbildung und mein Studium ermöglicht haben, mir im Leben immer die Freiheit geben, meinen eigenen Weg zu gehen und mich dabei stets uneingeschränkt unterstützen.

12 Literaturverzeichnis

1. Morgagni G (1769) –The seats and causes of diseases investigated by anatomy; in five books *De sedibus et causis morborum* <engl.>. London: printed for A. Millar; and T. Cadell; and Johnson and Payne. 3v p.
2. Radin ISBDMD, Johnston CJMSMD (1939) REGIONAL ILEITIS. A SUMMARY OF THE LITERATURE. *American Journal of the Medical Sciences* 198: 269-291.
3. Abercrombie J (1828). Diseases of the stomach, the intestinal canal, the liver, and other viscera of the abdomen. 1 ed. Edinburgh: Waugh and Innes.
4. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (1984) Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer. *JAMA* 251: 73-79.
5. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (2000) Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* 67: 263-268.
6. Lockhart-Mummery HE, Morson BC (1960) Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut* 1: 87-105.
7. Morson BC, Lockhart-Mummery HE (1959) Crohn's disease of the colon. *Gastroenterologia* 92: 168-173.
8. Kirsner JB (2001) Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 7: 175-184.
9. Mummery PL (1907) The Causes of Colitis, with Special Reference to its Surgical Treatment with an Account of 36 Cases. *Med Chir Trans* 90: 589-618.
10. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS (2010) Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Dig Dis* 28: 395-405.
11. Fiocchi C (2002) Inflammatory bowel disease. Current concepts of pathogenesis and implications for therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 48: 215-226.
12. Hoffmann JC (2004) Chronisch entzündliche Darmerkrankungen das CED-Handbuch für Klinik und Praxis ; 66 Tabellen. Stuttgart [u.a.]: Thieme. XV, 316 S. : Ill., graph. Darst.
13. Andres PG, Friedman LS (1999) Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 28: 255-281, vii.
14. Göke B (2007) Gastroenterologie systematisch. Bremen [u.a.]: Uni-Med-Verl. 526 S. p.

15. Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Hauser W, et al. (2008) [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Z Gastroenterol* 46: 1094-1146.
16. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, et al. (2006) Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database. *Am J Gastroenterol* 101: 1274-1282.
17. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, et al. (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142: 46-54 e42; quiz e30.
18. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z (2000) The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 35: 154-167.
19. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, et al. (2007) The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5: 1424-1429.
20. Jussila A, Virta LJ, Salomaa V, Maki J, Jula A, et al. (2012) High and increasing prevalence of inflammatory bowel disease in Finland with a clear North-South difference. *J Crohns Colitis*.
21. Baumgart DC, Bernstein CN, Abbas Z, Colombel JF, Day AS, et al. (2011) IBD Around the world: comparing the epidemiology, diagnosis, and treatment: proceedings of the World Digestive Health Day 2010--Inflammatory Bowel Disease Task Force meeting. *Inflamm Bowel Dis* 17: 639-644.
22. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, et al. (1996) Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39: 690-697.
23. Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL, Huebner C, Petermann I (2007) Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res* 622: 70-83.
24. Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H (1999) Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm Bowel Dis* 5: 79-84.
25. Hanauer SB (2006) Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 12 Suppl 1: S3-9.
26. Robbins, Cotran, editors (2010) Pathologic Basis of Disease 8. ed: Saunders Elsevier.
27. Dietel M. SN, Zeitz M. deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité, editor (2008) Harrisons Innere Medizin 17. ed: ABW Wissenschaftsverlag. 2327-2343 p.

28. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Jr., Colombel JF, Sandborn WJ (2010) The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am J Gastroenterol* 105: 289-297.
29. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, et al. (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. *Can J Gastroenterol* 19 Suppl A: 5-36.
30. Böcker W (2008) Pathologie mit über 200 Tabellen. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer. 1362 p.
31. Xavier RJ, Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448: 427-434.
32. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, et al. (2002) Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 8: 244-250.
33. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB (2008) Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 40 Suppl 2: S253-259.
34. Ott C, Scholmerich J (2013) Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 585-595.
35. Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, et al. (2011) [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol* 49: 1276-1341.
36. Saich R, Chapman R (2008) Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 331-337.
37. Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990) Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323: 1228-1233.
38. Burger D, Travis S (2011) Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140: 1827-1837 e1822.
39. Tamboli CP, Doman DB, Patel A (2011) Current and future role of biomarkers in Crohn's disease risk assessment and treatment. *Clin Exp Gastroenterol* 4: 127-140.
40. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, et al. (2005) Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 353: 2462-2476.
41. Ochsenkuhn T, Sackmann M, Goke B (2004) Infliximab for acute, not steroid-refractory ulcerative colitis: a randomized pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 1167-1171.
42. Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ (2009) Management of Crohn's disease in adults. *Am J Gastroenterol* 104: 465-483; quiz 464, 484.

43. Guagnozzi D, Gonzalez-Castillo S, Oliveira A, Lucendo AJ (2012) Nutritional treatment in inflammatory bowel disease. An update. *Rev Esp Enferm Dig* 104: 479-488.
44. Sartor RB (1997) Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 92: 5S-11S.
45. Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 417-429.
46. Scharl M, Paul G, Weber A, Jung BC, Docherty MJ, et al. (2009) Protection of epithelial barrier function by the Crohn's disease associated gene protein tyrosine phosphatase n2. *Gastroenterology* 137: 2030-2040 e2035.
47. 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: 1152-1167.
48. Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, et al. (2008) Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 57: 903-910.
49. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, et al. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53: 1658-1664.
50. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, et al. (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18129-18134.
51. Cho JH (2008) The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 8: 458-466.
52. Baumgart DC, Carding SR (2007) Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369: 1627-1640.
53. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, et al. (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336: 489-493.
54. Danese S, Sans M, Fiocchi C (2004) Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 3: 394-400.
55. Rubin DT, Hanauer SB (2000) Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12: 855-862.
56. Thomas GA, Rhodes J, Green JT (1998) Inflammatory bowel disease and smoking--a review. *Am J Gastroenterol* 93: 144-149.
57. Rosenfeld G, Bressler B (2012) The truth about cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 107: 1407-1408.

58. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A (2001) Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 344: 808-814.
59. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A (2003) Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124: 40-46.
60. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G (2008) Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol* 14: 165-173.
61. Boneberger A, Weiss EH, Calvo M, Torres L, Wagner J, et al. (2011) Environmental factors in infancy and ulcerative colitis in the Central South of Chile: A case-control study.
62. Macfarlane S, Steed H, Macfarlane GT (2009) Intestinal bacteria and inflammatory bowel disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46: 25-54.
63. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, et al. (2005) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 206: 260-276.
64. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, et al. (1994) The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 180: 2359-2364.
65. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, et al. (2007) Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 39: 830-832.
66. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*.
67. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Collins MT (2004) Population-based case control study of seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 42: 1129-1135.
68. Treacher DF, Jewell DP (1985) Yersinia colitis associated with Crohn's disease. *Postgrad Med J* 61: 173-174.
69. Greenfield C, Aguilar Ramirez JR, Pounder RE, Williams T, Danvers M, et al. (1983) Clostridium difficile and inflammatory bowel disease. *Gut* 24: 713-717.
70. Burich A, Hershberg R, Waggle K, Zeng W, Brabb T, et al. (2001) Helicobacter-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G764-778.
71. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, et al. (1995) Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 108: 1396-1404.

72. Burke DA, Axon AT (1988) Adhesive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *BMJ* 297: 102-104.
73. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, et al. (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127: 412-421.
74. Rachima C, Maoz E, Apter S, Thaler M, Grossman E, et al. (1998) Cytomegalovirus infection associated with ulcerative colitis in immunocompetent individuals. *Postgrad Med J* 74: 486-489.
75. Robertson DJ, Sandler RS (2001) Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature. *Inflamm Bowel Dis* 7: 51-57.
76. Wakefield AJ, Ekbohm A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE (1995) Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108: 911-916.
77. Jones P, Fine P, Piracha S (1997) Crohn's disease and measles. *Lancet* 349: 473.
78. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, et al. (2001) Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121: 580-591.
79. Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, et al. (2003) The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* 47: 371-378.
80. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, et al. (2002) *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 8: 71-80.
81. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, et al. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44-54.
82. Sydora BC, Tavernini MM, Doyle J, Fedorak RN (2006) A defect in epithelial barrier integrity is not required for a systemic response to bacterial antigens or intestinal injury in T cell receptor-alpha gene-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 12: 750-757.
83. Hilsden RJ, Meddings JB, Sutherland LR (1996) Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 110: 1395-1403.
84. Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, et al. (1999) Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 5: 262-270.

85. Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ (2002) In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 51: 21-25.
86. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, et al. (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491: 119-124.
87. Rosenstiel P, Sina C, Franke A, Schreiber S (2009) Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 21: 334-345.
88. Taylor KD, Yang H, Rotter JI (2001) Inflammatory bowel disease. II. Gene mapping. *Mol Genet Metab* 74: 22-44.
89. (2003) The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796.
90. Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
91. Bell GI, Horita S, Karam JH (1984) A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33: 176-183.
92. Hakonarson H, Grant SF (2009) Genome-wide association studies in type 1 diabetes, inflammatory bowel disease and other immune-mediated disorders. *Semin Immunol* 21: 355-362.
93. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, et al. (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71: 877-892.
94. Hook CC, DiMugno EP, Tefferi A (2004) Primer on medical genomics. Part XIII: Ethical and regulatory issues. *Mayo Clin Proc* 79: 645-650.
95. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M (2005) Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 6: 376-388.
96. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP (2001) Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 15: 731-748.
97. Russell RK, Satsangi J (2004) IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 525-539.
98. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, et al. (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324: 84-88.
99. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, et al. (2008) Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 14: 968-976.

100. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B (1988) Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29: 990-996.
101. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G (2003) Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 124: 1767-1773.
102. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ (1996) Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 312: 95-96.
103. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, et al. (1996) Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-823.
104. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 599-603.
105. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, et al. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606.
106. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, et al. (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357: 1925-1928.
107. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, et al. (2002) The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 867-874.
108. Bonen DK, Cho JH (2003) The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124: 521-536.
109. Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11: 241-247.
110. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF (2004) Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 126: 1533-1549.
111. Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG (2003) Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 9: 1646-1656.
112. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 43: 246-252.

113. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42: 1118-1125.
114. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, et al. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314: 1461-1463.
115. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, et al. (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 39: 207-211.
116. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, Sandor C, Farnir F, et al. (2007) Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet* 3: e58.
117. Massey DC, Parkes M (2007) Genome-wide association scanning highlights two autophagy genes, ATG16L1 and IRGM, as being significantly associated with Crohn's disease. *Autophagy* 3: 649-651.
118. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, et al. (2007) A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 132: 1665-1671.
119. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, et al. (2007) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 39: 596-604.
120. Wang K, Zhang H, Kugathasan S, Annese V, Bradfield JP, et al. (2009) Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease. *Am J Hum Genet* 84: 399-405.
121. Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, Wang JS, Fei K (2009) Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 15: 5784-5788.
122. Neurath MF (2007) IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 13: 26-28.
123. Abraham C, Cho J (2009) Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 15: 1090-1100.
124. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, et al. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40: 955-962.
125. Glas J, Stallhofer J, Ripke S, Wetzke M, Pfennig S, et al. (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. *Am J Gastroenterol* 104: 1737-1744.

126. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, et al. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 202: 96-105.
127. Kreymborg K, Bohlmann U, Becher B (2005) IL-23: changing the verdict on IL-12 function in inflammation and autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets* 9: 1123-1136.
128. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, et al. (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170: 827-845.
129. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, et al. (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168: 5699-5708.
130. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, et al. (1991) Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 173: 869-879.
131. Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, et al. (1997) Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 150: 823-832.
132. Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-146.
133. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, et al. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13: 715-725.
134. Ciric B, El-behi M, Cabrera R, Zhang GX, Rostami A (2009) IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. *J Immunol* 182: 5296-5305.
135. Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, Willems F, Goldman M (2005) IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur J Immunol* 35: 469-475.
136. Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, et al. (2008) Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 14: 437-445.
137. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, et al. (2006) IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G827-838.
138. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Goke B, et al. (2009) The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58: 1207-1217.

139. Brand S, Olszak T, Beigel F, Diebold J, Otte JM, et al. (2006) Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 97: 709-723.
140. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, et al. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70.
141. Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, et al. (2005) Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 128: 687-694.
142. Huffmeier U, Lascorz J, Bohm B, Lohmann J, Wendler J, et al. (2009) Genetic variants of the IL-23R pathway: association with psoriatic arthritis and psoriasis vulgaris, but no specific risk factor for arthritis. *J Invest Dermatol* 129: 355-358.
143. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, et al. (2007) A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80: 273-290.
144. Smith RL, Warren RB, Eyre S, Ho P, Ke X, et al. (2008) Polymorphisms in the IL-12beta and IL-23R genes are associated with psoriasis of early onset in a UK cohort. *J Invest Dermatol* 128: 1325-1327.
145. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, et al. (2007) Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 39: 1329-1337.
146. Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF (2005) The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 129: 827-836.
147. Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, et al. (2008) Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* 128: 1653-1661.
148. Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, Yeilding N, Guzzo C, et al. (2007) A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 356: 580-592.
149. Wright V, Watkinson G (1965) Sacro-Iliitis and Ulcerative Colitis. *Br Med J* 2: 675-680.
150. Fischer A, Nothnagel M, Franke A, Jacobs G, Saadati HR, et al. (2011) Association of inflammatory bowel disease risk loci with sarcoidosis, and its acute and chronic subphenotypes. *Eur Respir J* 37: 610-616.
151. Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, et al. (2002) IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in

- the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169: 7104-7110.
152. Cho ML, Kang JW, Moon YM, Nam HJ, Jhun JY, et al. (2006) STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 176: 5652-5661.
153. Iwakura Y, Ishigame H (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116: 1218-1222.
154. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD (2006) The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 18: 670-675.
155. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al-Shamsi M, Lukic ML (2006) New members of the interleukin-12 family of cytokines: IL-23 and IL-27 modulate autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1079: 157-160.
156. Zikherman J, Weiss A (2011) Unraveling the functional implications of GWAS: how T cell protein tyrosine phosphatase drives autoimmune disease. *J Clin Invest*: 1-4.
157. Kleppe M, Soulier J, Asnafi V, Mentens N, Hornakova T, et al. (2011) PTPN2 negatively regulates oncogenic JAK1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 117: 7090-7098.
158. Doody KM, Bourdeau A, Tremblay ML (2009) T-cell protein tyrosine phosphatase is a key regulator in immune cell signaling: lessons from the knockout mouse model and implications in human disease. *Immunol Rev* 228: 325-341.
159. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J (2009) The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 89-116.
160. Pao LI, Badour K, Siminovitch KA, Neel BG (2007) Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* 25: 473-523.
161. Lorenzen JA, Dadabay CY, Fischer EH (1995) COOH-terminal sequence motifs target the T cell protein tyrosine phosphatase to the ER and nucleus. *J Cell Biol* 131: 631-643.
162. Galic S, Klingler-Hoffmann M, Fodero-Tavoletti MT, Puryer MA, Meng TC, et al. (2003) Regulation of insulin receptor signaling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Mol Cell Biol* 23: 2096-2108.
163. ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, et al. (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22: 5662-5668.
164. Tiganis T, Bennett AM, Ravichandran KS, Tonks NK (1998) Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 18: 1622-1634.

165. Walchli S, Curchod ML, Gobert RP, Arkinstall S, Hooft van Huijsduijnen R (2000) Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on "substrate-trapping" mutants. *J Biol Chem* 275: 9792-9796.
166. van Vliet C, Bukczynska PE, Puryer MA, Sadek CM, Shields BJ, et al. (2005) Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase. *Nat Immunol* 6: 253-260.
167. Scharl M, Hruz P, McCole DF (2010) Protein tyrosine phosphatase non-receptor Type 2 regulates IFN-gamma-induced cytokine signaling in THP-1 monocytes. *Inflamm Bowel Dis* 16: 2055-2064.
168. Simoncic PD, Lee-Loy A, Barber DL, Tremblay ML, McGlade CJ (2002) The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12: 446-453.
169. Wiede F, Shields BJ, Chew SH, Kyparissoudis K, van Vliet C, et al. (2011) T cell protein tyrosine phosphatase attenuates T cell signaling to maintain tolerance in mice. *J Clin Invest*.
170. Heinonen KM, Nestel FP, Newell EW, Charette G, Seemayer TA, et al. (2004) T-cell protein tyrosine phosphatase deletion results in progressive systemic inflammatory disease. *Blood* 103: 3457-3464.
171. Scharl M, Wojtal KA, Becker HM, Fischbeck A, Frei P, et al. (2011) Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2 regulates autophagosome formation in human intestinal cells. *Inflamm Bowel Dis*.
172. Khor B, Gardet A, Xavier RJ (2011) Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 307-317.
173. Thompson SD, Sudman M, Ramos PS, Marion MC, Ryan M, et al. (2010) The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN2, COG6, and ANGPT1. *Arthritis Rheum* 62: 3265-3276.
174. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, et al. (2007) Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 39: 857-864.
175. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, et al. (2008) Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med* 359: 2767-2777.
176. Festen EA, Goyette P, Green T, Boucher G, Beauchamp C, et al. (2011) A meta-analysis of genome-wide association scans identifies IL18RAP, PTPN2, TAGAP, and PUS10 as shared risk loci for Crohn's disease and celiac disease. *PLoS Genet* 7: e1001283.

177. Colli ML, Moore F, Gurzov EN, Ortis F, Eizirik DL (2010) MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA. *Hum Mol Genet* 19: 135-146.
178. Moore F, Colli ML, Cnop M, Esteve MI, Cardozo AK, et al. (2009) PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* 58: 1283-1291.
179. Kleppe M, Lahortiga I, El Chaar T, De Keersmaecker K, Mentens N, et al. (2010) Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene PTPN2 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 42: 530-535.
180. Ploski R, Szymanski K, Bednarczuk T (2011) The genetic basis of graves' disease. *Curr Genomics* 12: 542-563.
181. Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, et al. (2012) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* 44: 511-516.
182. Engel MA, Khalil M, Neurath MF (2012) Highlights in inflammatory bowel disease--from bench to bedside. *Clin Chem Lab Med* 50: 1229-1235.
183. (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-678.
184. Muller-Berghaus J, Kern K, Paschen A, Nguyen XD, Kluter H, et al. (2004) Deficient IL-12p70 secretion by dendritic cells based on IL12B promoter genotype. *Genes Immun* 5: 431-434.
185. Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437: 55-75.
186. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Torok HP, et al. (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: e819.
187. Glas J, Seiderer J, Nagy M, Fries C, Beigel F, et al. (2010) Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset. *PLoS One* 5: e10373.
188. Glas J, Konrad A, Schmechel S, Dambacher J, Seiderer J, et al. (2008) The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol* 103: 682-691.
189. Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, et al. (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26: 362-367.

190. Purcell S, Cherny SS, Sham PC (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19: 149-150.
191. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, et al. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81: 559-575.
192. Tillack C, Ehmann LM, Friedrich M, Laubender RP, Papay P, et al. (2013) Anti-TNF antibody-induced psoriasiform skin lesions in patients with inflammatory bowel disease are characterised by interferon-gamma-expressing Th1 cells and IL-17A/IL-22-expressing Th17 cells and respond to anti-IL-12/IL-23 antibody treatment. *Gut*. 2013 Mar 6. [Epub ahead of print]
193. Glas J, Seiderer J, Tillack C, Pfennig S, Beigel F, et al. (2010) The NOD2 single nucleotide polymorphisms rs2066843 and rs2076756 are novel and common Crohn's disease susceptibility gene variants. *PLoS One* 5: e14466.
194. Torkvist L, Halfvarson J, Ong RT, Lordal M, Sjoqvist U, et al. (2010) Analysis of 39 Crohn's disease risk loci in Swedish inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 16: 907-909.
195. Peter I, Mitchell AA, Ozelius L, Erazo M, Hu J, et al. (2011) Evaluation of 22 genetic variants with Crohn's disease risk in the Ashkenazi Jewish population: a case-control study. *BMC Med Genet* 12: 63.
196. Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, et al. (2010) IL23R and IL12B SNPs and Haplotypes Strongly Associate with Crohn's Disease Risk in a New Zealand Population. *Gastroenterol Res Pract* 2010: 539461.
197. Festen EA, Stokkers PC, van Diemen CC, van Bodegraven AA, Boezen HM, et al. (2010) Genetic analysis in a Dutch study sample identifies more ulcerative colitis susceptibility loci and shows their additive role in disease risk. *Am J Gastroenterol* 105: 395-402.
198. Zwiers A, Fuss IJ, Seegers D, Konijn T, Garcia-Vallejo JJ, et al. (2011) A polymorphism in the coding region of IL12b promotes IL-12p70 and IL-23 heterodimer formation. *J Immunol* 186: 3572-3580.
199. Beynon V, Cotofana S, Brand S, Lohse P, Mair A, et al. (2008) NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis* 14: 1033-1040.
200. Yamazaki K, Takahashi A, Takazoe M, Kubo M, Onouchi Y, et al. (2009) Positive association of genetic variants in the upstream region of NKX2-3 with Crohn's disease in Japanese patients. *Gut* 58: 228-232.
201. Marquez A, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, De La Concha EG, et al. (2008) IL23R and IL12B polymorphisms in Spanish IBD patients: no evidence of interaction. *Inflamm Bowel Dis* 14: 1192-1196.

202. Weersma RK, Stokkers PC, Cleynen I, Wolfkamp SC, Henckaerts L, et al. (2009) Confirmation of multiple Crohn's disease susceptibility loci in a large Dutch-Belgian cohort. *Am J Gastroenterol* 104: 630-638.
203. van der Heide F, Nolte IM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G, et al. (2010) Differences in genetic background between active smokers, passive smokers, and non-smokers with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 105: 1165-1172.
204. Szperl A, Saavalainen P, Weersma RK, Lappalainen M, Paavola-Sakki P, et al. (2011) Functional polymorphism in IL12B promoter site is associated with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17: E38-40.
205. Kugathasan S, Baldassano RN, Bradfield JP, Sleiman PM, Imielinski M, et al. (2008) Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 40: 1211-1215.
206. McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, Goyette P, Essers J, et al. (2010) Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet* 42: 332-337.
207. Anderson CA, Massey DC, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, et al. (2009) Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology* 136: 523-529 e523.
208. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, et al. (2008) Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* 40: 710-712.
209. Abraham C, Cho JH (2009) IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 60: 97-110.
210. Wei XQ, Rogers H, Lewis MA, Williams DW (2011) The role of the IL-12 cytokine family in directing T-cell responses in oral candidosis. *Clin Dev Immunol* 2011: 697340.
211. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, et al. (2004) Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 351: 2069-2079.
212. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleisher MR, et al. (2008) A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 135: 1130-1141.
213. Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, et al. (2012) Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* 367: 1519-1528.
214. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, et al. (2007) Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet* 122: 201-206.

215. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, et al. (2008) A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet* 4: e1000041.
216. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, et al. (2009) Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* 41: 199-204.
217. Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, et al. (2001) Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 27: 372-373.
218. Rahier JF, Buche S, Peyrin-Biroulet L, Bouhnik Y, Duclos B, et al. (2010) Severe skin lesions cause patients with inflammatory bowel disease to discontinue anti-tumor necrosis factor therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8: 1048-1055.
219. Sarin R, Wu X, Abraham C (2011) Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9560-9565.
220. Di Meglio P, Di Cesare A, Laggner U, Chu CC, Napolitano L, et al. (2011) The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS One* 6: e17160.
221. Pidasheva S, Trifari S, Phillips A, Hackney JA, Ma Y, et al. (2011) Functional studies on the IBD susceptibility gene IL23R implicate reduced receptor function in the protective genetic variant R381Q. *PLoS One* 6: e25038.
222. Yu RY, Gallagher G (2010) A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells. *J Immunol* 185: 7302-7308.
223. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, et al. (2008) Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis* 14: 204-212.
224. Sherlock ME, Walters T, Tabbers MM, Frost K, Zachos M, et al. (2013) Infliximab-induced psoriasis and psoriasiform skin lesions in pediatric Crohn disease and a potential association with IL-23 receptor polymorphisms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 56: 512-518.
225. Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J (2005) Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3372-3377.
226. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, et al. (2002) Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 119: 1096-1102.

227. de Gannes GC, Ghoreishi M, Pope J, Russell A, Bell D, et al. (2007) Psoriasis and pustular dermatitis triggered by TNF- α inhibitors in patients with rheumatologic conditions. *Arch Dermatol* 143: 223-231.
228. Seneschal J, Milpied B, Vergier B, Lepreux S, Schaeffer T, et al. (2009) Cytokine imbalance with increased production of interferon- α in psoriasiform eruptions associated with antitumour necrosis factor- α treatments. *Br J Dermatol* 161: 1081-1088.
229. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, et al. (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 36: 1309-1323.
230. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD (1998) Interleukin-17 and interferon- γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111: 645-649.
231. Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, et al. (2012) Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* 366: 1190-1199.
232. Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Krueger JG, et al. (2012) Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 366: 1181-1189.
233. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, et al. (2009) IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not. *J Mol Med (Berl)* 87: 523-536.
234. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, et al. (2005) IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174: 3695-3702.
235. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, et al. (2007) Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 132: 2359-2370.
236. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, et al. (2006) Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116: 1317-1326.
237. Tanaka K, Namba T, Arai Y, Fujimoto M, Adachi H, et al. (2007) Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J Biol Chem* 282: 23240-23252.
238. Chelbi ST, Wilson ML, Veillard AC, Ingles SA, Zhang J, et al. (2012) Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases. *Hum Mol Genet* 21: 1968-1978.

239. Morgan K, Kalsheker NA (1997) Regulation of the serine proteinase inhibitor (SERPIN) gene alpha 1-antitrypsin: a paradigm for other SERPINs. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1501-1511.
240. Flach CF, Qadri F, Bhuiyan TR, Alam NH, Jennische E, et al. (2007) Broad up-regulation of innate defense factors during acute cholera. *Infect Immun* 75: 2343-2350.
241. O'Connor W, Jr., Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, et al. (2009) A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 10: 603-609.
242. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, et al. (2008) IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 118: 534-544.
243. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Stevens S, et al. (2008) Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29: 947-957.
244. Glas J, Seiderer J, Bayrle C, Wetzke M, Fries C, et al. (2011) The role of osteopontin (OPN/SPP1) haplotypes in the susceptibility to Crohn's disease. *PLoS One* 6: e29309.
245. Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, et al. (2001) The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep* 2: 42-48.
246. Morgan AR, Han DY, Huebner C, Lam WJ, Fraser AG, et al. (2010) PTPN2 but not PTPN22 is associated with Crohn's disease in a New Zealand population. *Tissue Antigens* 76: 119-125.
247. Latiano A, Palmieri O, Latiano T, Corritore G, Bossa F, et al. (2011) Investigation of multiple susceptibility loci for inflammatory bowel disease in an Italian cohort of patients. *PLoS One* 6: e22688.
248. Waterman M, Xu W, Stempak JM, Milgrom R, Bernstein CN, et al. (2011) Distinct and overlapping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: correlations with pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 17: 1936-1942.
249. Kirino Y, Bertias G, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, et al. (2013) Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behcet's disease and epistasis between HLA-B*51 and ERAP1. *Nat Genet* 45: 202-207.
250. Choi AM, Ryter SW, Levine B (2013) Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 368: 651-662.
251. Ryter SW, Cloonan SM, Choi AM (2013) Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells* 36: 7-16.

252. Scharl M, Mwinyi J, Fischbeck A, Leucht K, Eloranta JJ, et al. (2011) Crohn's disease-associated polymorphism within the PTPN2 gene affects muramyl-dipeptide-induced cytokine secretion and autophagy. *Inflamm Bowel Dis*.
253. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim YG, et al. (2010) Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 11: 55-62.
254. Scharl M, McCole DF, Weber A, Vavricka SR, Frei P, et al. (2011) Protein tyrosine phosphatase N2 regulates TNFalpha-induced signalling and cytokine secretion in human intestinal epithelial cells. *Gut* 60: 189-197.
255. Zheng W, Flavell RA (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89: 587-596.
256. Murphy TL, Cleveland MG, Kulesza P, Magram J, Murphy KM (1995) Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol* 15: 5258-5267.
257. Male V, Nisoli I, Gascoyne DM, Brady HJ (2012) E4BP4: an unexpected player in the immune response. *Trends Immunol* 33: 98-102.
258. Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, et al. (2011) NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J Immunol* 186: 4649-4655.
259. R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing (2013), R Foundation for Statistical Computing, URL: <http://cran.r-project.org> (Stand: 18.11.2013)
260. Purcell S., Sham P.: Genetic Power Calculator (2001-2009), URL: <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/> (Stand: 18.11.2013)
261. Purcell S.: PLINK v1.07 (2009), URL: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/> (Stand: 18.11.2013)
262. Akiyama Y.: "TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites" (1995), URL: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> (Stand: 28.11.2013)

Eidesstattliche Versicherung

Wagner Johanna

Name, Vorname

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

Die Rolle von IL12B- und PTPN2-Polymorphismen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

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

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

München, 10.07.2014

Ort, Datum

Johanna Wagner

Unterschrift Doktorandin/Doktorand