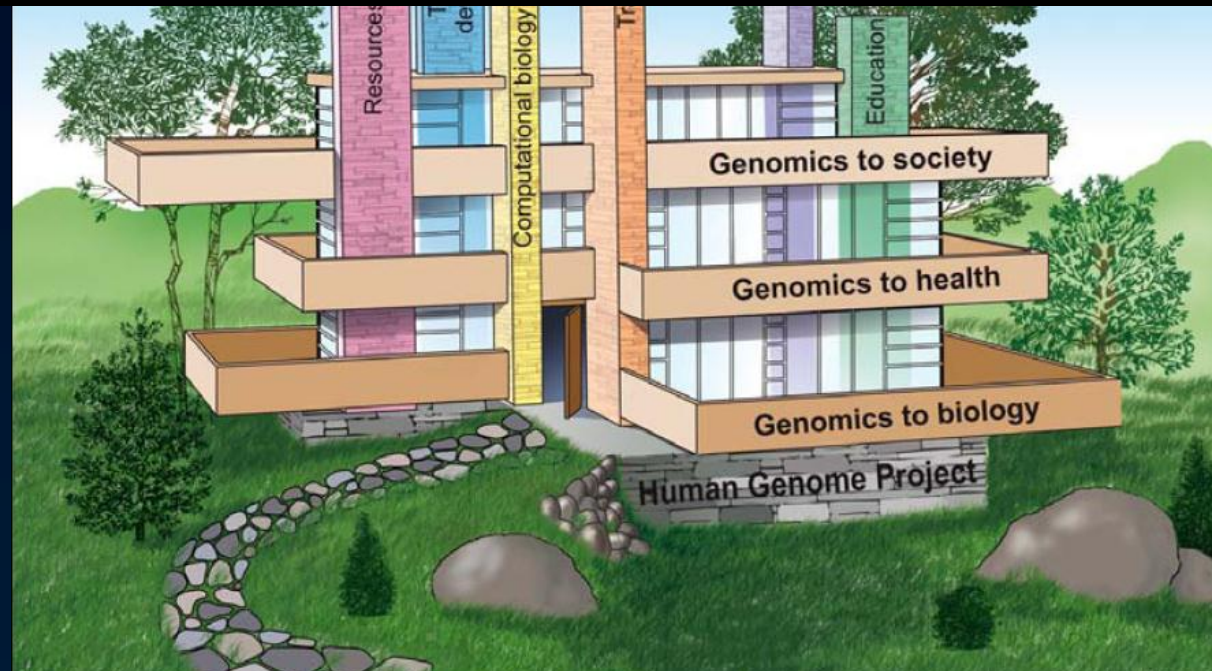


Raziskave človeškega genoma za izboljšanje zdravja bolnikov s Kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB)

NOVOSTI NA PODROČJU GENETIKE KVČB IN REZULTATI SLOVENSKE GENETSKE ŠTUDIJE



prof. dr. Uroš Potočnik
(uros.potocnik@uni-mb.si)

Center za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko, Medicinska fakulteta Maribor
Srečanje Društva za KVČB, Maribor, Januar 2012

Slovenska genetska študija KVČB

- Raziskava poteka od leta 2002
- V genetske raziskave vključenih več kot 650 slovenskih bolnikov s KVČB
 - Hvala vsem članom KVČB društva, ki so se vključili v študijo in darovali svoj vzorec!!!
- V letu 2011 vključitev v mednarodni konzorcij za genetiko KVČB „ImmunoChip“
 - Genska tipizacija in statistične analize izvedene za več kot 200 000 DNA polimorfizmov v več kot 5000 genih
- Rezultati genske tipizacije za člane Slovenskega društva za KVČB so dostopni na spletni strani društva <http://www.kvcb.si/index.html> ; geslo: kvcbdrustvo2012;
- Povzetek rezultatov in ugotovitev študije bo objavljen v naslednji številki Krončka

Rezultati genske tipizacije

- Za 12 najpomembnejših KVČB genov preverjenih in potrjenih pri slovenskih KVČB bolnikih

Koda preiskovaca

Ime gena

Oznaka polimorfizma SNP

genotip

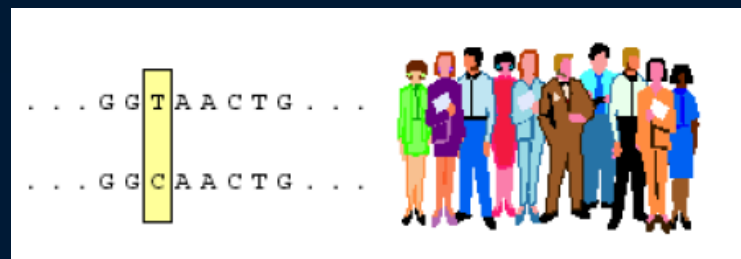
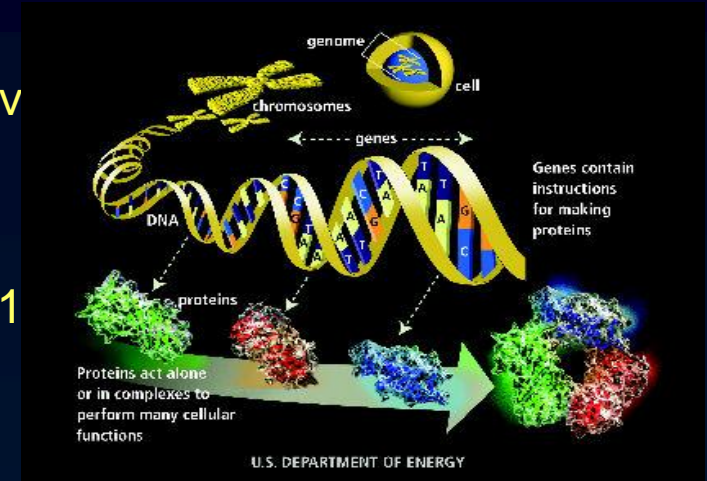
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Oznaka	NOD2_H702W rs2066844	NOD2_G908R rs2066845	NOD2_L1007fsn rs2066847	SLC22A4_C1672T rs1050152	IL23R_int6G/T rs7517847	SLC22A5_G207C rs2631372	CTLA4_CT60 rs3087243	IL4_C+33T rs2070874	ECM1_S41G rs13294	FCGR3A_-158WF rs396991
428	IBD322	CC	GG	CC	CC	GG	GG	AA	CT	AG	GG
429	IBD323	CC	GG	w/wt	CC	GT	CG	GG	CT	AG	GG
430	IBD324	CC	GG	w/wt	CT	GT	CC	AG	CT	AG	GT
431	IBD325	CC	CG	w/wt	CT	GT	CC	GG	CT	AG	GT
432	KVČB 016	CC	GG	C/wt	CT	TT	CC	AG	CC	AA	GT
433	KVČB 017	CC	GG	w/wt	CT	TT	CC	GG	CC	GG	TT
434	KVČB 018	CC	GG	w/wt	CT	GT	CG	AG	CT	AG	GT
435	KVČB 019	CC	GG	w/wt	CT	GG	CG	AA	CC	GG	TT
436	KVČB 020	CC	GG	w/wt	TT	GT	CC	AG	CC	GG	TT
437	KVČB 021	CC	GG	w/wt	CC	GG	CG	GG	CC	GG	GG
438	KVČB 022	CC	CG	w/wt	TT	GT	CC	GG	CC	GG	TT
439	KVČB 023	CC	GG	w/wt	TT	GT	CC	GG	CC	AG	GT
440	KVČB 024	CC	GG	w/wt	TT	TT	CC	GG	CT	AG	GT
441	KVČB 025	0	0	0	0	0	0	0	CT	AG	0
442	KVČB 026	CC	GG	w/wt	TT	TT	CC	AG	CT	AA	0
443	KVČB 027	CC	GG	w/wt	CC	GT	CG	GG	CC	AG	GG
444	KVČB 028	CC	GG	w/wt	CT	TT	CG	AA	CC	GG	GT
445	KVČB 029	CT	GG	w/wt	CC	TT	GG	AG	CC	GG	TT
446	KVČB 030	CC	GG	w/wt	CT	GT	CG	AG	CC	GG	GT
447	KVČB 031	CC	GG	w/wt	CT	TT	CC	GG	CC	AG	GT
448	KVČB 032	CC	GG	w/wt	CT	GT	CC	AG	CC	GG	GG
449	KVČB 033	CC	GG	w/wt	CC	GT	CG	AG	CC	AG	GG
450	KVČB 034	CC	GG	w/wt	CT	GT	CG	AG	CC	AG	GG

Rezultati genske tipizacije

	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
	FCGR3A_-158VIF rs396991	CCNY rs12777960	SEPHS1 rs2254252	ŠT. USPEŠNO ANALIZIRANIH SNP-jev	% USPEŠNO ANALIZIRANIH SNP-jev	ŠTEVILO HOMOZIGOTOV	% HOMOZIGOTOV	ŠTEVILO HETEROZIGOTOV	% HETEROZIGOTOV	ŠTEVILO DIVJI TIP	% DIVJI TIP	ŠTEVILO NEUSPEŠNO ANALIZIRANIH SNP-jev	% NEUSPEŠNO ANALIZIRANIH SNP-jev
428	GG	AC	CC	12	100.00%	2	16.67%	3	25.00%	7	58.33%	0	0.00%
429	GG	AC	CT	12	100.00%	2	16.67%	6	50.00%	4	33.33%	0	0.00%
430	GT	AC	CT	12	100.00%	1	8.33%	8	66.67%	3	25.00%	0	0.00%
431	GT	AC	CT	12	100.00%	2	16.67%	8	66.67%	2	16.67%	0	0.00%
432	GT	AA	CT	12	100.00%	5	41.67%	5	41.67%	2	16.67%	0	0.00%
433	TT	AA	CT	12	100.00%	5	41.67%	2	16.67%	5	41.67%	0	0.00%
434	GT	AA	CC	12	100.00%	1	8.33%	7	58.33%	4	33.33%	0	0.00%
435	TT	CC	TT	12	100.00%	2	16.67%	2	16.67%	8	66.67%	0	0.00%
436	TT	AC	TT	12	100.00%	4	33.33%	3	25.00%	5	41.67%	0	0.00%
437	GG	AC	TT	12	100.00%	4	33.33%	2	16.67%	6	50.00%	0	0.00%
438	TT	AC	0	11	91.67%	4	36.36%	3	27.27%	4	36.36%	1	8.33%
439	GT	CC	CC	12	100.00%	4	33.33%	3	25.00%	5	41.67%	0	0.00%
440	GT	AC	CT	12	100.00%	4	33.33%	5	41.67%	3	25.00%	0	0.00%
441	0	CC	CT	4	33.33%	0	0.00%	3	75.00%	1	25.00%	8	66.67%
442	0	AA	CT	11	91.67%	5	45.45%	3	27.27%	3	27.27%	1	8.33%
443	GG	AC	CT	12	100.00%	3	25.00%	5	41.67%	4	33.33%	0	0.00%
444	GT	AC	TT	12	100.00%	3	25.00%	4	33.33%	5	41.67%	0	0.00%
445	TT	AC	TT	12	100.00%	3	25.00%	3	25.00%	6	50.00%	0	0.00%
446	GT	CC	CT	12	100.00%	1	8.33%	6	50.00%	5	41.67%	0	0.00%
447	GT	AC	0	11	91.67%	4	36.36%	4	36.36%	3	27.27%	1	8.33%
448	GG	AC	TT	12	100.00%	4	33.33%	4	33.33%	4	33.33%	0	0.00%
449	GG	AC	CC	12	100.00%	2	16.67%	5	41.67%	5	41.67%	0	0.00%
450	GT	CC	CT	12	100.00%	1	8.33%	7	58.33%	4	33.33%	0	0.00%

Osnovne definicije

- Kaj je genetski zapis?
 - Dedna informacija vtisnjena v DNA molekulo
 - Prikazujemo jo z zaporedjem 3 milijarde nukleotidov (baznih parov)
...AATTCCAATGGAACCTAACCAATA...
- Kaj je gen
 - Del zaporedja, ki vsebuje informacijo za izgradnjo 1 proteina (beljakovine)
 - Človek ima 25 000-30 000 genov, npr. NOD2
- Kaj je DNA polimorfizem SNP?
 - ang Single nucleotide polymorphism
 - Zamenjava enega nukleotida, npr. C namesto T
 - Vsak ima svojo rs kodo, npr. rs2066844
- Kaj je genotip?
 - Kombinacija 2 alelov, t.j. 2 različnih oblik (sekvenc) genov-enega smo prejeli od očeta, enega od mame
 - Oba alela enaka=homozigot, npr. AA; oba alela različna=heterozigot



Asociacijska študija

- Primerjava pogostnosti (frekvence) genotipov in alelov v skupini bolnikov in kontrolni skupini zdravih posameznikov

KVČB spada med genetske kompleksne bolezni

- Pomembno za razumevanje rezultatov genetskega testiranja!
- Monogenske bolezni: podedovana mutacija v 1 genu povzroči blizu 100% verjetnost, da se bo bolezen v resnici pojavila
- Kompleksne bolezni: podedovana mutacija v genu vpletenem v nastanek bolezni samo poveča tveganje. Potrebni so še vplivi okolja ali delovanja ostalih genov.
- Odkritje vseh (večine genov), ki so vpleteni v KVČB bo lahko omogočilo zanesljivo napovedovanje?



Namen raziskave

- Koliko in kateri geni so povezani z povečanim tveganjem za nastanek KVČB?
- Kaj je skupnega genom, ki so povezani s KVČB? Kateri so ključni molekularni in biološki procesi vpleteni v patogenezo KVČB?
- Na kakšen način polimorfizmi/mutacije vplivajo na funkcijo gena?
- Uporaba rezultatov genetskih testov v klinični praksi
 - Molekularne tarče za načrtovanje novih zdravil
 - Napoved tveganja
 - Napoved poteka bolezni
 - Povezava NOD2 mutacij s stenozami
 - Napoved odziva na zdravila (farmakogenetika KVČB)

Slovenski bolniki vključeni v študijo

- 632 IBD patients
 - 201 ulcerative colitis (UC) including 39 early stage colitis (proktitis)
 - 378 Crohn (CD) including 123 patients not responding to standard treatment and enrolled in adalimumab treatment
 - **53 Intermediate**
- Farmagenetska študija odziva na adalimumab pri CB bolnikih
 - **107 CD patients enrolled**
- 355 zdravih posameznikov kot kontrolna skupina

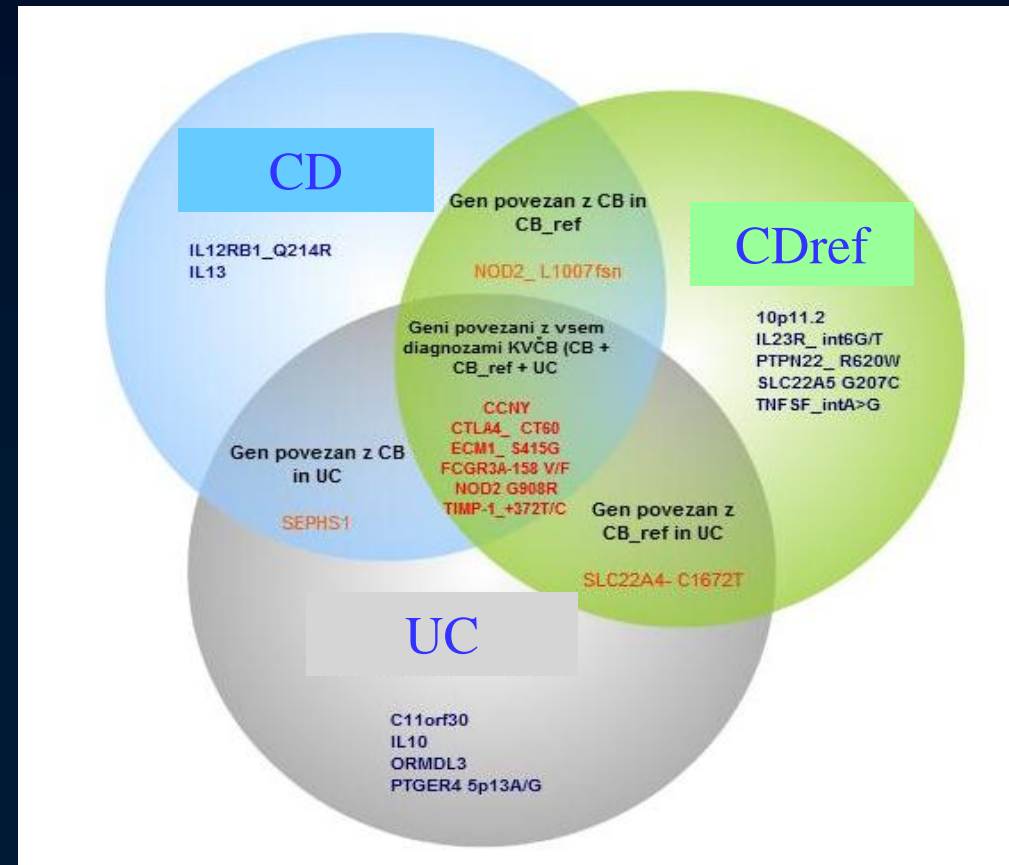
Demografski in klinični podatki

Klinične značilnosti		KVČB pacienti (N = 632)
Starost	srednja +/- SD* v tej študiji	47.98 +/- 17.04
Tip bolezni	CD (%)	38.13
	CD _{refractory} (%)	20.73
	UC (%)	32.59
	nedoločen KVČB (%)	8.55
Spol	Moški/Ženske (%)	48.24 / 51.76
Operacija	Da/Ne (%)	37.74 / 62.26
Starost ob diagnozi	A1 pod 16 let (%)	12,36
	A2 med 17 in 40 let (%)	71,91
	A3 nad 40 let (%)	15,73
Lokacija (za bolnike s Crohn-ovo boleznijo, N = 345)	L1 Ileum (%)	36.36
	L2 Kolon (%)	22.73
	L3 Ileokolon (%)	27.27
	L4 Isolated upper disease	13.64
Potek bolezni in zapleti (za bolnike s Crohn-ovo boleznijo, N = 345)	B1 non-stricturing, non-penetrating (%)	50.00
	B1p perianal non-stricturing, non-penetrating (%)	4.55
	B2 stricturing (%)	22.73
	B2p perianal structuring (%)	4.55
	B3 penetrating (%)	9.09
	B3p perianal penetrating (%)	9.09
Fistula (za bolnike s Crohn-ovo boleznijo, N = 345)	Da/Ne (%)	39.57 / 60.43
Kajenje	Da/Ne (%)	14.0 / 86.0

Geni povezani s slovenskimi KVČB bolniki

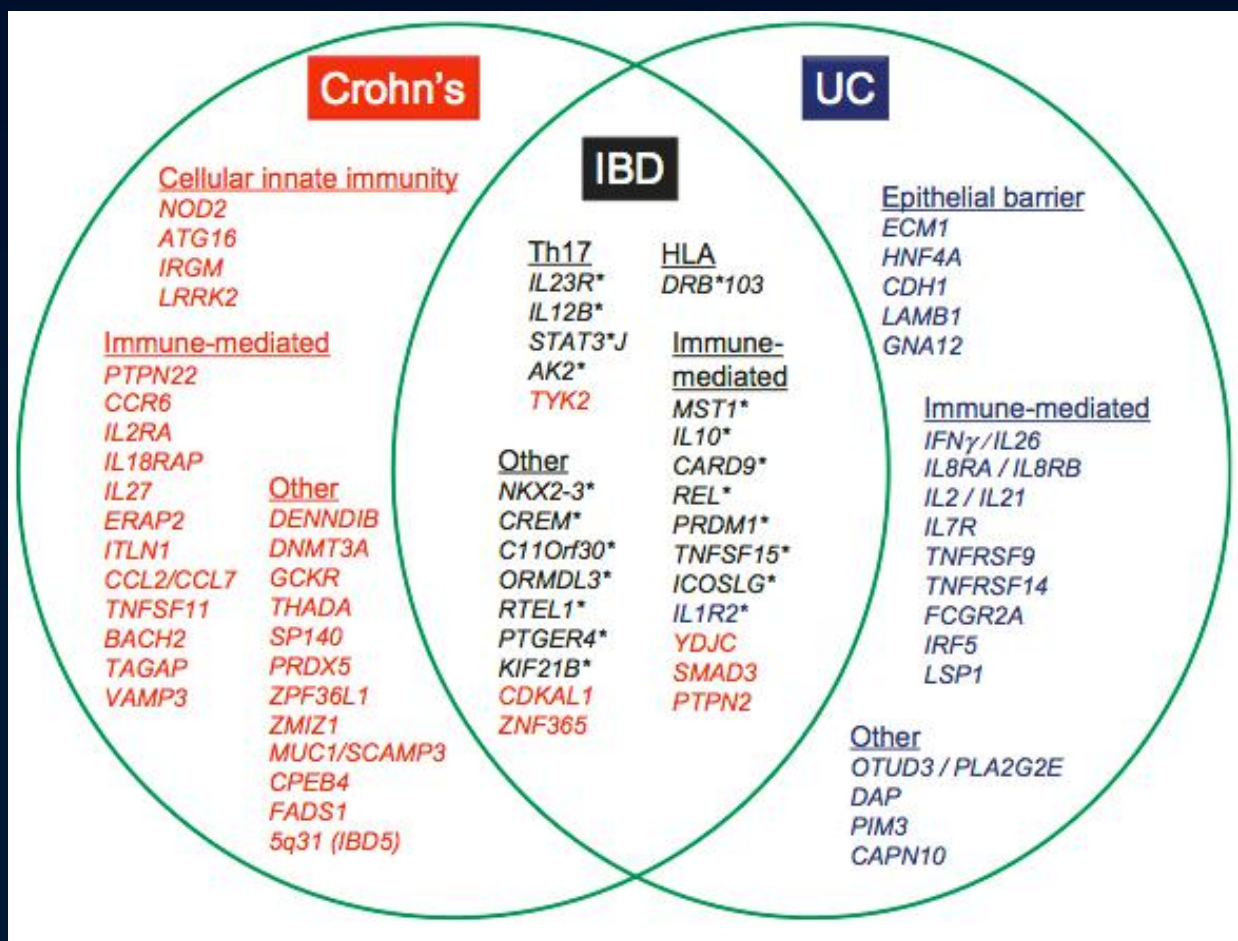
- 21/34 analiziranih SNPs v 19/30 genih/lokusih pozitivni pri KVČB bolnikih ali vsaj eni podskupini KVČB:
 - KVČB 9 genov, CB 9 genov, CB refraktorna 13 genov, UC 12 genov

Gene	SNP	AF controls (N=355)	AF Crohn (N=350)	AF ulcerative colitis (N=201)	p (Crohn vs controls)	p (ulcerative colitis vs controls)
NOD2/CARD15	rs2066847 (L1007fsn)	0,006	0,071	0,008	0,001 (OR=2,10)	0,815
NOD2/CARD15	rs2066845 (G908R)	0,006	0,016	0,009	0,035 (OR=1,45)	0,745
NOD2/CARD15	rs2066844 (R702W)	0,017	0,062	0,015	0,041 (OR=1,24)	0,656
IL23R	rs7517847 (int6G/T)	0,459	0,33	0,4	0,001 (OR=0,58)	0,13
CTLA4	rs3087243 (CT60)	0,443	0,367	0,299	0,047 (OR=0,68)	0,014 (OR=0,69)
PTGER4	rs10512734 (5p13A/G)	0,365	0,324	0,345	0,048 (OR=1,10)	0,032
SLC22A4	rs272893	0,405	0,462	0,5	0,068	0,016 (OR=1,47)
ICAM1	rs2542151	0,418	0,461	0,495	0,071	0,002 (OR=0,587)
ABCB1/MDR1	INTR 13	0,41	0,229 (refraktorni i Crohn)	0,324	0,014 (OR=0,43)	0,005 (OR=0,66)
PTPN22	rs2476601 (R620W)	0,075	0,117	0,086	0,038 (OR=1,19)	0,523
ORMDL	rs2872507	0,398	0,326	0,345	0,037 (OR=0,81)	0,524
SLC22A5	rs2631372 (G207C)	0,376	0,214	0,049	0,188	0,044



Genetika KVČB

- Meta-analiza do sedaj opravljenih GWA študij: 99 kandidatnih KVČB genetskih lokusov, 71 značilnih za Crohnovo bolezen, 47 značilnih za



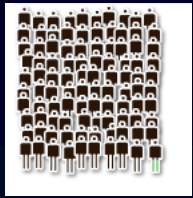
Prispevek posameznih genov k tveganju za KVČB

- Stitistično značilne povezave $p < 10^{-63}$
- Vsak posamezen gen le malo prispeva k tveganju (OR=1,08 (Chr 8q24) do 2,77 (IL23R))

SNP	Chr.	Critical region	P values			No. genes	Gene of interest	RAF	Risk allele	Odds ratios	
			Scan	Replication	Combined					Case Ctrl	TDT
Previously published loci											
rs11465804	1p31	67.4 ^a	1.01×10^{-35}	3.10×10^{-29}	6.66×10^{-63}	n.a.	<i>IL23R</i>	0.933	T	2.50	2.77
rs3828309	2q37	230.9 ^a	1.13×10^{-20}	7.67×10^{-14}	2.36×10^{-32}	n.a.	<i>ATG16L1</i>	0.533	G	1.28	1.30
rs3197999	3p21	48.73–49.87	2.16×10^{-7}	5.64×10^{-7}	1.15×10^{-12}	35	<i>MST1^b</i>	0.271	A	1.20	1.20
rs4613763	5p13	40.32–40.48	4.52×10^{-22}	2.79×10^{-8}	6.82×10^{-27}	0	<i>PTGER4^c</i>	0.125	C	1.32	1.28
rs2188962	5q31	131.44–131.90	4.58×10^{-9}	3.52×10^{-11}	2.32×10^{-18}	7		0.425	T	1.25	1.26
rs11747270	5q33	150.15–150.32	6.36×10^{-11}	2.57×10^{-7}	3.40×10^{-16}	3	<i>IRGM</i>	0.090	G	1.33	1.31
rs4263839	9q32	114.61–114.78	3.92×10^{-7}	6.58×10^{-5}	2.60×10^{-10}	2	<i>TNFSF15</i>	0.677	G	1.22	1.07
rs10995271	10q21	64.05–64.12	1.90×10^{-11}	1.61×10^{-10}	4.46×10^{-20}	1	<i>ZNF365</i>	0.387	C	1.25	1.53
rs11190140	10q24	101.26–101.32	1.71×10^{-10}	1.69×10^{-7}	3.06×10^{-16}	1	<i>NKX2-3</i>	0.478	T	1.20	1.28
rs2066847	16q12	49.3 ^a	n.a.	1.49×10^{-24}	2.98×10^{-24}	n.a.	<i>NOD2</i>	0.018	C	3.99	2.57
rs2542151	18p11	12.73–12.88	1.19×10^{-11}	2.41×10^{-7}	5.10×10^{-17}	1	<i>PTPN2</i>	0.152	G	1.35	1.14
Newly identified loci											
rs2476601	1p13	113.79–114.17	1.81×10^{-5}	0.000101	1.46×10^{-8}	7	<i>PTPN22</i>	0.899	G	1.31	1.17
rs2274910	1q23	157.65–157.72	3.50×10^{-7}	0.000481	1.46×10^{-9}	2	<i>ITLN1</i>	0.682	C	1.14	1.62
rs9286879	1q24	169.54–169.67	4.02×10^{-7}	0.000321	1.53×10^{-9}	0		0.243	G	1.19	1.08
rs11584383	1q32	197.60–197.77	6.82×10^{-7}	2.34×10^{-6}	1.43×10^{-11}	3		0.697	T	1.18	1.20
rs10045431	5q33	158.69–158.76	8.80×10^{-9}	3.66×10^{-6}	3.86×10^{-13}	1	<i>IL12B</i>	0.708	C	1.11	1.36
rs6908425	6p22	20.63–20.84	2.52×10^{-7}	0.000278	8.96×10^{-10}	1	<i>CDKAL1</i>	0.780	C	1.21	1.09
rs7746082	6q21	106.52–106.62	3.70×10^{-6}	7.70×10^{-6}	2.44×10^{-10}	0		0.289	C	1.17	1.19
rs2301436	6q27	167.32–167.52	3.30×10^{-7}	3.26×10^{-7}	1.04×10^{-12}	3	<i>CCR6</i>	0.463	T	1.21	1.16
rs1456893	7p12	50.03–50.11	4.92×10^{-5}	1.10×10^{-5}	4.60×10^{-9}	0		0.678	A	1.20	1.14
rs1551398	8q24	126.60–126.62	4.90×10^{-6}	0.000109	4.50×10^{-9}	0		0.619	A	1.08	1.25
rs10758669	9p24	4.94–5.26	6.80×10^{-7}	0.00043	3.46×10^{-9}	3	<i>JAK2</i>	0.348	C	1.12	1.21
rs17582416	10p11	35.30–35.60	8.48×10^{-6}	2.53×10^{-5}	1.79×10^{-9}	3		0.345	G	1.16	1.26
rs7927894	11q13	75.80–76.02	1.43×10^{-7}	0.000732	1.32×10^{-9}	1	<i>C11orf30</i>	0.386	T	1.16	1.07
rs11175593	12q12	38.61–39.31	1.33×10^{-7}	0.000165	3.08×10^{-10}	3	<i>LRRK2,MUC19</i>	0.017	T	1.54	1.44
rs3764147	13q14	43.13–43.54	1.61×10^{-7}	1.33×10^{-7}	2.08×10^{-13}	3		0.221	G	1.25	1.19
rs2872507	17q21	34.63–35.34	2.12×10^{-6}	0.000292	5.00×10^{-9}	17	<i>ORMDL3</i>	0.473	A	1.12	1.24
rs744166	17q21	37.74–37.95	5.94×10^{-6}	9.15×10^{-8}	6.82×10^{-12}	4	<i>STAT3</i>	0.565	A	1.18	1.25
rs1736135	21q21	15.73–15.76	2.06×10^{-5}	4.58×10^{-5}	7.40×10^{-9}	0		0.565	T	1.18	1.10
rs762421	21q22	44.43–44.48	1.08×10^{-5}	1.59×10^{-5}	1.41×10^{-9}	1	<i>ICOSLG</i>	0.389	G	1.13	1.21

IL23R (rs7517847)

G>T (T=bolezenski alel)



Zdrava populacija

GG: 18

GT: 55

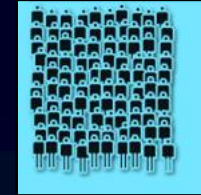
TT: 27

G: 46%

T: 54%

OR=2,77

$p=2,66 \times 10^{-63}$



KVČB bolniki

GG: 15

GT: 47

TT: 38

G: 38%

T: 62%



Naključna populacija

GG: 180

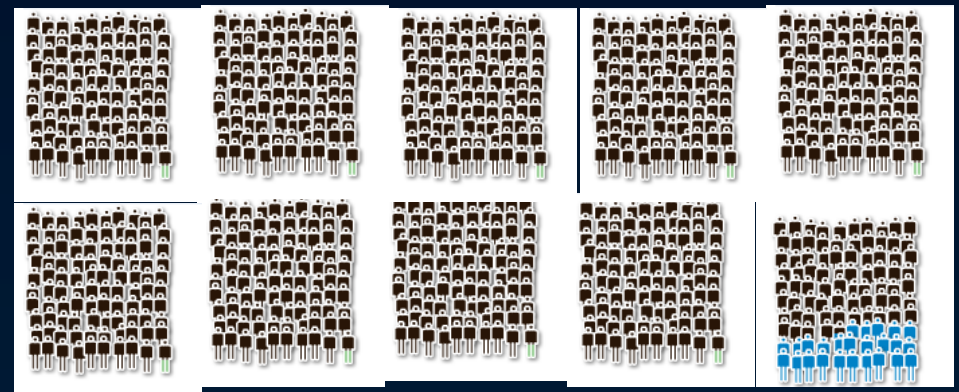
GT: 550

TT: 270

G: 46%

T: 54%

KVČB bolnikov: 5/1000



Genetsko rizična skupina:

GG: 0

GT: 0

TT: 1000

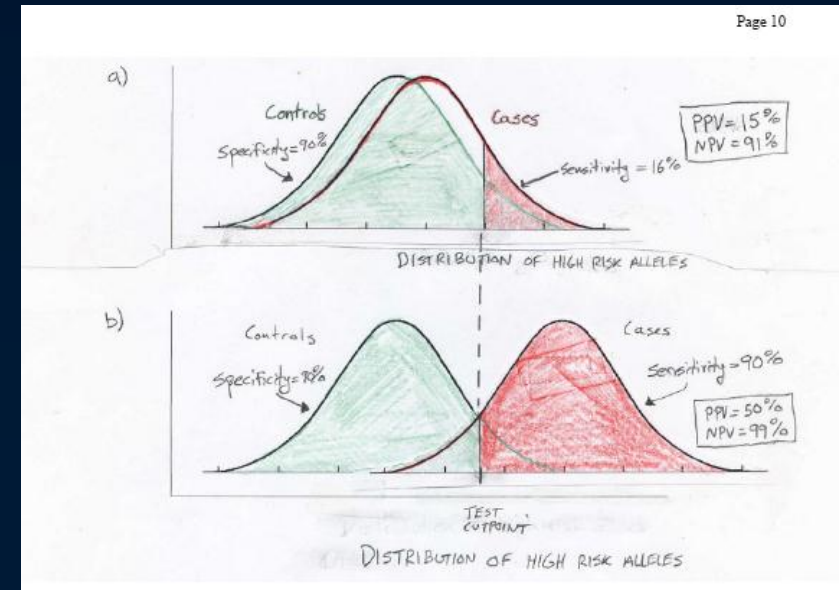
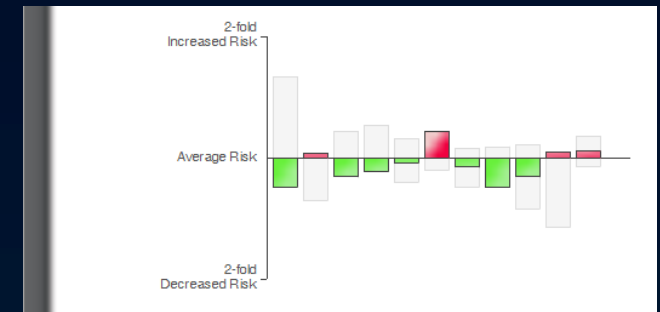
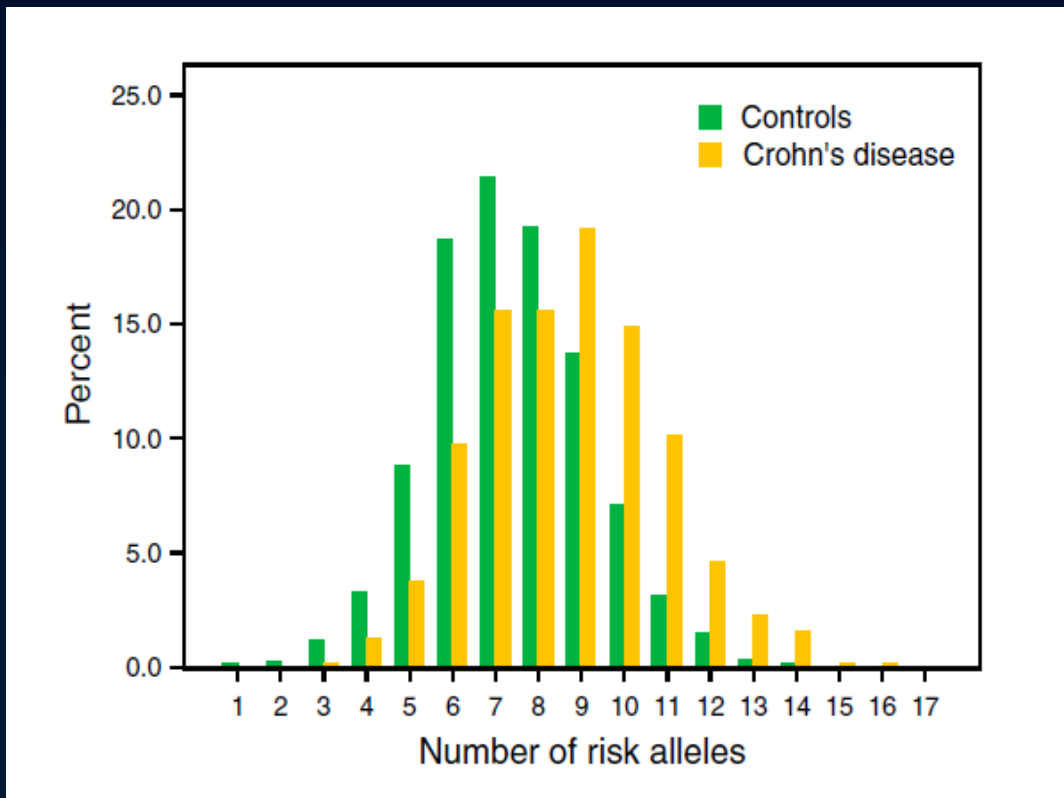
G: 0

T: 100%

KVČB bolnikov: 13/1000

Genetski profil

- Sestavljen iz 17 najbolj significantnih polimorfizmov SNP iz asociacijske študije
- največji delež Crohnovih bolnikov (CB) ima 9/17 bolezenske alelelov, največji delež kontrolne skupine zdravih posameznikov ima 6 bolezenskih alelov



Genetski profil

- OR naraste do 7,8 pri pogoju, da izraža več kot 14/17 testiranih polimorfizmov bolezenski alel
- specifičnost genetskega testa je 95% samo pri bolnikih z več kot 11/17 bolezenskimi aleli, vendar pa je v tem primeru občutljivost testa komaj 19%. V nasprotnem primer, če želimo povečati občutljivost testa na vsaj 95%, pa je specifičnost testa zgolj 15%, kar pa velja samo za bolnike, ki imajo za manj kot 7/17 bolezenskih alelov

$$\text{specifičnost} = \frac{\text{število pravilno negativnih}}{\text{število pravilno negativnih} + \text{število napačno pozitivnih}}$$

$$\text{občutljivost} = \frac{\text{število pravilno pozitivnih}}{\text{število pravilno pozitivnih} + \text{število napačno negativnih}}$$

pravilno negativni (true negative) = zdravi posamezniki pravilno spoznani kot zdravi
 napačno pozitivni (false positive) = zdravi posamezniki napačno spoznani kot bolani
 pravilno pozitivni (true positive) = bolniki pravilno diagnosticirani kot bolani
 napačno negativni (false negative) = bolniki napačno spoznani kot zdravi

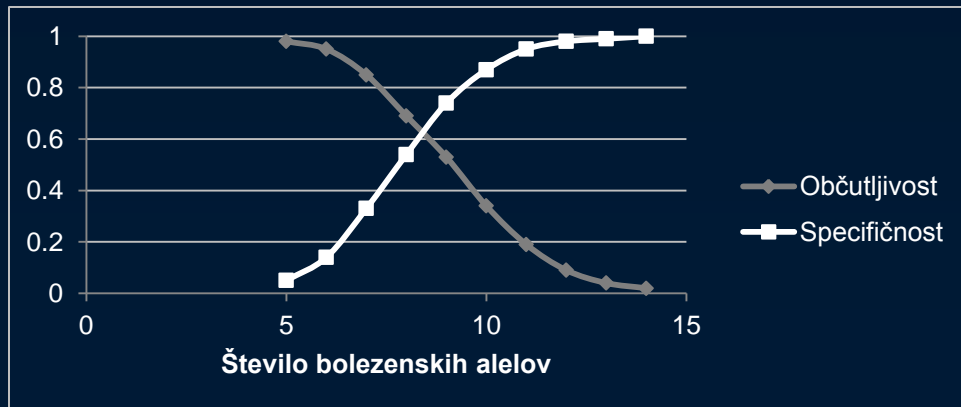


Table 5. Genetic risk profile based on the number of risk alleles in *NOD2*, *IL23R*, *ATG16L1*, *IRGM*, *NKX2-3*, 1q24, 5p13, *HERC2*, *CCNY*, and 10q21

No. risk alleles	CD frequency	Control frequency	OR	95% CI	P value	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV	NPV	LR+	LR-
≥5	0.65	0.35	3.28	1.88-5.71	2.70E-05	0.98	0.05	0.65	0.64	1.04	0.32
≥6	0.66	0.34	2.81	2.03-3.89	3.9E-10	0.95	0.14	0.66	0.59	1.10	0.39
≥7	0.69	0.31	2.69	2.16-3.35	1.28E-18	0.85	0.33	0.69	0.55	1.26	0.47
≥8	0.73	0.27	2.65	2.19-3.20	1.24E-23	0.69	0.54	0.73	0.50	1.51	0.57
≥9	0.78	0.22	3.19	2.61-3.89	8.56E-30	0.53	0.74	0.78	0.47	2.02	0.63
≥10	0.83	0.17	3.58	2.79-4.60	1.51E-23	0.34	0.87	0.83	0.43	2.70	0.75
≥11	0.86	0.14	4.12	2.89-5.85	3.33E-15	0.19	0.95	0.86	0.40	3.52	0.85
≥12	0.88	0.12	4.36	2.56-7.42	5.69E-08	0.09	0.98	0.88	0.38	4.05	0.93
≥13	0.92	0.08	6.62	2.64-16.61	5.58E-05	0.04	0.99	0.92	0.37	6.37	0.96
≥14	0.93	0.07	7.83	1.85-33.02	5.10E-03	0.02	1.00	0.93	0.37	7.68	0.98

CD, Crohn's disease; CI, 95% confidence interval; LR+, positive likelihood ratio; LR-, negative likelihood ratio; NPV, negative predictive value; OR, odds ratio; PPV, positive predictive value.

Farmakogenetska študija-adalimumab (humira)

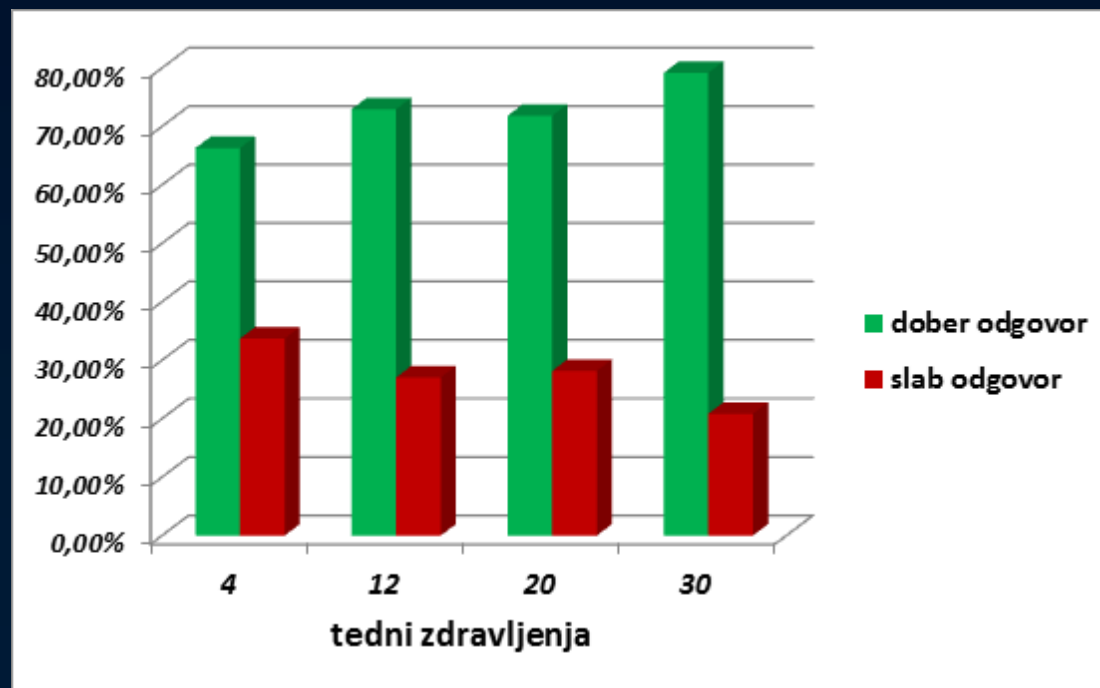
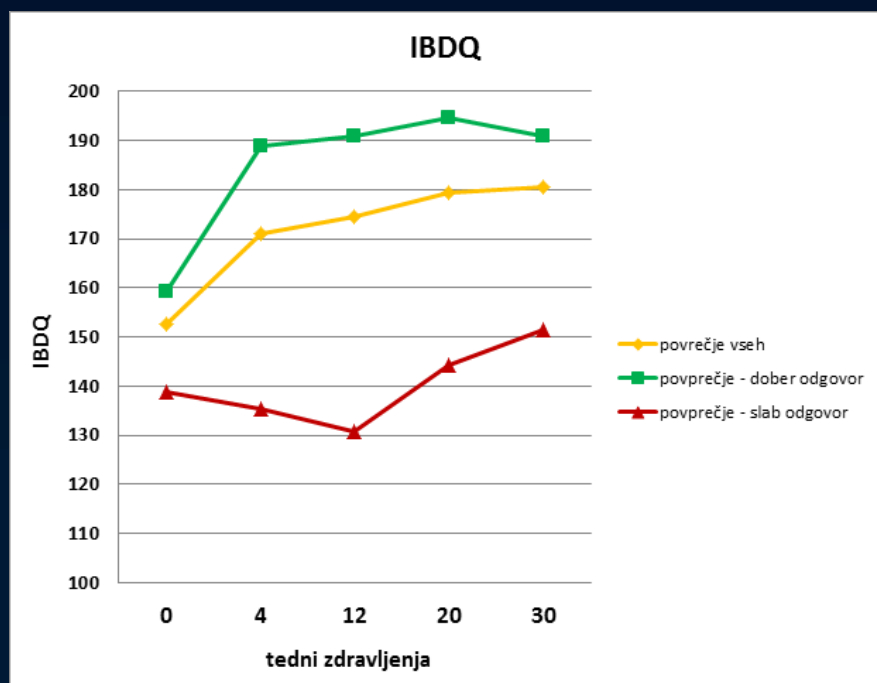
- Namen študije: ugotoviti polimorfizme in gene, ki so povezani z odzivom na adalimumab pri slovenskih bolnikih s Crohnovo boleznijo
- Vključenih 107 bolnikov s Crohnovo boleznijo, ki se zdravijo z biološkim zdravilom adalimumab (Humira)
 - Inclusion criteria: not responding to standard therapy: 5-aminosalicylates 4.5 g/day given for at least 2 months; antibiotics (metronidazole 1.2g/day and/or ciprofloxacin 1g/day) given for at least 1 month; 6-methyl-prednisolone (corticosteroids) 42 mg/day given for at least 2 months ; azathioprine (AZA) 2.5mg/kg/day given for at least 6 months
- Blood samples collected before treatment (week 0) and in 2, 4, 6, 12, 20 and 30 weeks after first treatment
- IBDQ questionnaire completed and IBDQ index calculated before treatment and 2, 4, 6, 12, 20 and 30 weeks after first treatment
- biochemical and immunological parameters (including CRP) analyzed before treatment and 2, 4, 6, 12, 20 and 30 weeks after first treatment
- colon biopsy taken before and during treatment
- DNA, RNA, proteins isolated from blood for genotyping and microarray expression; blood serum kept for proteomics and biochemical analysis, erythrocytes kept for fatty acid profiling

Demografski in klinični podatki

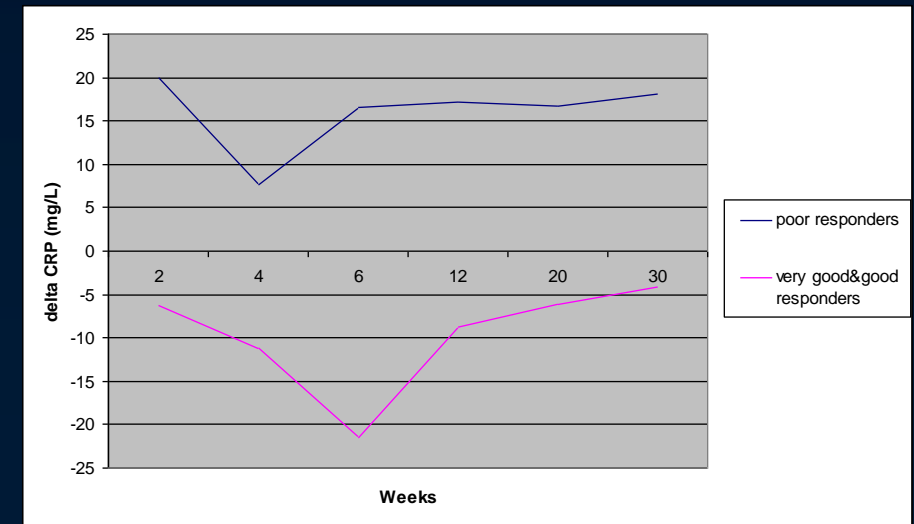
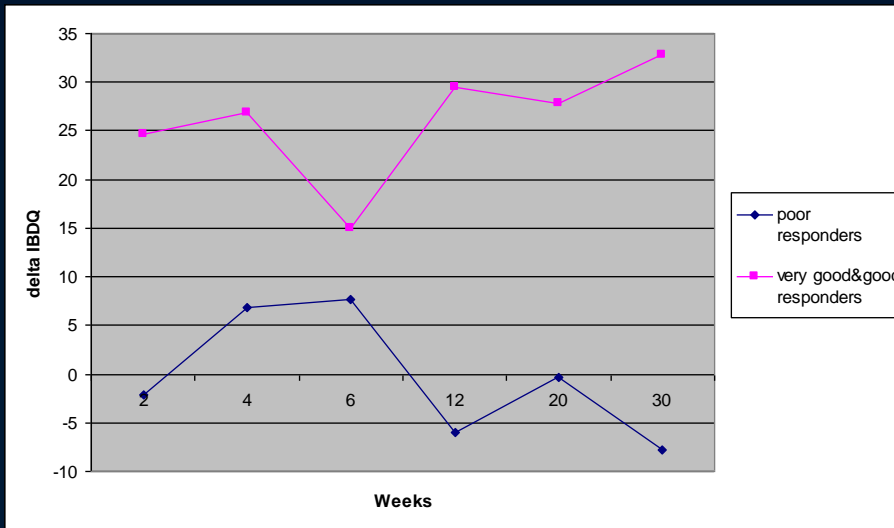
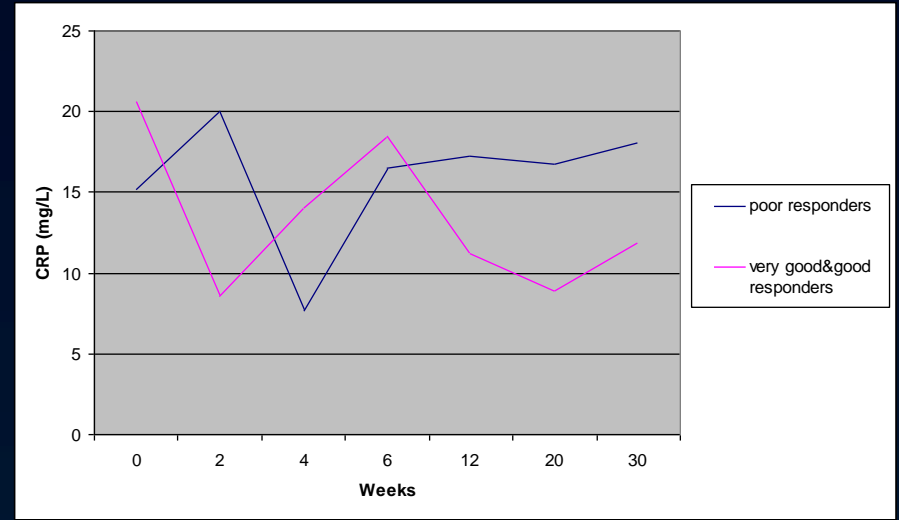
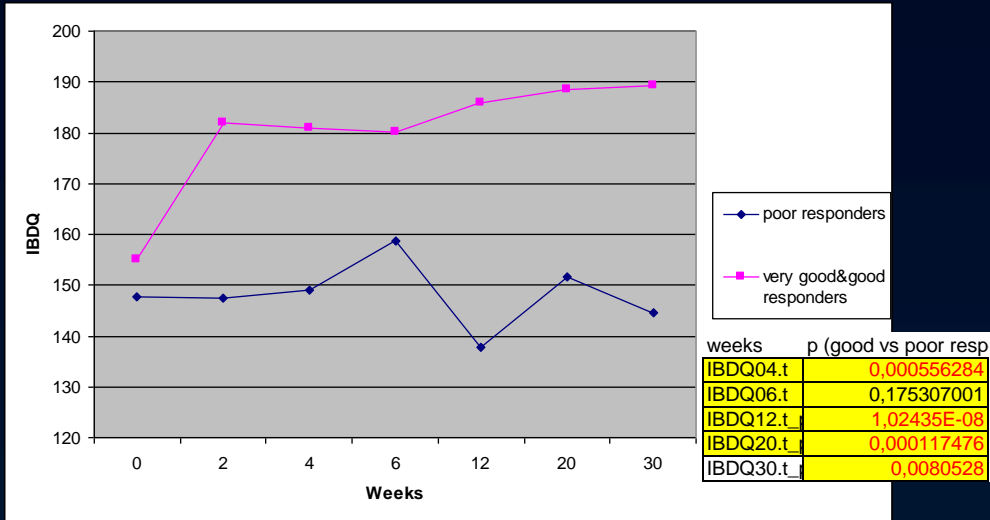
Clinical Characteristics		CD patients (N = 107)
Age	Mean +/- SD* current in study	40,41 +/- 11.88
Sex	Male/Female (%)	47.62 / 52.38
Age at diagnosis	A1 below 17 years (%)	9,33%
	A2 between 17 and 40 years (%)	72,00%
	A3 above 40 years (%)	18,67%
Location	L1 Ileal (%)	18.56
	L2 Colonic (%)	30.93
	L3 Ileocolonic (%)	50.52
	L4 Isolated upper disease	8.11
Behaviour	B1 non-stricturing, non-penetrating (%)	11.11
	B1p perianal non-stricturing, non-penetrating (%)	25.00
	B2 stricturing (%)	16.67
	B2p perianal structuring (%)	22.22
	B3 penetrating (%)	13.89
	B3p perianal penetrating (%)	11.11
Fistula	Yes/No (%)	53.03 / 46.97
Smoker	Yes/No (%)	21.15 / 78.85
Previous surgery	Yes/No (%)	62.82 / 37.18

Odziv na adalimumab v prvih 30 tednih zdravljenja

- Kriterij za dober odziv: IBDQ >170 ali deltaIBDQ >22

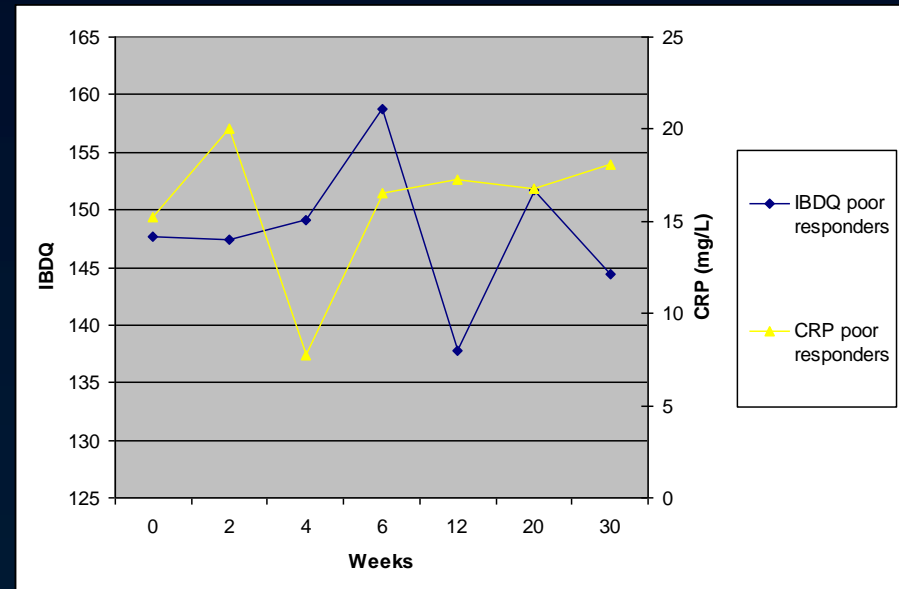
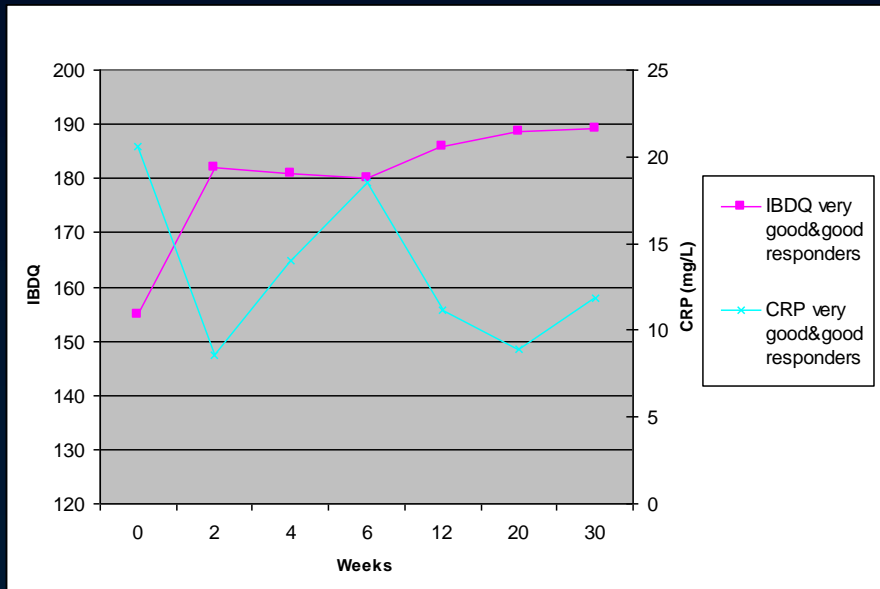


IBDQ and CRP in good and poor responders during adalimumab treatment



Delta IBDQ and delta CRP: change from starting value before treatment (week 0)

IBDQ and CRP corellation



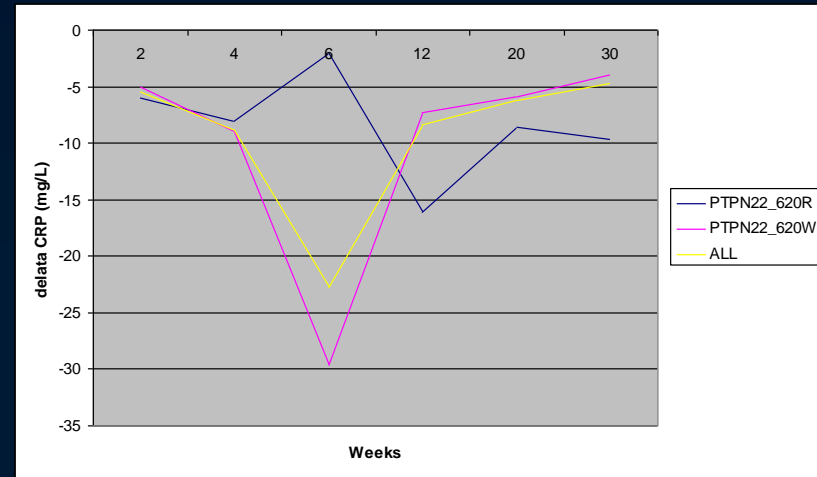
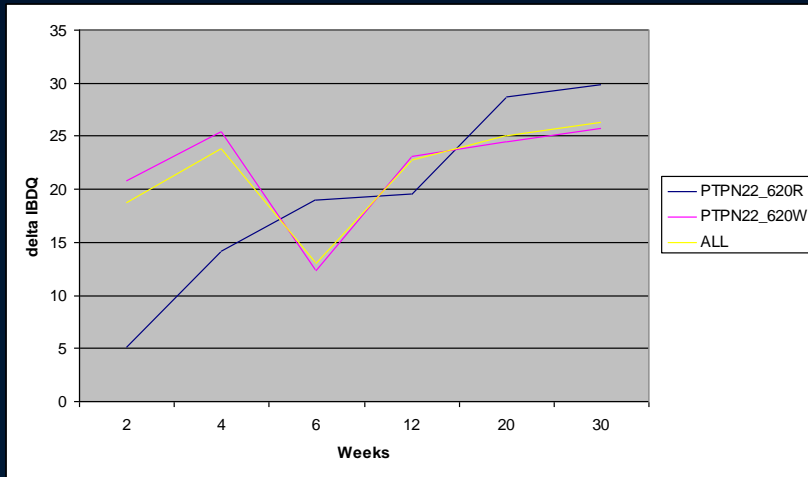
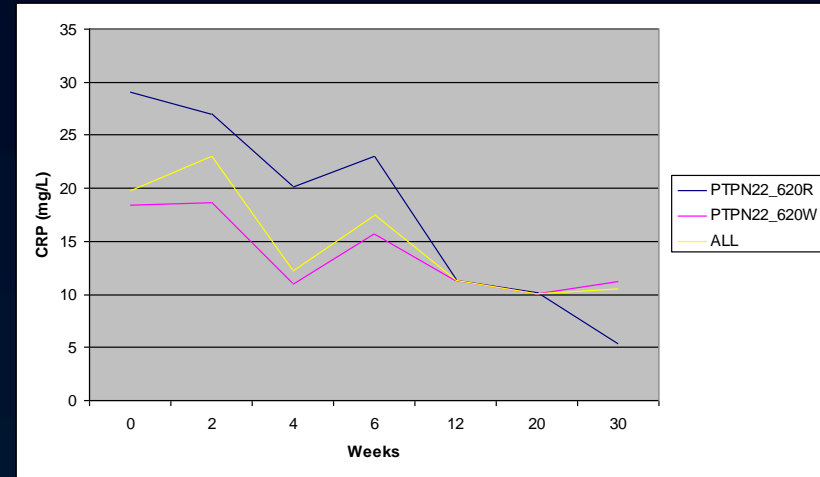
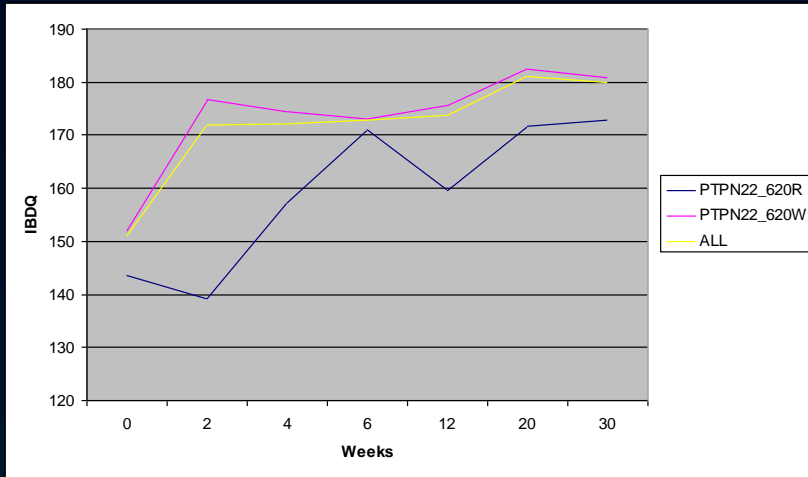
$R=0,91$

Allele distribution in good and poor responders

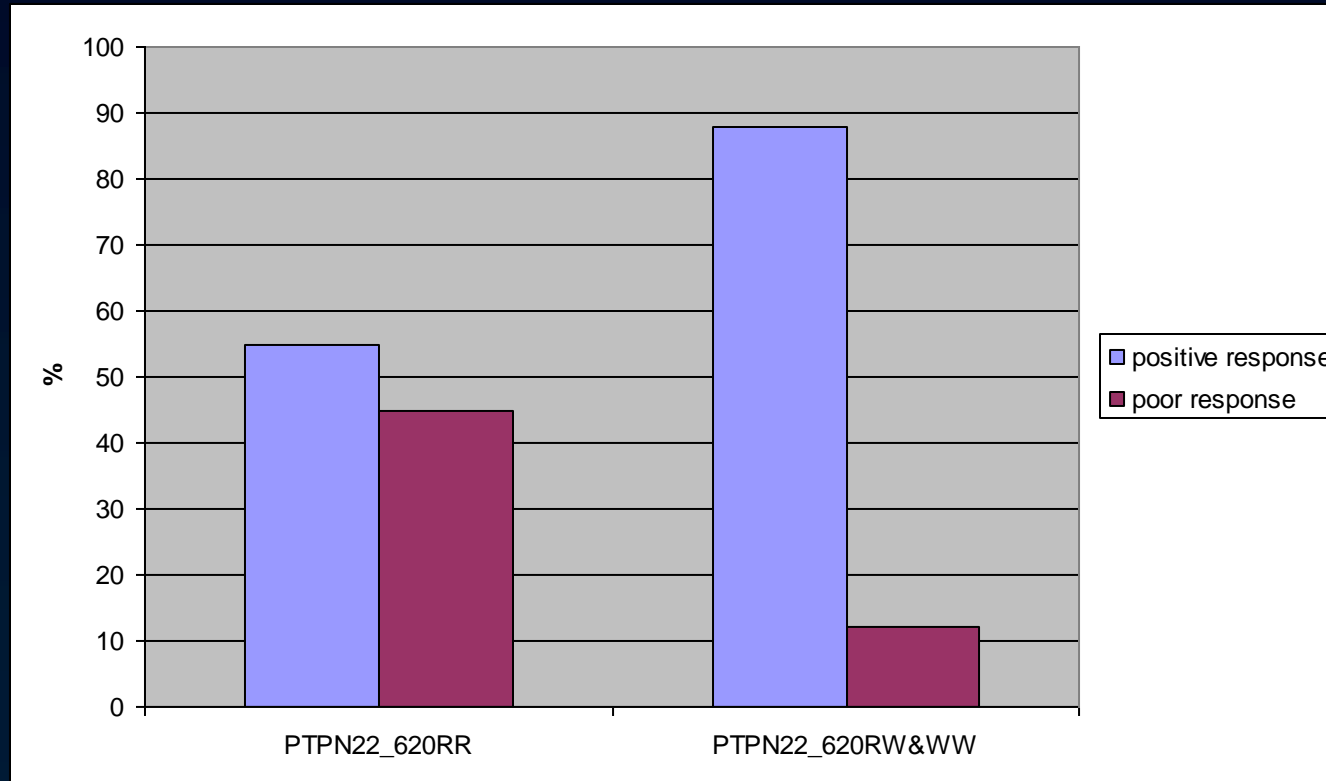
Gene	SNP	AF controls (N=100)	AF Crohn (N=89)	p (Crohn vs controls)	AF Very good&good responders (VG&G, N=69)	p (VG&G vs controls)	AF Poor responders (N=18)	p (Poor vs controls)	p (VG&G vs poor)
NOD2	rs2066847 (L1007fsn)	0,006	0,074	0,001	0,071	0,002	0,083	0,017	0,730
NOD2	rs2066845 (G908R)	0,006	0,025	0,196	0,016	0,571	0,056	0,075	0,219
IL23R	rs7517847 (int6G/T)	0,459	0,302	0,003	0,294	0,004	0,333	0,198	0,683
CTLA4	rs3087243 (CT60)	0,439	0,386	0,376	0,395	0,479	0,353	0,450	0,696
PTGER4	rs10512734 (5p13A/G)	0,365	0,315	0,393	0,324	0,514	0,286	0,524	0,820
PTPN22	rs2476601 (R620W)	0,075	0,117	0,256	0,102	0,523	0,167	0,106	0,372
ORMDL	rs2872507	0,398	0,386	0,825	0,377	0,724	0,417	0,854	0,701
SLC22A5	rs2631372 (G207C)	0,376	0,214	0,049	0,188	0,044	0,300	0,746	0,660

AF=allele frequency

IBDQ and CRP in *PTPN22* allelic groups during adalimumab treatment



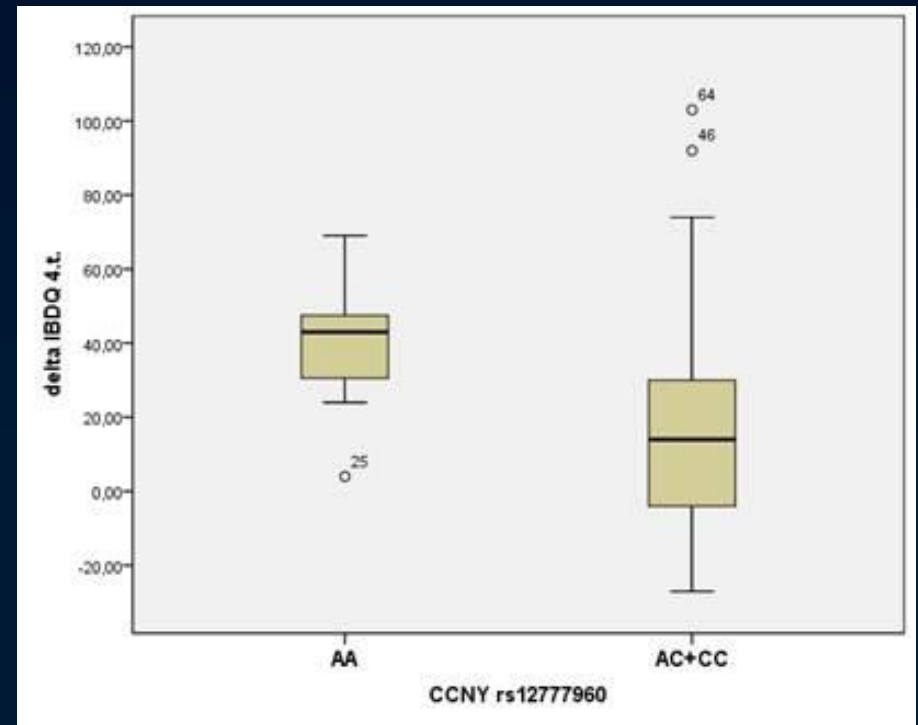
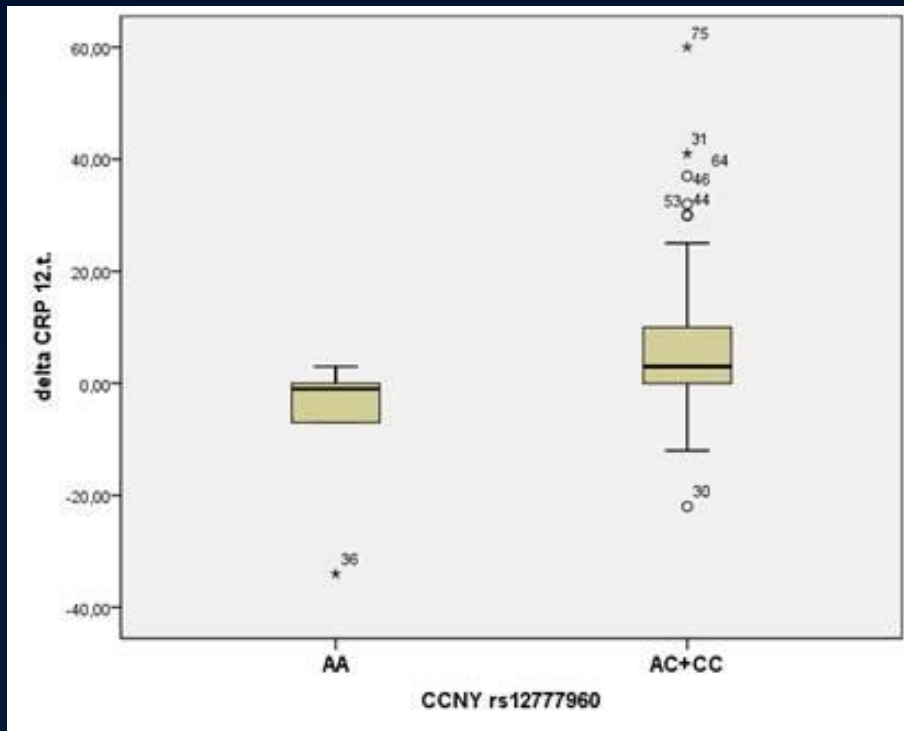
Response to adalimumab 2 weeks after first application according to *PTPN22* R620W genotype in patients with starting levels of CRP >15 mg/L



P=0,023; OR=1,42; 95%CI 1,21-1,65

Gen CCNY je povezan z odzivom na adalimumab

- delta CRP 12.t., $p = 0,042$ (t-test), $p = 0,035$ (Mann-Whitney test)
- (večji kot je delta CRP, bolj se zniža po tednih zdravljenja – boljši učinek)
- večji delta CRP pri genotipu **AC+CC** – boljši učinek
- delta IBDQ 4.t., $p = 0,049$ (t-test), $p = 0,020$ (Mann-Whitney test): večji delta IBDQ pri **AA** genotipu – boljši odgovor



Primerjava alelov in genotipov v slovenski populaciji med bolniki s CB in zdravimi posamezniki

Apoptozni geni

Gen	dbSNP ID	Lokacija	Frekvence genotipov – kontrolna skupina	Frekvence genotipov v - CB	Kontrolna skupina vs. CB genotipi 11	Kontrolna skupina vs. CB genotipi 22	Alelni frekvenci – kontrolna skupina	Alelni frekvenci - CB	
FAS	rs1800682	10q24.1	n= 88 C/C:18,18 % C/T:47,72 % T/T:34,09%	n= 104 C/C:20,19 % C/T:52,88 % T/T:26,92%	C/C vs. C/T in T/T $p = 0,855$ OR= 0,878 95% CI = 0,426-1,810	C/C in C/T vs. T/T $p = 0,344$ OR= 0,712 95% CI = 0,384-1,322	C:0,42 T:0,58	C: 0,46 T: 0,53	$p = 0,410$ OR= 0,830 95% CI = 0,554 – 1,244
CASP-9	rs4645983	2q33.1	n= 88 C/C:78,41 % C/T:14,77 % T/T:6,82%	n= 93 C/C:60,22 % C/T:16,13 % T/T:23,66%	C/C vs. C/T in T/T $p = 0,010$ OR= 0,417 95% CI = 0,216-0,803	C/C in C/T vs. T/T $p = 0,002$ OR= 0,236 95% CI = 0,091-0,615	C:0,86 T:0,14	C: 0,68 T: 0,31	$p = 9,9 \cdot 10^{-5}$ OR=0,356 95% CI = 0,211–0,602
FCGR3A	rs396991	1q23	n= 91 G/G:10,99 % G/T:43,95 % T/T:45,06%	n= 105 G/G:25,71 % G/T:40,95 % T/T:33,33%	G/G vs. G/T in T/T $p = 0,010$ OR= 0,357 95% CI = 0,162-0,785	G/G in G/T vs. T/T $p = 0,107$ OR= 0,610 95% CI = 0,342-1,088	G:0,33 T:0,67	G: 0,46 T: 0,54	$p = 0,010$ OR=0,573 95% CI = 0,380–0,864
TIMP-1 ženske	rs4898	Xp11.3-p11.23	n=47 C/C:23,40 % C/T:46,81 % T/T:29,79%	n= 53 C/C:26,42 % C/T:41,51 % T/T:32,08%	C/C vs. C/T in T/T $p = 0,819$ OR= 1,175 95% CI = 0,473-2,920	C/C in C/T vs. T/T $p = 0,832$ OR= 0,898 95% CI = 0,384-2,103	C:0,47 T:0,53	C: 0,47 T: 0,53	$p = 1,000$ OR= 1,015 95% CI = 0,582 – 1,770
TIMP-1 moški	rs4898	Xp11.3-p11.23	n= 41 C/C:53,66 % T/T:46,34%	n= 52 C/C:36,53 % T/T:63,47%	$p = 0,141$ OR = 0,497 95% CI = 0,216-1,145		C:0,54 T:0,46	C: 0,37 T: 0,63	$p = 0,141$ OR = 0,497 95% CI = 0,216-1,145

Odgovor na adalimumab

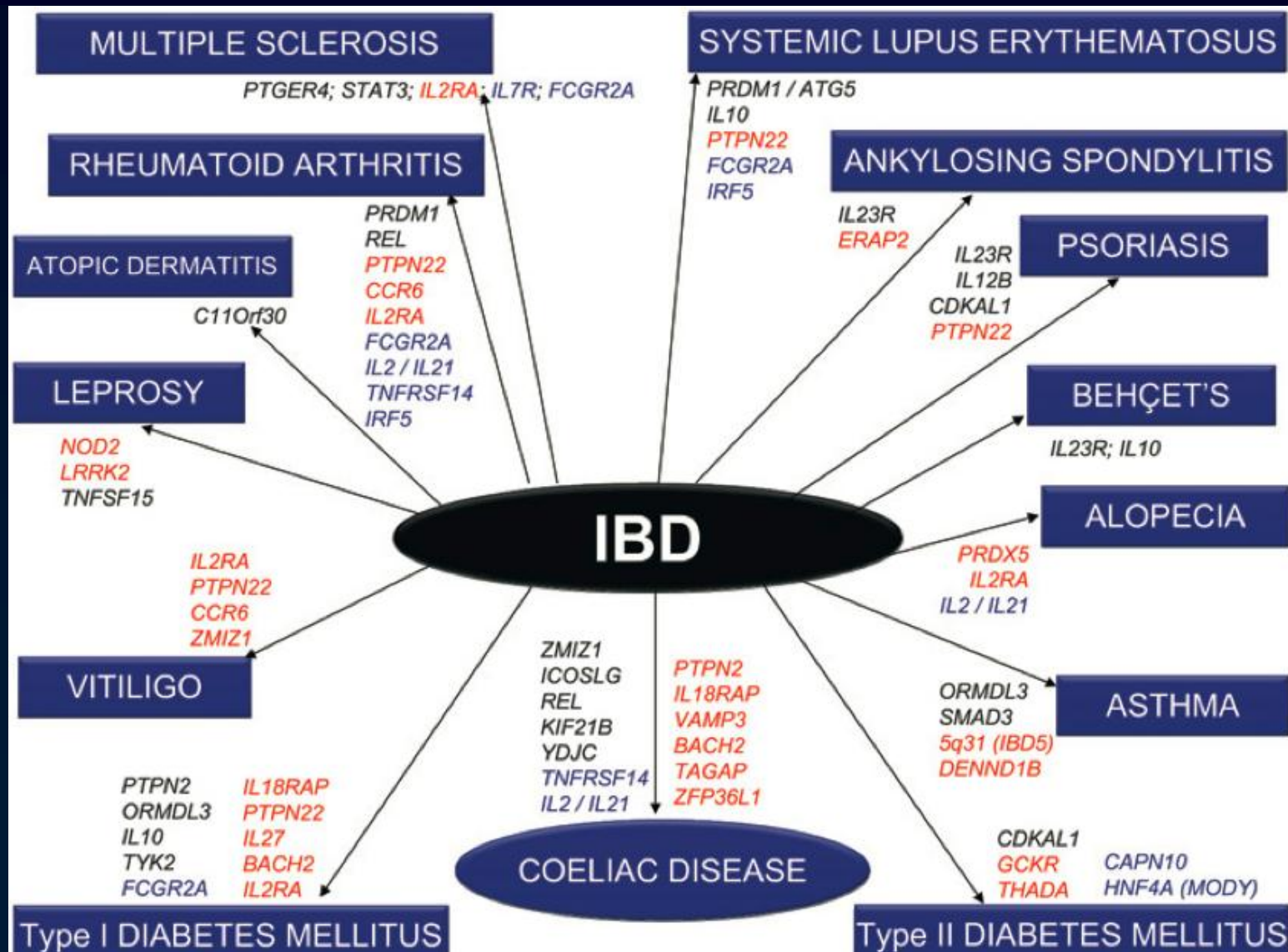
Apoptozni geni

			ΔIBDQ				ΔIBDQ			
Gen	dbSNP ID	parametri	4. teden	12. teden	20. teden	30. teden	4. teden	12. teden	20. teden	30. teden
FAS	rs1800682		C/C vs. C/T in T/T				C/C in C/T vs. T/T			
		n	83	80	67	66	83	80	67	66
		p	0,593	0,413	0,555	0,527	0,450	1,000	0,555	0,773
		OR	1,429	0,563	0,686	0,580	1,619	1,069	1,458	0,724
		95% CI	0,485-4,205	0,185-1,710	0,203-2,312	0,156-2,158	0,596-4,395	0,387-2,955	0,433-4,917	0,234-2,241
CASP9	rs4645983		C/C vs. C/T in T/T				C/C in C/T vs. T/T			
		n	72	69	58	72	72	69	58	72
		p	0,050	0,144	0,031	0,052	0,812	1,000	0,593	0,274
		OR	0,278	0,392	0,207	0,230	0,826	0,982	0,711	0,514
		95% CI	0,086-0,899	0,122-1,265	0,051-0,848	0,061-0,871	0,323-2,112	0,366-2,632	0,242-2,089	0,172-1,534
FCGR3A	rs396991		G/G vs. G/T in T/T				G/G in G/T vs. T/T			
		n	85	82	67	67	85	82	67	67
		p	0,087	0,466	1,000	1,000	0,100	1,000	1,000	1,000
		OR	2,601	1,560	0,924	1,140	2,333	1,121	1,064	1,122
		95% CI	0,939-7,204	0,599-4,060	0,328-2,600	0,408-3,184	0,906-6,006	0,444-2,827	0,367-3,084	0,368-3,425
TIMP-1	rs4898		C/C vs. C/T in T/T				C/C in C/T vs. T/T			
		n	84	81	67	66	84	81	67	66
		p	1,000	0,638	1,000	0,422	1,000	0,659	1,000	1,000
		OR	1,074	0,760	0,940	0,587	0,991	0,792	1,067	0,911
		95% CI	0,433-2,666	0,297-1,948	0,324-2,726	0,198-1,740	0,420-2,336	0,330-1,900	0,408-2,788	0,344-2,412

„ImmunoChip“ preliminarni rezultati

- Preliminarni rezultati za 11.209 CB bolnikov, 9.430 UC bolnikov, 12.023 kontrol
- 50 novih genov/lokusov povezanih s KVČB ($p < 5 \times 10^{-8}$), kar pomeni skupno število do sedaj odkritih KVČB genov ~150
- >10 novih genov je specifično povezanih s CB
- >5 genov je specifično povezanih z UC,
- Mnogo genov, ki so bili predhodno povezani z drugimi kroničnimi imunskimi boleznimi kot so revmatoidni artritis, celiakija, multipla skleroza, sladkorna tipa 1, psoriza, sistemski lupus eritromatoza, je sedaj potrjenih tudi v povezavi s KVČB
- Mnogo genov, ki so bili predhodno specifično povezani s CB, je sedaj potrjenih z UC in obratno

Skupni in specifični geni za kronične imunske bolezni

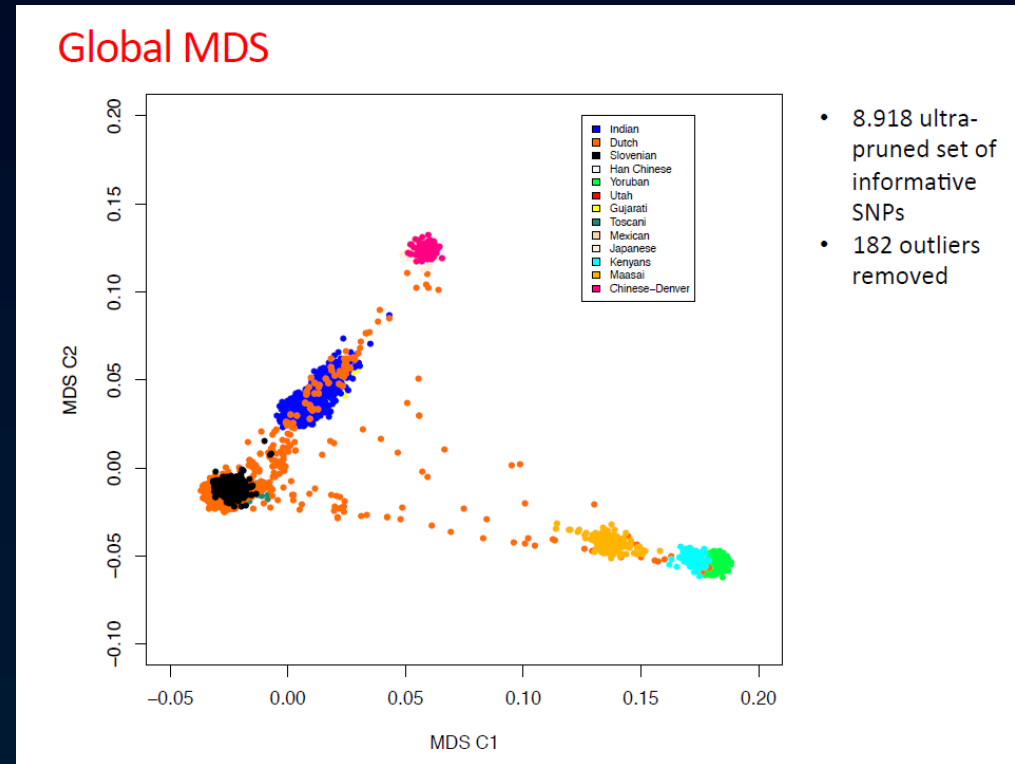


Quality control (QC)

- QC-per individual followed by QC by SNP

QC-per individual

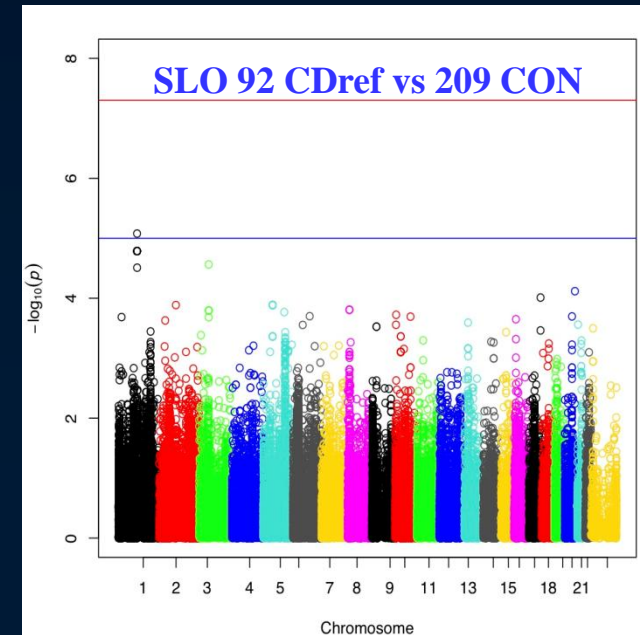
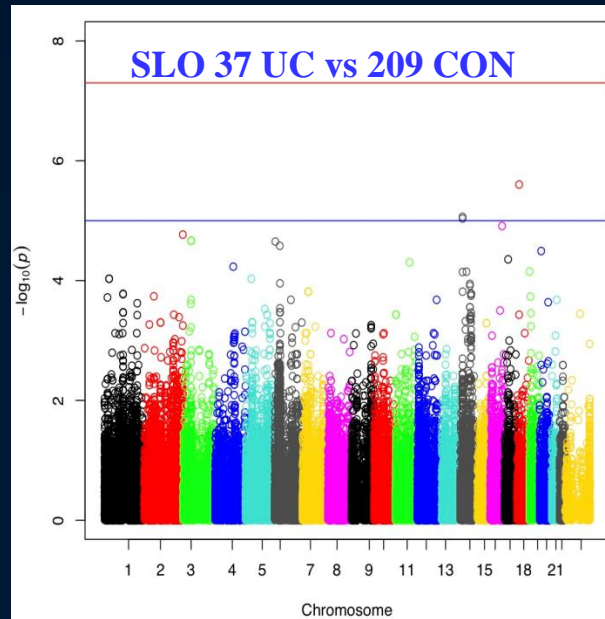
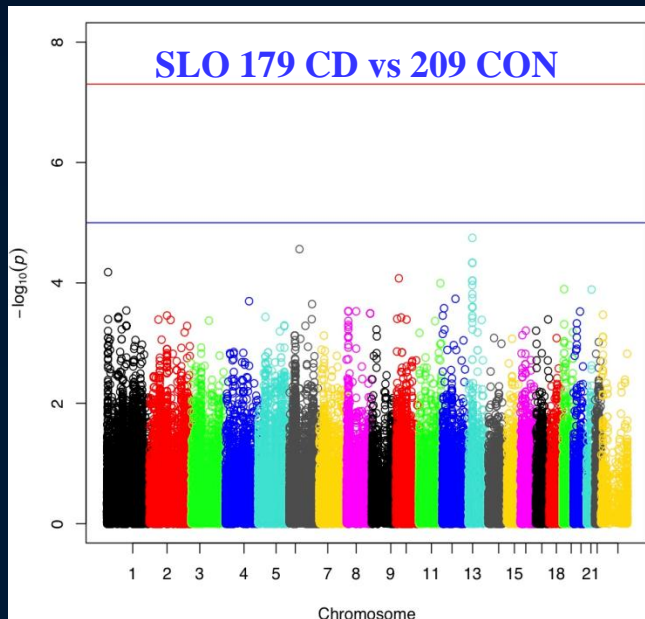
- Remove duplicates (13 samples)
- Remove samples with call rate > 0.98 (380 samples)
- exclude individuals based on elevated missing data rates or extreme heterozygosity (8 samples)
- Remove related individuals with PI_HAT > 0.185 (226 samples)
- Conduct various MDS plots to remove outliers (193 samples = 182 global, 11 local MDS)



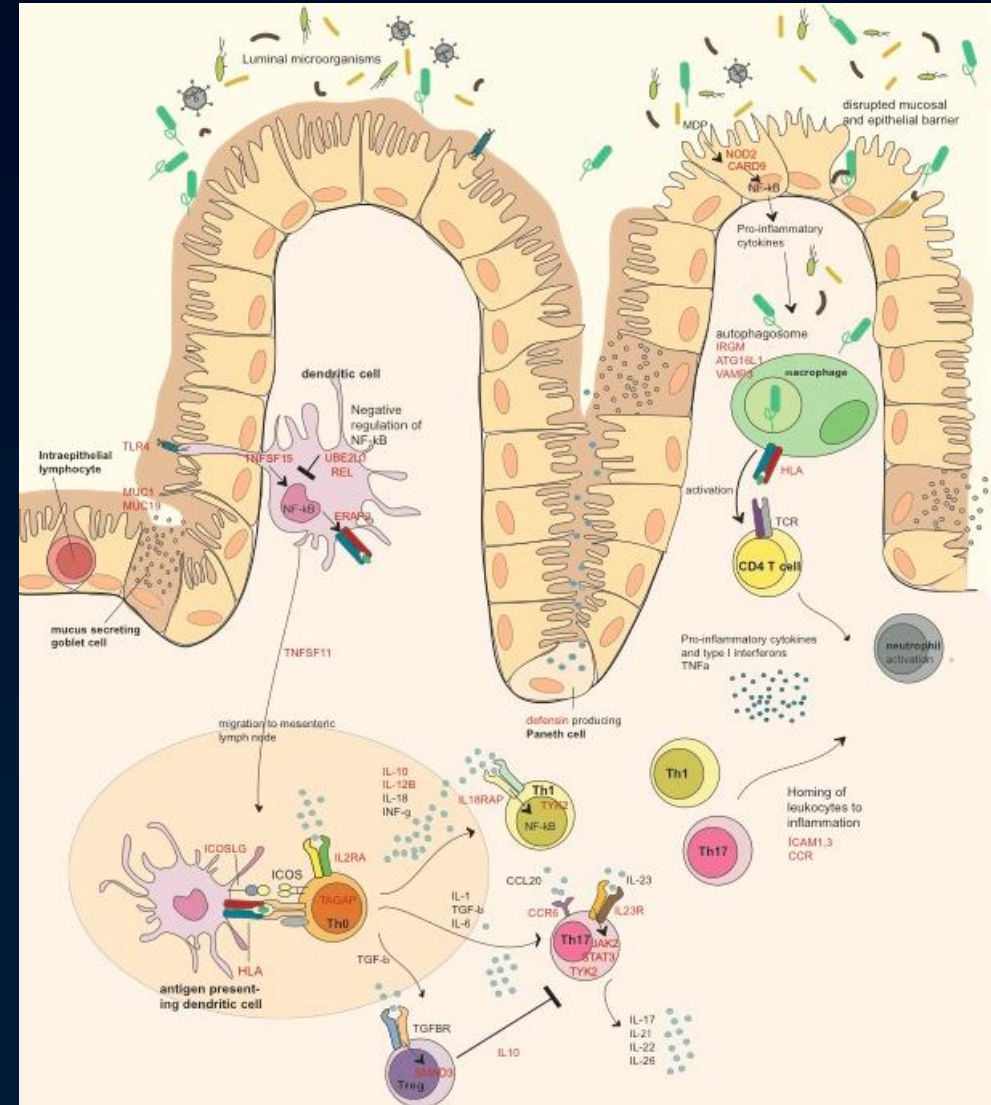
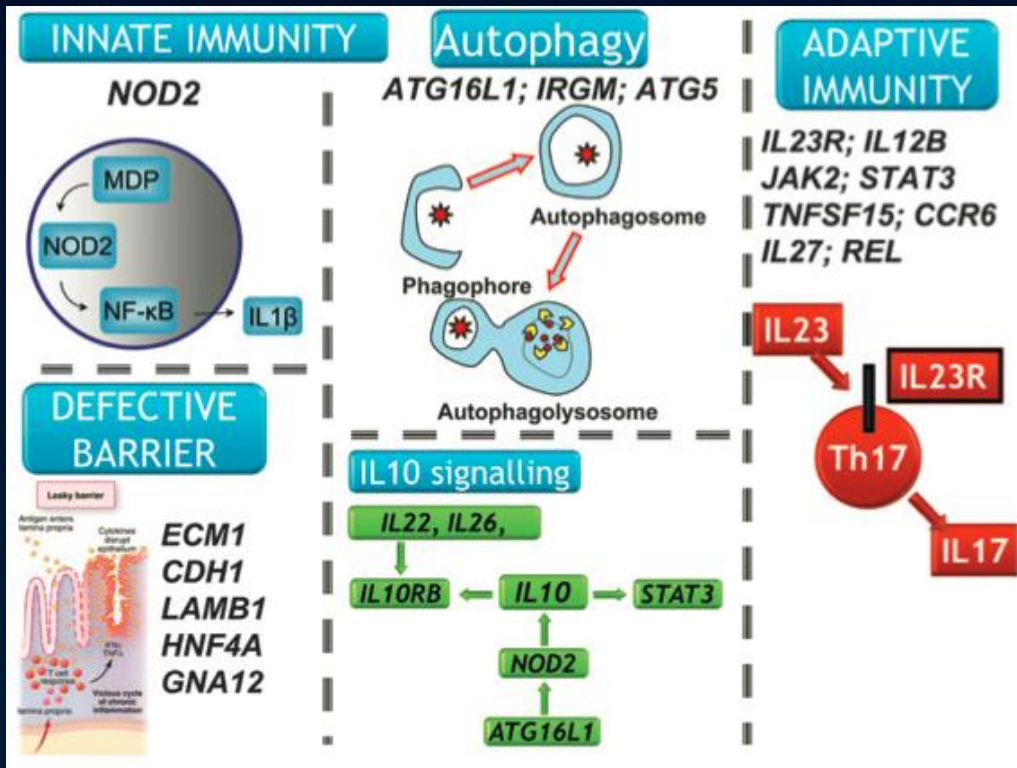
		Pre-QC				Post-QC				
Population	CD	UC	IBD undetermined	Total IBD	controls	CD	IBD undetermined	UC	Total IBD	controls
Dutch	1370	892	2	2264	1806	1050	2	671	1723	1374
Slovenian	202	39	15	256	236	168	11	37	216	210
Total	1572	931	17	2520	2042	1218	13	708	1939	1584

Slovenian IBD results

- CD: 137 SNPs (40 loci) with $p < 10^{-3}$; 12 SNPS (4 loci) $p < 10^{-4}$
- CDref: 171 SNPs (24 loci) with $p < 10^{-3}$; 16 SNPS (4 loci) $p < 10^{-4}$
- UC: 25 SNPs (13 loci) with $p < 10^{-4}$; 3 SNPS (2 loci) $p < 10^{-5}$
- Potential SLO specific IBD genes: 5 loci with $p < 10^{-3}$ not significant in Dutch population



Molekularno biološki mehanizmi KVČB patogeneze



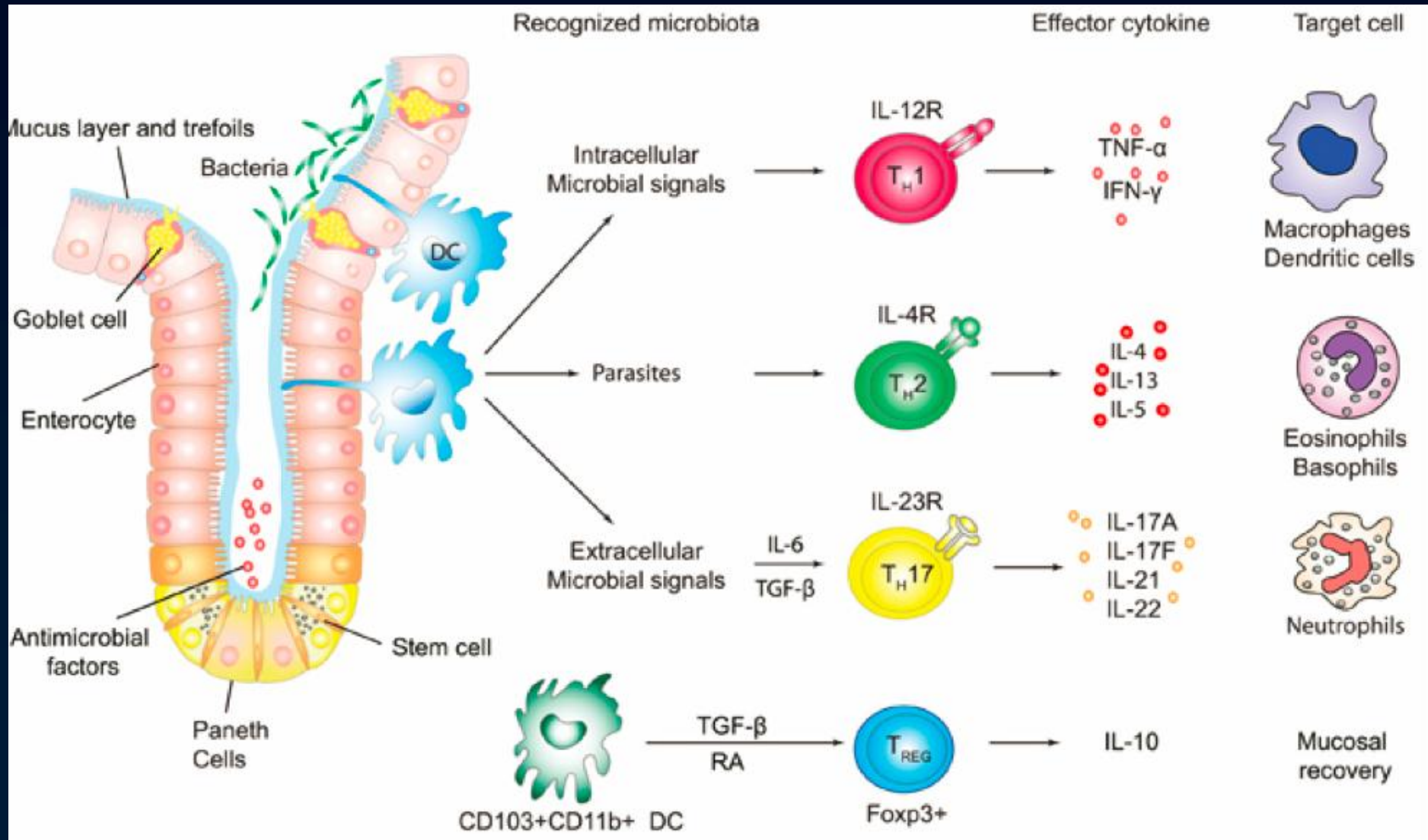
Patogeneza CB

Okvara prvih mehanizmov obrambe, t.j. okvare v epitelni in mukusni barieri olajšajo vdor mikrobov (*MUC1* in *MUC19*). Povezave med CB in geni za prepoznavanje mikroorganizmov (*NOD2*, *TLR4* in *CARD9*) kažejo na povečan odziv APC na komenzalne mikroorganizme. Posledično se aktivira kaskada NF- κ B (*TNFSF15*), kar vodi do sproščanja pro-vnetnih citokinov.

Avtofagija prav tako prispeva k dovzetnosti za CB (*ATG16L1*, *IRGM* in *VAMP3*). V avtofagosomih pride do razkroja intracelularnih komponent, kot tudi fagocitiranih mikrobov do ustreznih antigenov, ki so nato predstavljeni CD4+ celicam. Aktivacija CD4+ vodi do sproščanja pro-vnetnih citokinov in vzdrževanje vnetja. Povezave med CB in *REL* in *UBE2L3* pa nakazujejo na moteno delovanje povratne zanke NF- κ B. APC migrirajo do Peyerjevih plošč (črevesne mezenterične bezgavke) (*TNFSF11*), kjer predstavijo antigene in spodbudijo proliferacijo (*IL2RA* in *TAGAP*) in diferenciacijo T-celic. Posledično je odziv T-celic pri bolnikih s CB intenzivnejši. Naivne (Th0) T-celice se diferencirajo v različne podtipe, odvisno od prisotnih citokinov. Celice pomagalke Th17 so bile povezane s številnimi imunskimi boleznimi. Njihova aktivacija poteka preko receptorja IL23R, ki aktivira signalno pot JAK-STAT-TYK. Slednje vodi do povečanega sproščanja pro-vnetnih citokinov (JAK2, STAT3 and TYK2). Celice Th1 in Th17 delujejo pro-vnetno, za razliko od regulatornih celic T-reg, ki zavirajo imunski odziv.

Omenjeni procesi se v končni fazi kažejo v migraciji leukocitov na mesta vnetja (ICAM1 in 3, klaster CCR) in regrutaciji nevtrofilcev. Posledice so kronično vnetje, razjede, tvorba granulomov (večjedrne celice velikanke, sestavljene iz makrofagov in limfocitov) ter še povečan vdor mikrobov skozi mukusno-epitelno bariero v lamino propio.

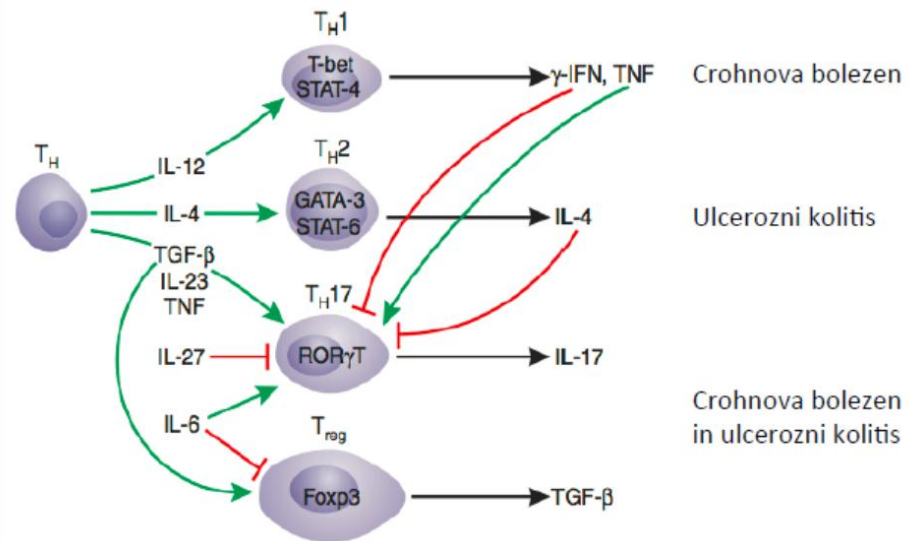
Molekularno biološki mehanizmi KVČB patogeneze



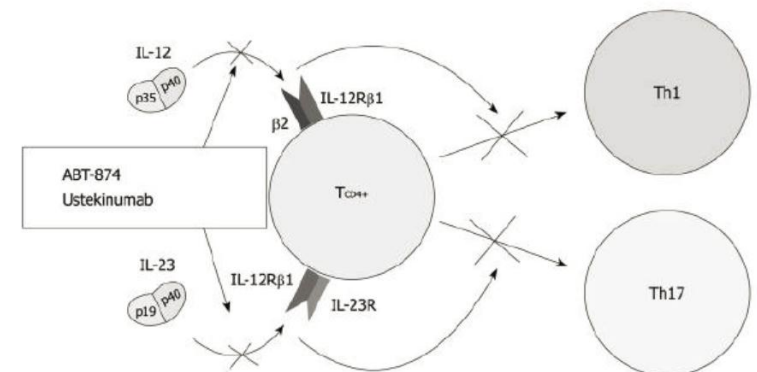
Pomen genetskih študij za razvoj novih zdravil

- Citokini CD4+ T--celic
- miRNA
- Inhibicija migracije limfocitov
- Terapija z matičnimi celicami
- Manipulacij črevesne mikrobiote

Funkcionalne linije CD4+ T-celic v patogenezi KVČB



Primer: antagonisti IL23



Zaključek

- Trenutno znamo razložiti cca 20% dednega dejavnika za kompleksne bolezni; za učinkovitejši genetski test za napoved tveganja bo potrebno razširiti poznavanje genetskega dejavnika
 - Odkritje novih genov za posamezno bolezen z analizo redkih mutacij (z $OR > 2$)
 - Analiza interakcij gen-gen in interakcij gen-okolje
- Potrebne so tudi nadaljnje genetske študije v različnih populacijah, saj je zelo verjetno, da ne bo možno z univerzalnim genetskim testom doseči enake specifičnosti in občutljivosti in bo za večjo učinkovitost testov potrebno vključiti polimorfizme najpomembnejše za posamezno populacijo

Laboratory for Biochemistry, Molecular biology and Genomics,
Faculty for Chemistry and Chemical Engineering
& Center for Human Molecular Genetics and Pharmacogenomics
Faculty of Medicine, University of Maribor

- Uroš Potočnik
- Mitja Mitrovič: iCHIP genotyping, data analysis
- Katja Repnik: genotyping&data analysis (replication study), eQTL
- Petra Perin
- Carina Pinto
- Larisa Zemljič



- University of Groningen, Faculty of Medicine, Groningen, Neatherlands
 - Rinse Weersma
- University Clinical center Maribor, Slovenia
 - Silvo Koder, Pavel Skok, Cvetka Pernat, Andreja Ocepek
- *University Clinical Center Ljubljana, Gastroenterological Clinic, Ljubljana, Slovenia*
 - Ivo Ferkolj