CROHN-BETEGSÉGRE HAJLAMOSÍTÓ POLIMORFIZMUSOK KÖZTI STATISZTIKAI INTERAKCIÓ VIZSGÁLATA A MAGYAR BETEGPOPULÁCIÓBAN

Doktori (PhD) - értekezés

Csöngei Veronika

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Témavezető és programvezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Pécsi Tudományegyetem

Orvostudományi Kar

Orvosi Genetikai Intézet

Pécs, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **4**

1. BEVEZETÉS **6**

1.1. Crohn-betegség **6**

1.1.1. Fenotípus *6*

1.1.2. Epidemiológia, etiológia, környezeti tényezők *7*

1.2. A Crohn-betegség genetikai háttere **11**

1.2.1. Genetikai háttér szerepe (ikervizsgálatok, konkordancia) *11*

1.2.2. Kandináns gének azonosítása *11*

1.2.3. Kapcsoltsági vizsgálatok (Genome-wide linkage studies, GWL) *12*

1.2.4. Teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWA tanulmányok) *15*

1.2.5. „Két-lókusz" és „multi-lókusz" vizsgálatok - Gén-gén kölcsönhatások vizsgálata *16*

1.2.6. „Két-lókusz" és „multi-lókusz" vizsgálatok – Prediktív tesztek, személyre szabott medicina *18*

1.2.7. A vizsgált gének és lókuszok rövid jellemzése *19*

2. CÉLKITŰZÉSEK **33**

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK **34**

3.1. Vizsgált populáció **34**

3.1.1. Crohn-betegek *34*

3.1.2. Kontroll csoport *34*

3.2. Molekuláris biológiai módszerek **35**

3.2.1. PCR reakció *35*

3.2.2. RFLP *36*

3.2.3. Direkt szekvenálás *37*

3.3. Statisztikai módszerek **37**

4. EREDMÉNYEK **39**

4.1. Egy-lókusz eredmények *39*

4.2. Két-lókusz eredmények *43*

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK **53**

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA **61**

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **63**

8. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK **64**

9. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK **65**

10. IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK **68**

11. IRODALOMJEGYZÉK **71**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATG16L1	autophagy related gene 16-like 1
bp	bázispár
CARD15	caspase activation and recruitment domain family, member 15
CD	Crohn-betegség
CI	konfidencia intervallum
COX	ciklooxigenáz
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CU	colitis ulcerosa
DLG5	discs, large homolog 5
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FDR	false discovery rate
FoxP3	forkhead box P3
GI	gasztrointesztinális
GWA	genome wide association
GWL	genome wide linkage
HLA	humán leukocita antigén
IBD	inflammatory bowel disease (gyulladásos bélbetegség)
IGRM	immunity related GTPase family M
IL	interleukin
IL23R	interleukin 23 receptor
IFNγ	interferon gamma
LD	linkage disequilibrium
LRKK2	leucine rich repeat kinase 2
MDP	muramil-dipeptid
MDR	multifactor dimensionality reduction
MDR1	multidrug resistance 1
NFκB	nukleáris faktor kappa B
MST1	macrophage stimulating 1
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
OCTN1	organic cation transporter 1
OCTN2	organic cation transporter 2
OR	odds ratio (esélyhányados)

PBMC	perifériás mononukleáris sejtek
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PDLIM	PDZ és LIM domén 5
P4HA2	prolil-4 hidroxiláz, alfa polipeptid II
PTGER4	prosztaglandin E receptor (EP4 altípus)
RAG	recombination-activating gene
PTPN22	protein thyrosine phospatase, non-receptor type 22
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)
SLC22A4	solute carrier family 22, member 4
SLC22A5	solute carrier family 22, member 5
SNP	single nucleotide polymorphism (egypontos nukleotid polimorfizmus)
TDT	transmission disequilibrium test
TLR4	toll like receptor 4
TNFα	tumor nekrózis faktor alfa
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
TNFSF15	tumor necrosis factor superfamily, member 15

1. BEVEZETÉS

1.1. Crohn-betegség

1.1.1. Fenotípus

A krónikus gyulladásos bélbetegségek két klinikai megjelenési formája a Crohn-betegség és a colitis ulcerosa. Crohn-betegség esetén a gyulladás az egész tápcsatornát érintheti (szájnyílástól egészen a végbélnyílásig), főként azonban a terminális ileumban és vastagbélben lokalizálódik. Leggyakoribb a vékony- és vastagbél együttes érintettsége (40-55%), a rectum általában megkímélt. Az esetek 30-40%-ában csak a vékonybél, míg 15-25%-ában csak a vastagbél érintett, a felső gasztrointesztinális lokalizáció viszonylag ritka. A gyulladás transzmurális és szegmentális, a bélfal minden rétegére kiterjed, a beteg szakaszokat ép területek választják el egymástól. Klinikai szempontból több altípus különíthető el, a bécsi[1], ill. az erre épülő montreali[2] klasszifikáció a betegség felismerésének időpontja, annak lokalizációja, valamint striktúrát (szűkületet) okozó, és/vagy penetráló jellege (sipolyképződés), illetve a műtét szükségessége alapján osztályozza a betegeket (**1. táblázat**).

A Crohn-betegség legfontosabb tünetei: jobb oldali alhasi fájdalom, hasmenés (nem jellemző, de lehet véres, nyálkás, gennyes), szisztémás tünetei: fogyás, láz, fáradékonyság, felszívódási zavar, hiánytünetek, fokozott trombózis-hajlam, növekedésbeli elmaradás, pubertás késése. Hosszútávon malignus elfajulással is számolni kell. A korai stádium kevésbé specifikus endoszkópos jele a fokális nyálkahártya-lézióként megjelenő aphtoid fekély. A klasszikus endoszkópos képet mély fekélyek, illetve az ún. utcakövezetre emlékeztető nyálkahártya-rajzolat jellemzi, utóbbi a hegesedés miatt kialakuló behúzódások és a nyálkahártya következményes szigetszerű kiemelkedései. A betegség legspecifikusabb szövettani megjelenési formája az ún. el nem sajtosodó granulóma, ami azonban az esetek csak mintegy 36-50%-ában mutatható ki[3]. A fekélyek alapjában gyakran infiltrált plazmasejtek, limfociták és hisztiociták találhatóak. A későbbi stádiumban a bélfalat teljesen áttörő fekélyek, illetve a gyógyult fekélyek nyomaként megjelenő hegesedések mutathatóak ki.

Magyarországon a Crohn-betegek mintegy 37%-a szenved jellegzetes kísérőbetegségben, mely sokszor már a CD kialakulása előtt megjelenik[4]. Az extraintesztinális szövődmények elsősorban a szemet, bőrt és ízületeket érintik. A perifériás arthritis, episcleritis, erythema nodosum, illetve pyoderma gangrenosum az alapbetegség

súlyosságával párhuzamosan jelenik meg, a spondylitis ankylopoetica, sacroileitis, anterior uveitis, primer sclerotisaló cholangitis (PSC) valamint osteoporosis az alapbetegségtől függetlenül manifesztálódik.

A Crohn-betegség kialakulásának hátterében az immunrendszer, bélflóra és genotípus komplex viszonya, illetve annak zavara áll: genetikailag fogékony személyben a különböző környezeti faktorok hatására, illetve a disztális ileumban és colonban élő kommenzalista baktériumok/patogének ellen kialakuló, agresszív T-sejtes immunválasz jellemzi, patogenezisének pontos okai ugyanakkor még nem ismertek.

1. táblázat A Crohn-betegség besorolása a bécsi és montreáli klasszifikáció szerint

		Bécsi		**Montreali**
Életkor a betegség diagnózisakor	A1	< 40 év	A1	< 16 év
	A2	> 40 év	A2	17-40 év között
			A3	> 40
Lokalizáció	L1	Ileum	L1	Ileum
	L2	Colon	L2	Colon
	L3	Ileocolon	L3	Ileocolon
	L4	Felső GI traktus	L4	Izolált felső GI traktus*
Klinikai viselkedés	B1	nem penetráló, nem sztenotizáló	B1	nem penetráló, nem sztenotizáló
	B2	sztenotizáló	B2	sztenotizáló
	B3	penetráló	B3	penetráló
			p	perianális#

*L1-L3 mellett alkalmazható
#B1-B3 mellett alkalmazható

1.1.2. Epidemiológia, etiológia, környezeti tényezők

A Crohn-betegség jelentősen befolyásolja az érintettek életminőségét, a várható életkilátásaik is rosszabbak: Crohn-betegek esetén a teljes mortalitási ráta 51%-kal magasabb az egészséges populációhoz képest[5]. A gasztrointesztinális mortalitás 4,5-szeres; az össztumoros halálozás 2,1-szeres; a tüdőrák okozta mortalitás pedig 4,0-szeres emelkedést mutat a betegek körében[5]. A betegség általában a késő serdülőkor végén, korai felnőttkor elején, a 20-35. életév között kezdődik, ugyanakkor egyre több a gyermekkori eset. A betegek egy részénél viszont idősebb korban (50. életévet követően) jelenik meg (második hullám). A kórkép férfiakban és nőkben közel azonos gyakorisággal manifesztálódik. A betegség incidenciája világszerte 0,1-16/100000[6,7], gyakorisága jellegzetes földrajzi eloszlást mutat, amelyben az észak-déli és kelet-nyugati tengely meghatározó. Az incidenciaértékeket figyelembe véve Észak-Amerika, Észak-és Nyugat-Európa a legérintettebb, míg Afrikában,

Dél-Amerikában és Ázsiában ritkább a betegség[8]. Észak-Amerikában az új esetek száma évente 20,2/100000 lakos[9]; Európában évente több mint feleennyi új esetet diagnosztizálnak (12,7/100000 lakos)[9]. Ázsia és Közép-Kelet incidenciája 5,0/100000 lakos/év[9]. Nyugat-Magyarországon, Veszprém megyében 2002-2006 között 11,9/100000 lakos/év átlag incidenciaértéket mértek[10]. A betegség prevalenciája Európában (322/100000) és Észak-Amerikában (319/100000) a legmagasabb[9]. A betegség megjelenésében rassz és etnikai különbségek is kimutathatóak. A kaukázusi és afro-amerikai eredet egyértelműen nagyobb kockázatot jelent, míg a hispán és ázsiai populációkban ritkább a betegség. A legmagasabb családi érintettség az askenázi zsidó populációt jellemzi, a betegség kialakulásának kockázata 2-4-szer nagyobb, mint a nem zsidó fehér populációban, az izraeli zsidók kockázata ugyanakkor az egészséges populációéval megegyező[11]. A környezeti faktorok szerepét hangsúlyozza az a megfigyelés, miszerint az afroamerikai populáció IBD incidenciája megegyezik az európai származású amerikaiakéval[12].

A betegség földrajzi elterjedése az utóbbi évtizedekben azonban változni látszik, például a jellemzően magas incidenciájú nyugat-európai országokban az új esetek száma stabilizálódott, esetleg csökkent[13]; míg a korábban kevésbé érintett területeken egyre több új beteget diagnosztizálnak. Hazánkban, illetve a szomszédos Horvátországban is meredek incidencia-emelkedést tapasztaltak[14,15]. A krónikus gyulladásos bélbetegségek, így a Crohn-betegség megjelenését is elsősorban az adott régió ipari fejlettségéhez, illetve az urbanizáció fokához kötik. A korábban alacsony prevalenciát mutató fejlődő országokban az utóbbi időkben felgyorsult iparosodással egyidejűleg a gyulladásos bélbetegségek is egyre gyakoribbá váltak (pl.: Indiában és Kínában)[16,17]. A környezet elsődleges szerepét – a genetikai meghatározottság mellett – a bevándorlási vizsgálatok is alátámasztják. Az alacsony prevalenciájú területekről a magasabb előfordulást mutató országokba vándorlók esetében a betegség kialakulásának kockázata megemelkedik, ez különösen az új helyen születő első generációnál szembetűnő[18,19].

A Crohn-betegség patogenezisét befolyásoló környezeti faktorok mibenlétét, illetve azok időzítésének szerepét ez idáig számos tanulmány vizsgálta. Az exogén hatások közül nem elhanyagolható a gyermekkori környezeti faktorok szerepe. Az egészségügyi viszonyok és higiénia fejlődésének köszönhetően az utóbbi évtizedekben csökkent a gyermekkori enterális fertőzések gyakorisága; a mikrobiális antigénekkel való expozíció hiánya azonban a későbbi élet során az immunrendszer túlzott reakciókészségét is eredményezheti. A gyermekkori *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fertőzés védő hatású a betegség kialakulására nézve[20]. A *H. pylori* hatására a regulátoros T-sejtek funkciójában résztvevő gének (pl.:

FoxP3) expressziója emelkedik meg[20]. A betegekben ugyanakkor általában csökkent *H. pylori* kolonizáció mutatható ki, amit viszont egyes, a Crohn-betegség terápiájában használt gyógyszerek (pl.: antibiotikumok, mesalamin) is okozhatnak[21]. A gyermekkori tényezők közül a háztartások, illetve a családok mérete (testvérek száma), háziállatok (pl.: macska) tartása is befolyással lehet a betegség kialakulására[21-25]. Az anyatejes táplálás szerepe nem teljesen egyértelmű; újszülött és csecsemőkorban védő hatását igazolták[26], részt vesz az intesztinális baktériumokkal és ételantigénekkel szembeni orális tolerancia kialakításában, valamint antivirális, antibakteriális és gyulladáscsökkentő funkcióval bír[27-29]. A hosszabb ideig tartó szoptatás ugyanakkor gátolja a gyermekkori fertőző betegségeken való átesést, ami befolyásolhatja a felnőttkori immunválasz hatékonyságát[30].

A dohányzás dózisfüggően emeli a Crohn-betegség kockázatát (míg colitis ulcerosa esetén védő hatással bír), a tünetek a dohányzó betegekben súlyosabbak, mint a nemdohányzókban, a leszokás a betegség lefolyását némiképp enyhíti[31]. Cigarettázás hatására elsősorban az ileális, illetve kisebb százalékban a vastagbél-érintettség valószínűsége nő[30]. A dohányzás ugyanakkor úgy tűnik, nem feltétlenül szükséges a betegség kialakulásához. Ezt erősíti meg az a megfigyelés, miszerint a legmagasabb dohányzási rátával bíró országokban a legalacsonyabb a CD gyakorisága, például Koreához képest jóval magasabb Kanadában a gyulladásos bélbetegségek prevalenciája, az észak-amerikai országban viszont sokkal kevesebb a dohányos (22%), mint Koreában (65%)[9]. A dohányzásnak inkább moduláló szerepet tulajdonítanak, vagyis valószínűleg a már meglévő betegség fenotípusát befolyásolja[32].

Az étrend és étkezési szokások szerepe nem teljesen egyértelmű a betegség kialakulása szempontjából. A nyers sertéshús, pasztörizálatlan tejtermékek, valamint kútvíz fogyasztása rizikófaktort jelenthet[26]. A magas cukortartalmú ételek, finomított szénhidrátok, és többszörösen telítetlen omega-6 zsírokban gazdag ételek dominanciája (marha- és sertéshús, kukorica- és napraforgó olajok, margarinok egyes típusai) emeli az IBD, és ezen belül elsősorban a Crohn-betegség kialakulásának kockázatát. Az omega-3 telítetlen zsírsavakat (halakban), illetve a zöldségeket és gyümölcsöket mellőző étrend szintén megnövekedett rizikót okoz[33].

A Crohn-betegség kialakulásában a bélflóra kiemelt jelentőséggel bír. Három (egymást nem feltétlenül kizáró) hipotézis létezik a bélben található baktériumok szerepét illetően: 1. perzisztáló patogén(ek) jelenléte vált ki krónikus gyulladásos reakciót; 2. a mukózális barrier rendellenes permeábilitása fokozott bakteriális transzlokációt tesz lehetővé;

3. a „védő” és „káros” intesztinális baktériumok közti egyensúly felborulása (diszbiózis) indukál gyulladást[34].

A normál bélflóra születéskor, illetve az anyatejes táplálás során alakul ki, a későbbi élet folyamán a különböző környezeti faktorok függvényében változhat. Crohn-betegségben a gyulladásos bélszakaszokon a baktériumok jellegzetes kolonizációja figyelhető meg, az itt található fajok azonban nem különböznek szignifikánsan az egészséges területeken lévőktől. A betegség aktív szakaszában a bélflóra biodiverzitása csökkent stabilitást mutat[35]. Crohn-betegségben elsősorban a *Chlamydia pneumoniae, Saccharomyces cerevisiae, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, Candida albicans*, és az adherens, invazív *Escherichia coli* (AIEC) fajok jelenléte mutatható ki[35].

Az antibiotikumok alkalmazása – különösen az első életévben[36] – növeli a Crohn-betegség kialakulásának kockázatát, mivel a hasznos baktériumok számának csökkenésével (*Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteriodetes, Firmicutes*) patogén baktériumok – mint például az adherens, invazív *Escherichia coli* – telepednek meg és szaporodnak el az intesztinális epitéliumban[37-39]. Az epitélsejteket megfertőző, és a makrofágokban szaporodó AIEC jelenléte az ileális lokalizációjú Crohn-betegségre specifikus[40]. A hűtőgépek elterjedése, a hűtött élelmiszerek tömeges előállítása és fogyasztása (hűtőlánc hipotézis) egyes hideg- és nedvességkedvelő (ún. pszichotróf) baktériumfajok (pl.: *Listeria monocytogenes* és *Yersinia enterocolitica*) elterjedését tette lehetővé[27,41]. Egy skandináv tanulmány szerint a Crohn-betegség leggyakrabban Yersinia fertőzést követő években alakul ki[42], jelenléte pedig kimutatható a léziók területén[43,44].

A nemszteroid gyulladáscsökkentők (NSAID) használata szintén összefüggést mutat a betegség kialakulásával. Az NSAID-ok gátolják a a ciklooxigenáz enzimek (COX-1 és COX-2) működését és ezzel a védő hatású prosztaglandinok képződését, valamint károsítják a gyomor, vékony-és vastagbél epitéliumát[45,46]. A vékonybél enterocitáiban a mitokondriális oxidatív foszforiláció károsodását okozzák, az ennek következtében lecsökkenő intracelluláris ATP-szint pedig a tight junction-ok citoszkeletális szabályozásának megváltozásához és így az intesztinális permeábilitás fokozódásához vezet[47]. Az orálisan alkalmazott fogamzásgátlók szintén emelik a Crohn-betegség kockázatát, a rizikó a gyógyszerszedés időtartamával nő, abbahagyásával viszont csökken[48]. Míg az appendectómia védő szerepe colitis ulcerosában kifejezett, Crohn-betegségben még vitatott[49].

A fokozott citokinszekrécióval, valamint a gyulladásos sejtek intenzív vándorlásával járó szisztémás fertőzések a bél gyulladását indukálhatják[47], és így szerepük lehet a Crohn-betegség kialakulásában is.

1.2. A Crohn-betegség genetikai háttere

1.2.1. Genetikai háttér szerepe (ikervizsgálatok, konkordancia)

A földrajzi eloszlás heterogenitása, a familiáris IBD formák, az egypetéjű ikrek magas konkordancia értéke mind a genetikai háttér (prediszpozíció) szerepét hangsúlyozza a betegség kialakulásában. Ikervizsgálatok során egypetéjű ikreknél 50-58% (CU esetén ez mindössze 6-14%), kétpetéjű ikreknél kevesebb, mint 12% (CU-ban 0-5%) a konkordancia érték[50,51]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a genetikai faktorok vélhetően nagyobb mértékben játszanak szerepet a betegség kialakulásában, mint colitis ulcerosában. A pozitív családi anamnézis az egyik legfontosabb független hajlamosító tényező: a Crohn-betegek családjában 5-10%-ban található szintén érintett elsőfokú rokon. Az utódok relatív kockázata akár 30-40-szeres lehet, CU esetén ez az érték 10-20-szoros[52,53]. A Crohn-betegségnek létezik mendeli, monogénes öröklődésmenetet mutató formája is. Az interleukin 10 citokin (IL10) és receptorának (IL10R) ritka, funkcióvesztést okozó autoszómális recesszív mutációi súlyos gyermekkori Crohn-betegség kialakulását okozzák (a betegség e formája csontvelő transzplantációval gyógyítható)[54,55]. A nem mendeli formák általában a populációban viszonylag gyakori (>5% allélfrekvenciájú), alacsony penetranciát mutató polimorfizmusokkal asszociáltak. A fentiek függvényében a Crohn-betegség valószínűleg egy folytonos – a monogénes öröklődésű familiáris formáktól a sporadikus megjelenésű, környezeti faktorok által befolyásolt poligénes formákig terjedő – skálán elhelyezkedő, egymással átfedő fenotípusok összességének tekinthető.

1.2.2. Kandináns gének azonosítása

Miután az iker-, illetve családvizsgálatok alapján egyértelművé vált a genetikai prediszpozíció szerepe, a kutatások középpontjába a hajlamosító gének azonosítása került. A kezdeti vizsgálati módszer az ún. „kandináns gén megközelítés” (candidate gene approach) volt. A betegség patogenezisében nagy valószínűséggel szerepet játszó potenciális funkcionális „jelölt” gének kiválasztása feltételezi a tünetek kialakulásához vezető biológiai útvonalak, élettani folyamatok bizonyos szintű ismeretét; ebben az esetben a vizsgálat célzottan olyan, már korábban leírt génekre irányul, amelyek funkciója alapján sejthető azok hajlamosító szerepe. A vizsgált beteg- és a hozzá megfelelően illesztett kontrollpopuláció között mutatkozó allélfrekvencia-különbség igazolhatja a „jelölt” gén – vagy a vele szorosan kapcsolt egyéb gén – közreműködését a betegség kialakulásában. Mivel IBD-ben és így Crohn-betegségben is az immunfolyamatokban résztvevő molekulák kiemelt jelentőséggel

bírnak, a HLA (humán leukocita antigén) gének mellett – melyek számos más autoimmun betegség (cöliákia, rheumatoid arthritis és cukorbetegség) kialakulásával is kapcsolatot mutatnak – a Toll-like receptor 4-et (TLR4), tumor nekrózis faktor alfát (TNFα), illetve az interleukin 1 (IL1) citokincsaládot kódoló gének is a vizsgálatok célpontjaivá váltak[57]. A másik, ún. pozícionális „jelölt" géneket célzó módszer kizárólag a kromoszómális elhelyezkedésük alapján törekszik a lehetséges hajlamosító gének azonosítására; marker SNP-k vagy haplotípusblokkok segítségével. Ennek a stratégiának egyik legemlékezetesebb eredménye a *CARD15* gén és a Crohn-betegség közti asszociáció kimutatása volt[58,59].

1.2.3. Kapcsoltsági vizsgálatok (Genome-wide linkage studies, GWL)

A teljes genomot lefedő kapcsoltsági vizsgálatokat olyan családok mintáin végzik, melyben legalább két beteg testvér van (több testvér esetén több). Korábban elsősorban mikroszatellita markerek (más néven short tandem repeat, azaz STR) követésével történt a genom térképezése, az elmúlt években lezajlott technikai fejlődésnek köszönhetően azonban az SNP-k pontos és automatizált genotipizálása is lehetővé vált. A vizsgálat lényege, hogy azok a markerek, melyek elég közel találhatóak a betegséget okozó funkcionális génhez, a beteg fenotípus megjelenésével is szorosabb összefüggést mutatnak. Minél kisebb a távolság, annál nagyobb annak a valószínűsége, hogy a térképezéshez használt marker és a keresett gén(lókusz) együtt öröklődik a meiózis során. Az elmúlt években IBD-ben, és így CD-ben is számos, az egész genomot lefedő kapcsoltsági vizsgálatot végeztek[60-71], 2004-ben az addigi tíz GWL analízis eredményeit egy metaanalízis során is elemezték[72] (**2. táblázat**).

2. táblázat IBD lókuszok (Forrás: Matricon 2010[73])

IBD lókusz	Kromoszóma pozíció	Gén	Feltételezett szerep a gyulladás kialakulásában	SNP	Irodalom	Tanulmány típusa
IBD1	16q12	NOD2/CARD15, CD19, sialophorin, CD11 integrin klaszter, IL4R	Bakteriális sejtalkotók detektálása	D16S409 és D16S419 D16S409 és D16S753 D16S3117	74 75 76	GWL L L
IBD2	12p13.2-q24.1	STAT6, VDR, IFNγ	T-sejtes válasz	D12S83	77	L
IBD3	6p21.3	MHC HLA-DQA1, HLADRA, HLA-DRB5 és HLA-DRB1, TNFα, TNFβ, IL10, BTLN2	Nem-saját felismerése	D6S289 és D6S276	63	GWL
IBD4[1]	14q11-q12	MMP14, DAD1, TCR	T-sejtes válasz	D14S261	65	GWL
IBD5[1]	5q31	IL3, IL4, IL5 és IL13, OCTN1, OCTN2, CSF2, SLC22A5	Gyulladás szabályozása	rs6596075 és rs2188962	66,78	L GWL
IBD6	19p13	ICAM-1, C3, TBXA2R, LTB4H	Diapedezis, neutrofil aktiváció	nem specifikált	79	GWL
IBD7	1p36	PADI4	ismeretlen	D1S1597, D1S507 és D1S1628	62,80	GWL L
IBD8[2]	16p	ismeretlen	ismeretlen	D16S408	81	L
IBD9	3p26	DEC1	Anti-neoplasia	D3S1297	68	L
IBD10[1]	2q37.1	ATG16L1	Autofágia	rs2241880	82	GWA
IBD11	7q22	MUC3A	Epitél-barrier védelme	D7S669	61	GWL
IBD12	3p21	MST1, BSN, GNAI2	Proinflammatorikus mediátorok expressziójának szabályozása	D3S2432	83	GWL
IBD13	7q21.1	ABCA1	Glukokortikoid termelés szabályozása?	D7S669	61	GWL
IBD14	7q32	IRF5	Proinflammatorikus mediátorok expressziójának szabályozása	CGGGG inzerció az IRF5 gén promóterében	84	A
IBD15	10q21	ZNF365	Proinflammatorikus mediátorok expressziójának szabályozása?	rs224136 rs10761659 rs10995271	85 86 87	GWA GWA GWA

[1]CD lókusz
[2]CU lókusz
GWL: Genome wide linkage; L: Linkage; GWA: Genome wide association; A: Association

3. táblázat folytatása

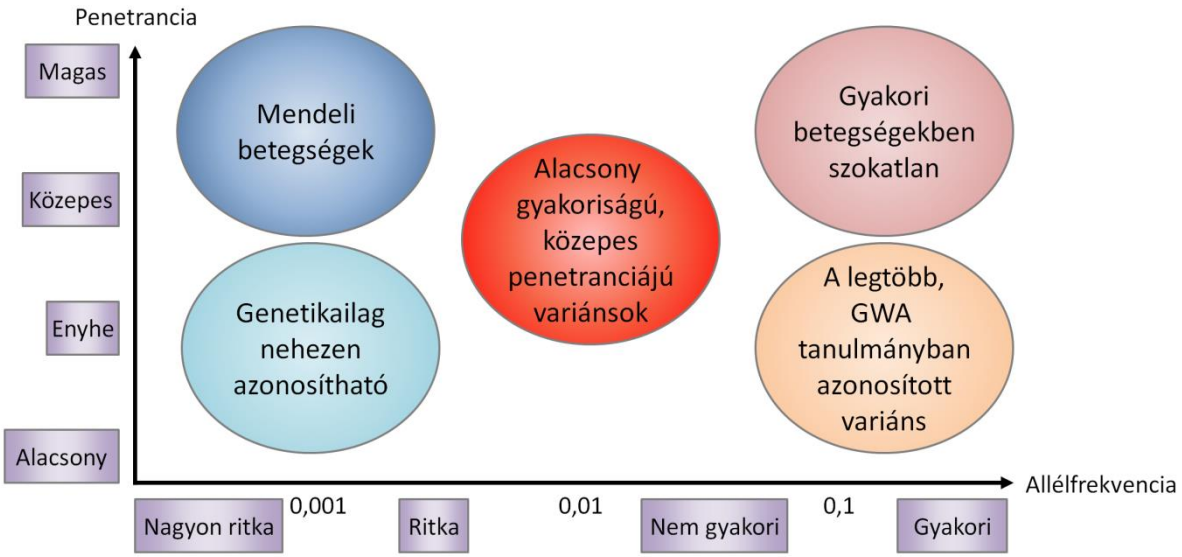
IBD lókusz	Kromoszóma pozíció	Gén	Feltételezett szerep a gyulladás kialakulásában	SNP	Irodalom	Tanulmány típusa
IBD16	9q32	TNFSF15	Aktivált CD4$^+$ T-sejtek kostimulációja	D9S2157	62	GWA
				rs3810936, rs6478108, rs6478109, rs7848647 és rs7869487	88	GWA
				rs4263839	87	GWA
IBD17	1p31.1	IL23R, PTGER4	Th17 populáció képződése, fenntartása; prosztaglandin jelátvitel	IL23R rs11209026	89	GWA
				rs7517847	85	GWA
				rs4613763	87	GWA
IBD18	5p13.1	PTGER4	Prosztaglandin jelátvitel?	rs1373692	89	GWA
				rs4613763	87	GWA
				rs1992660	90	GWA
IBD19[1]	5q33.1	IRGM, IL12B	Autofágia	IL12B rs6887695	91	A
				IL12B rs6556416	86	GWA
				IRGM rs4958847 és rs4958427	90	A
				IRGM rs11747270 és rs10045431	87	GWA
IBD20	10q23-q24	DLG5, NKX2-3	Epitél integritás fenntartása	rs11190140 és rs10883365	92	A
				D10S547 és D10S20	63	GWL
				rs10883365	91	GWA
IBD21	18p11	NDUFV2, VAPA, PACAP, PTPN2	TCR jelátvitel	PTPN2 rs2542151	91	GWA
IBD22[1]	17q21	STAT3, ORMDL3	T-sejt válasz	ORMDL3 rs2872507	87	GWA
				STAT3 rs744166	92	A
IBD23	1q32	IL10	Gyulladásos mediátor termelés szabályozása	-1082G	93	A
				rs17419032	92	A
				rs3024505	92	GWA
IBD24	20q13	TNFRSF6B vagy DCR3	Aktivált CD4$^+$ T-sejtek kostimulációja	rs2315008 és rs4809330	94	GWA
IBD25	21q22	PSMG1	Autofágia	rs2836878	94	GWA
IBD26[2]	12q15	ismeretlen	ismeretlen	rs1558744, rs7134599, rs2870946	95	GWA
IBD27[1]	13q13.3	ismeretlen	ismeretlen	rs20411	96	GWL
IBD28	21q22	IL10RA	Gyulladás szabályozása	rs2836878	54	L

[1]CD lókusz
[2]CU lókusz
GWL: Genome wide linkage; L: Linkage; GWA: Genome wide association; A: Association

1.2.4. Teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWA tanulmányok)

A teljes genomot lefedő asszociációs vizsgálatok elterjedésében a hihetetlenül gyors technikai fejlődés mellett a teljes humán genom megszekvenálása (Humán Genom Projekt, International Human genome Sequencing Consotrium, 2004), illetve az azt követő haplotípus térképezés (HapMap) befejeződése (International HapMap Consortium, 2005) is szerepet játszott. Utóbbiaknak köszönhetően több mint egymillió SNP, valamint az egyes allélek közti kapcsoltági viszonyok (LD) váltak ismerté. Az elmúlt években egyre népszerűbbé vált GWA tanulmányok nagy előnye a GWL analízisekkel szemben, hogy az SNP markerek és a betegség közti asszociáció vizsgálata nem családokban, hanem nagy mintaszámú, beteg-, illetve egészséges személyeket tömörítő csoportok bevonásával történik. A két populáció közti allélfrekvencia különbség a marker és a betegség között kapcsolatot jelezhet. A Crohn-betegeket vizsgáló, tekintélyes számú GWA tanulmányok[82,88,89,97-101] révén újabb gének szerepe is (pl.: *TNFSF15*, *IL23R*, *ATG16L1*, *IRGM*, *PTGER4*, *MST1*, *PTPN2*, *JAKMIP1*) felmerült, illetve megerősítést nyert a betegség kialakulásában.

A GWA tanulmányok adatállományát elemző metaanalízisek[87,102] segítségével lehetővé vált olyan, kisebb hatással bíró lókuszok, asszociációk azonosítása is, amelyeket az egyszerű GWA vizsgálatok korábban nem mutattak ki. A GWA kutatások eredményeinek értelmezését ugyanakkor megnehezíti, ha egyáltalán nem tartalmaz kódoló gént az adott lókusz[103], az azonosított régiókban pedig gyakran több gén is található. Pár kivételtől eltekintve azonban az igazi funkcionális allélek, sok esetben egész gének is rejtve marad(hat)nak ezekben a vizsgálatokban. Mivel a nagyobb kockázatot jelentő variánsok valószínűleg az egyed reprodukciója szempontjából hátrányt jelentenek, ezért gyakoriságuk alacsony szintű a populációban; e tanulmányokban különösen ezek az alacsony allélfrekvenciát mutató, ritka variánsok maradnak ismeretlenek **(1. ábra)**. A GWA-k tehát elsősorban a gyakori variánsok azonosításában sikeresek, ám a segítségükkel azonosított betegség-asszociált lókuszok még így is a betegség genetikai meghatározottságának csupán 25%-áért tehetők felelőssé, a maradék 75% továbbra is ismeretlen[103]. Éppen ezért valószínűsíthető, hogy a CD fenotípust több száz (esetleg ezer) minor biológiai hatással bíró, a populációban elterjedten megtalálható SNP interakciója alakítja ki és/vagy erős hatású ritka variánsoknak tulajdonítható a megjelenése[104].



1. ábra A GWA tanulmányok elsősorban a gyakori variánsok azonosításában sikeresek[105].

1.2.5. „Két-lókusz" és „multi-lókusz" vizsgálatok - Gén-gén kölcsönhatások vizsgálata

A GWA vizsgálatok során talált asszociációk független mintán történő ismétlése során az eredeti eredmény megerősítése több esetben meghiúsult. Ez idáig csak néhány magas OR értéket mutató variánst sikerült azonosítani, ezzel szemben nagyszámú gyakori, de csekély mértékben hajlamosító (OR=1,1-1,3) génvariáns vált ismertté. Ennek magyarázatát részben a lókuszok heterogenitása, illetve a gén-gén és gén-környezet kölcsönhatások adják.

A gén-gén interakció (genetikai episztázis) fogalma nem új keletű, az eredeti megfogalmazás a XX. század elejéről, William Bateson-tól származik[106], miszerint az episztázis az a jelenség, amikor az egyik gén hatása elfedi a másikét (funkcionális episztázis). Fisher populációs szinten megfogalmazott definíciója[107] a biológiai funkció helyett már inkább statisztikai jelleget öltött, az adott statisztikai modellben a gének additív hatásától való eltérését jelenti (lineáris modelltől való eltérés). A statisztikai episztázist mérő vizsgálatok két különböző lókuszon lévő allél behelyettesítésének hatását vizsgálják az adott populációt jellemző átlagos genetikai háttérrel szemben; ez az analízis genotípus frekvenciafüggő[108]. A populációs szinten kimutatható kölcsönhatások azonban csak korlátozott szinten jelzik a háttérben zajló valós biológiai folyamatokat[109].

A génműködés robusztus és redundáns, a létfontosságú biológiai útvonalak többszörösen biztosítottak, az egyes biokémiai utak horizontális és vertikális irányban is több szinten összeköttetésben állnak. A biokémiai útvonalaknak ez a rendszere a pufferhatásnak köszönhetően a genotípus változásainak, mutációinak káros következményeit az esetek nagy részében sikeresen kivédi, egy mutáció ritkán eredményez extrém fenotípust[110]. A komplex

betegségekre hajalmosító gének azonosításához egyszerre több polimorfizmus, illetve a köztük lévő interakciók vizsgálata is szükséges, így az utóbbi években a gének közti interakciók vizsgálata is előtérbe került. E tanulmányok potenciális célpontjai a GWA tanulmányok által leírt lókuszok, illetve a korábban azonosított „jelölt" gének. A gén-gén kölcsönhatások statisztikai szinten történő kimutatására különböző módszerek állnak rendelkezésre, sőt a bioinformatika fejlődésének repertoára egyre bővül. Az eset-kontroll vizsgálatokban hagyományos statisztikai vizsgálatok használhatók, (varianciaanalízis, regressziós modellek), ezek legnagyobb hátránya azonban a „dimenzionalitás átká-nak" nevezett jelenség. A vizsgált gének számának növekedésével ugyanis a lehetséges kombinációk száma exponenciálisan nő, 21 gén közti interakció analíziséhez például a Föld mai össznépessége sem lenne elég. Ennél kevesebb gén vizsgálatakor is nagy a valószínűsége, hogy ritka allélek esetén lesznek olyan genotípus kombinációk is, amelyeket a vizsgálatba bevont személyek közül senki sem hordoz[56] (**3. táblázat**).

4. táblázat A gének számának növekedésével a genotípus kombinációk száma exponenciálisan nő[56]

Gének száma	Genotípus kombinációk
1	3
2	9
3	27
4	81
5	243
6	729
7	2 187
8	6 561
9	19 683
10	59 049
21	10 460 353 203

A CPM módszer (combinatorial partitioning method) kvantitatív jellegek hátterében húzódó interakciók kimutatására használható[111,112], még akkor is, ha az egyes variánsok önmagukban nincsenek hatással a fenotípusra. Hoh és Ott[113,114] diszkrét klinikai változókhoz dolgozott ki a logisztikus regressziót helyettesítő alternatív módszert. Az utóbbi években népszerűvé vált ún. MDR (multifactor dimensionality reduction) módszert szintén a logisztikus regresszió statisztikai erejének javítására fejlesztették ki[115]. Az egyre nagyobb mennyiségben

rendelkezésre álló adat feldolgozására és episztázis detektálására mintázatfelismerő és „machine learning” módszerek használhatóak.

Crohn-betegség esetén a gének közti statisztikai interakció vizsgálata elsősorban a GWL és GWA tanulmányok által azonosított főbb hajlamosító génekre irányul, a használt statisztikai módszerek széles skálán mozognak, az elemzések mélysége is különbözik. A nemzetközi irodalomban leggyakrabban a *CARD15, ATG16L1, IL23R* gének valamint az IBD5 lókusz közti kölcsönhatás (statisztikai episztázis) felderítését célzó tanulmányokat találunk[82,116-124]. A fenti lókuszok kisebb hatású génekkel, például *TLR*-okkal (*TLR4, TLR*-9, *TLR10*)[125-127], *DLG5*-el[128,129], más interleukinokkal (*IL10, IL17A, IL17RA, IL12RB1* és *IL12RB2*)[130,131], *STAT3, JAK2*[132] és *STAT4* génekkel[133], IBD12 lókusszal[134], valamint *CTLA4* variánsokkal[135], *IRGM, PTGER4* génekkel[136] való interakciója (illetve kombinációja) szintén több tanulmány tárgyát képezi.

1.2.6. „Két-lókusz” és „multi-lókusz” vizsgálatok – Prediktív tesztek, személyre szabott medicina

Fontos hangsúlyozni ugyanakkor, hogy a legtöbb esetben nem feltétlenül csak az egyes gének közti interakció feltárása a cél, hiszen annak is prediktív értéke lehet, hogy az egyes genotípusok, allélek kombinálódása (párosával, vagy akár több lókusz bevonásával) hogyan befolyásolja a betegség kialakulásának kockázatát, még akkor is, ha nem ismerjük pontosan a háttérben zajló biológiai folyamatokat. A fokozott relatív kockázatot jelentő kombinációk megismerésével lehetővé válhat a potenciálisan veszélyeztetettek kiszűrése. A fő hajlamosító génvariánsokat egyszerre hordozók penetranciája valószínűleg igen alacsony, mégis, pozitív családi anamnézis esetén talán érdemes lehet genotipizálást végezni. Ezt alátámasztani látszik az a megfigyelés, hogy az *ATG16L1, IL23R, CARD15,* IBD5 és *DLG5* hajlamosító allélek számával nő a betegség kockázata is[128], valamint, hogy az *ATG16L1, CARD15* és IBD5 lókuszra nézve homozigóta genotípusok együttesen a normál genotípushoz képest több mint 20-szorosára is emelhetik a Crohn-betegség kialakulásának kockázatát[118].

1.2.7. A vizsgált gének és lókuszok rövid jellemzése

Caspase activation recruitment domain containing protein 15 (CARD15) – IBD1 – mikroba felismerés

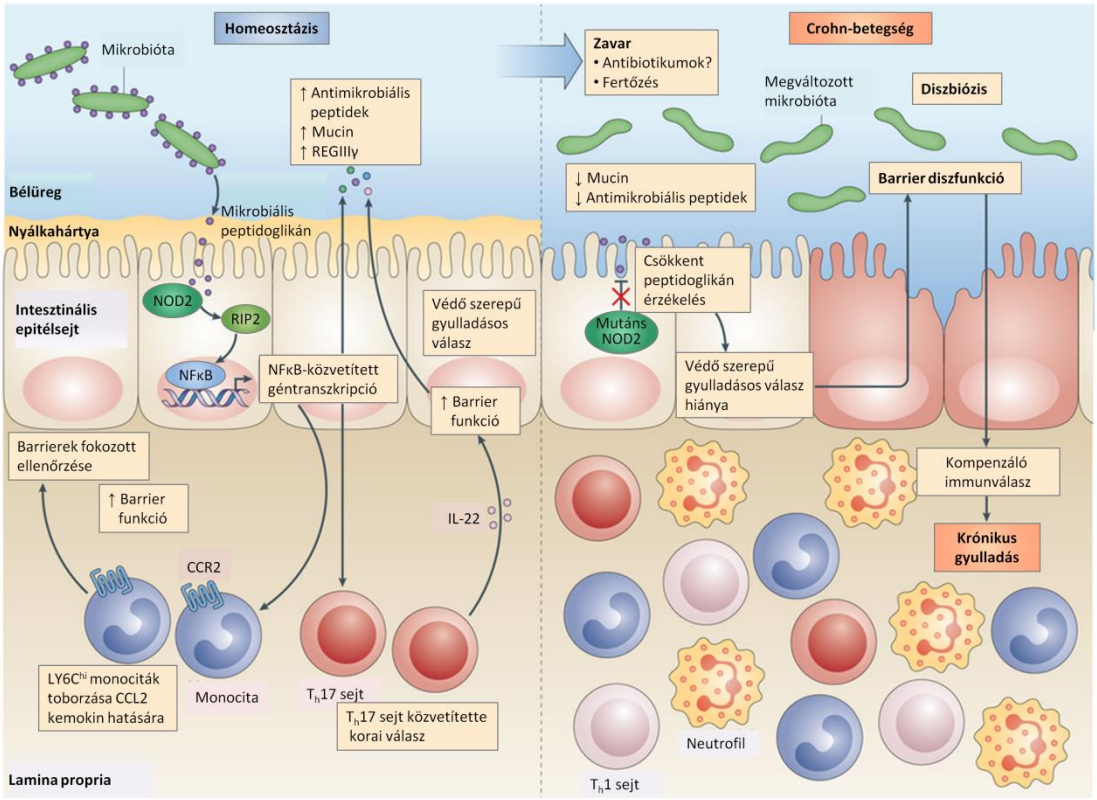
A veleszületett immunválasz kulcsfontosságú elemei azok a receptorok, melyek mikrobákhoz asszociált molekuláris mintázatokat ismernek fel (pattern recognition receptors, PRR). Ide tartozik többek között a 23 receptort magába foglaló Nod-like receptorcsalád (NLR) is. Ezek közül is kiemelkedik a NOD2 (nucleotide-binding oligimerization domain containing 2) fehérje, melynek egyes mutációi egyértelmű összefüggést mutatnak a Crohn-betegség kialakulásával. A NOD2 egy citoplazmatikus receptor, mely három fő részből áll: két N-terminális CARD domén (caspase activation and recruitment domain), egy centrális nukleotid-kötő domén (NBD), illetve egy C-terminális leucin-gazdag domén (leucine rich repeat, LRR) alkotja. A CARD domén a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításáért felelős, az ATP-áz aktivitással rendelkező NBD domén a homo-oligomerek képzésében játszik szerepet[137]. Az LRR domén funkciója a ligand felismerése, ez utóbbi pedig nem más, mint a Gram+, illetve Gram- baktériumok sejtfalát alkotó peptidoglükán bioaktív komponense, a muramil-dipeptid (MDP)[138]. Az MDP széleskörű előfordulása miatt a NOD2 receptor számos patogén baktérium – például *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* és *Staphylococcus aureus* – felismerésére alkalmas; az N-glikozilált muramil-dipeptid (például mycobaktériumokban) ugyanakkor nagyobb hatásfokkal aktiválja a receptort, mint az N-acetilált forma, amely a Gram+ és Gram- baktériumok általános alkotója[139]. Mivel a NOD2 intracelluláris szenzor, ezért szerepe elsősorban potenciális veszély esetén jelentős, vagyis amikor a patogén mikrobák már a citoplazmába jutottak. Amint a NOD2 molekula aktiválódik, a RICK/Rip2 (CARD3) protein kinázhoz és CARD9 fehérjéhez kapcsolódik, majd a nukleáris faktor kappa B (NFκB) és a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitel aktiválásán keresztül proinflammatorikus citokinek (többek között TNFα, IL6 és IL1β) termelését váltja ki[140-142]. A Crohn-betegség patogenezise szempontjából fontos, hogy a receptor nemcsak fehérvérsejtekben (antigénprezentáló sejtek, dendritikus sejtek, makrofágok, neutrofil granulociták), illetve endotélsejtekben és fibroblasztokban expresszálódik, de intesztinális epitélsejtekben, illetve a vékonybél Paneth-sejtjeiben is megtalálható.

A NOD2 fehérjét a 12 exonból álló *CARD15* gén kódolja, mely a 16q12 kromoszómarégióban található[137]. A *CARD15* génnek eddig több mint 60 variánsát azonosították, ezek közül 3 mutáció, a missens R702W (rs2066844) és G908R (rs2066845), valamint az 1007fs (rs2066847) inszerció esetén legszembetűnőbb a Crohn-betegséggel való kapcsolat. Mindhárom genetikai eltérés az LRP doménben, illetve ahhoz közel található. A betegséggel a legszorosabb asszociációt mutató 1007fs frameshift mutáció rövidebb fehérjeterméket eredményez (33 disztális aminosav hiányzik a normál fehérjéhez képest), aminek következtében a receptor rögzítése a plazmamembrán belső felszíneihez nem megfelelő[143,144]. A *CARD15* variánsok a kaukázusi eredetű európai Crohn-betegek jelentős részében megtalálhatók, igaz az egyes népcsoportokban igen eltérő gyakorisággal fordulnak elő[51,145-156]. Egyetlen *CARD15* mutáció hordozása a Crohn-betegség kialakulásának relatív kockázatát 2-4-szeresre, legalább két mutáció együttes jelenléte (compound heterozigóta vagy homozigóta formában) pedig már akár 15-40-szeresére is emelheti[51,147,154,157-160]. Ezen variánsok hajlamosító hatása CD-specifikus jelleget mutat, colitis ulcerosában nem találtak kapcsolatot[59,152,161]. Ami a Crohn-betegség fenotípusát illeti, a *CARD15* variánsok elsősorban ileális lokalizációval[14,58,145-149,151-153,156,157,161-167], a szűkületek megjelenésével és/vagy penetráló jelleggel[145,148,152,153,157,161-163,167], valamint korai manifesztációval mutatnak összefüggést[154,155,161,162]. Magyar populációban Lakatos és munkatársai írták le elsőként a *CARD15* variánsok előfordulását: tanulmányukban az R702W és 1007fs mutációk és a Crohn-betegség kapcsolatát erősítették meg, a harmadik variáns viszont semleges hatásúnak bizonyult[14,163,168]. A *CARD15* variánsok előfordulása a különböző ázsiai populációkban viszonylag alacsony, a betegség kialakulásával pedig egyáltalán nem mutatnak összefüggést[169-174].

A NOD2 működésének zavara nagy valószínűséggel az intesztinális immunhomeosztázis felborulásához vezet (**2. ábra**), ám ebben a *CARD15* variánsok pontos szerepe nem teljesen tisztázott. TNFα-val, illetve INFγ-val indukálható a NOD2 fehérje expressziója az intesztinális epitélsejtekben[175], ezt bizonyítja a két azonosított NFκB kötőhely a gén promóter régiójában. Crohn-betegek intesztinális epitélsejtjeiben és makrofágjaiban a gyulladásos folyamatok hatására megemelkedett NOD2-szint mutatható ki[175,176]. A *CARD15* mutációkat hordozó CD betegekben egyes – a variánsok „gain of function” hatását feltételező – eredmények szerint fokozott NFκB aktiváció figyelhető meg (ennek oka valószínűleg a nagyobb mennyiségű mukózális endotoxin jelenléte)[177]. Más vélemények szerint viszont a *CARD15* mutációk miatt módosult fehérje nem képes MDP stimuláció hatására az NFκB-t

aktiválni[138,178-181]. MDP-vel stimulált humán primer sejtekben a homozigóta, illetve „compound” heterozigóta genotípus esetén alacsonyabb szintű NFκB aktivációt mértek normál *CARD15* genotípushoz képest[182]. Crohn-betegekből izolált perifériás mononukleáris sejtek (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) gyulladásos citokin termelése (elsősorban TNFα, IL1β és IL8) az 1007fs mutáció hatására csökken[72,183,184]. Ezek, a *CARD15* variánsok hatását „loss of function” jelenségként magyarázó adatok szöges ellentétben állnak azonban azzal a ténnyel, hogy a betegséghez az NFκB célgének (TNFα, IL1β, IL6, IL12) magas expressziója társul. A *CARD15* génvariánsok funkcióját vizsgáló állatkísérletek eredményei szintén ellentmondóak[185-187].

A *NOD2* mutációk a Paneth-sejtek defenzin termelését is befolyásolják: elégtelen NOD2 működés esetén a Paneth-sejtek antibakteriális peptid szekréciója csökken, ami elősegítheti a baktériumok mukózába jutását[188,189].



2. ábra A NOD2 fehérje szerepe az intesztinális homeosztázis fenntartásában[190]. REGIIIγ: regenerating islet-derived protein IIIγ; CCL2: CC-kemokin ligand 2; CCR2: CC-kemokin receptor 2; RIP2: kinase receptor-interacting protein 2; NFκB: nukleáris faktor kappa B.

Számos egér, illetve humán PBMC-vel végzett kísérlet szerint a NOD2 stimuláció és a TLR-ok (TLR2, TLR3, TLR4, TLR9) aktiválódása között lehetséges a szinergia[186,191-194], ennek oka valószínűleg a különböző PRR-mediálta jelátvitel downstream eseményei közötti

átfedés (pl.: NFκB és MAPK aktiválás). A NOD2 bizonyos citokinekkel (pl.: TNFα, IL32) szintén szinergista módon működik közre, ez a hatás azonban az 1007fs mutációt hordozókban gyengébb[195-198].

A *CARD15* szerepét a betegség patogenezisében az is alátámasztja, hogy a gén NBD doménjének bizonyos mutációi egy másik, ugyancsak granulomatózus gyulladásos betegség, az ízületeket érintő monogénes öröklődésű Blau-szindróma kialakulásával mutatnak kapcsolatot[199].

Mivel a Crohn-betegek jelentős része (kb. 60-70%-a) nem hordozza a fenti három *CARD15* variáns egyikét sem, és ezekben a betegekben az IBD1 lókusz és a CD közti kapcsoltság a három mutáció hiányában is fennáll, megindult a kutatás további hajlamosító *CARD15* génvariánsok után[161,163,200-203].

Autophagy 16-like 1 (ATG16L1) – IBD10 – Autofágia szabályozás

Az autofágia (autofagocitózis) alapvető, komplex sejtbiológiai folyamat, mely elsősorban a hosszú életidejű fehérjemolekulák, illetve a feleslegessé vált, elöregedett sejtalkotók citoplazmából történő eltávolítását végzi[204]. Különböző stresszhatások, például tartós tápanyaghiány is indukálhat autofág folyamatokat, ekkor a túlélés érdekében egyes sejtkomponensek lebontásával, újrahasznosításával nyer energiát a sejt[204]. Az autofágia azonban nemcsak az intracelluláris homeosztázis fenntartásához, illetve a sejt túléléséhez nélkülözhetelen, éppúgy fontos szerepet játszik a különböző fejlődési és differenciációs folyamatokban is. Hibás működése esetén tumoros, neurodegeneratív, máj-, és szívbetegségek alakulhatnak ki, öregedési folyamatok indulnak el[204]. Az adaptív immunválasz során szintén autofagocitózis révén történik az endogén antigének feldolgozása, illetve bemutatása MHCII molekulán keresztül; így az autofágia részt vesz az intracelluláris mikrobák eliminálásában, a B- és T-sejt funkció, valamint a centrális tolerancia kialakításában is[205] (**3. ábra**).

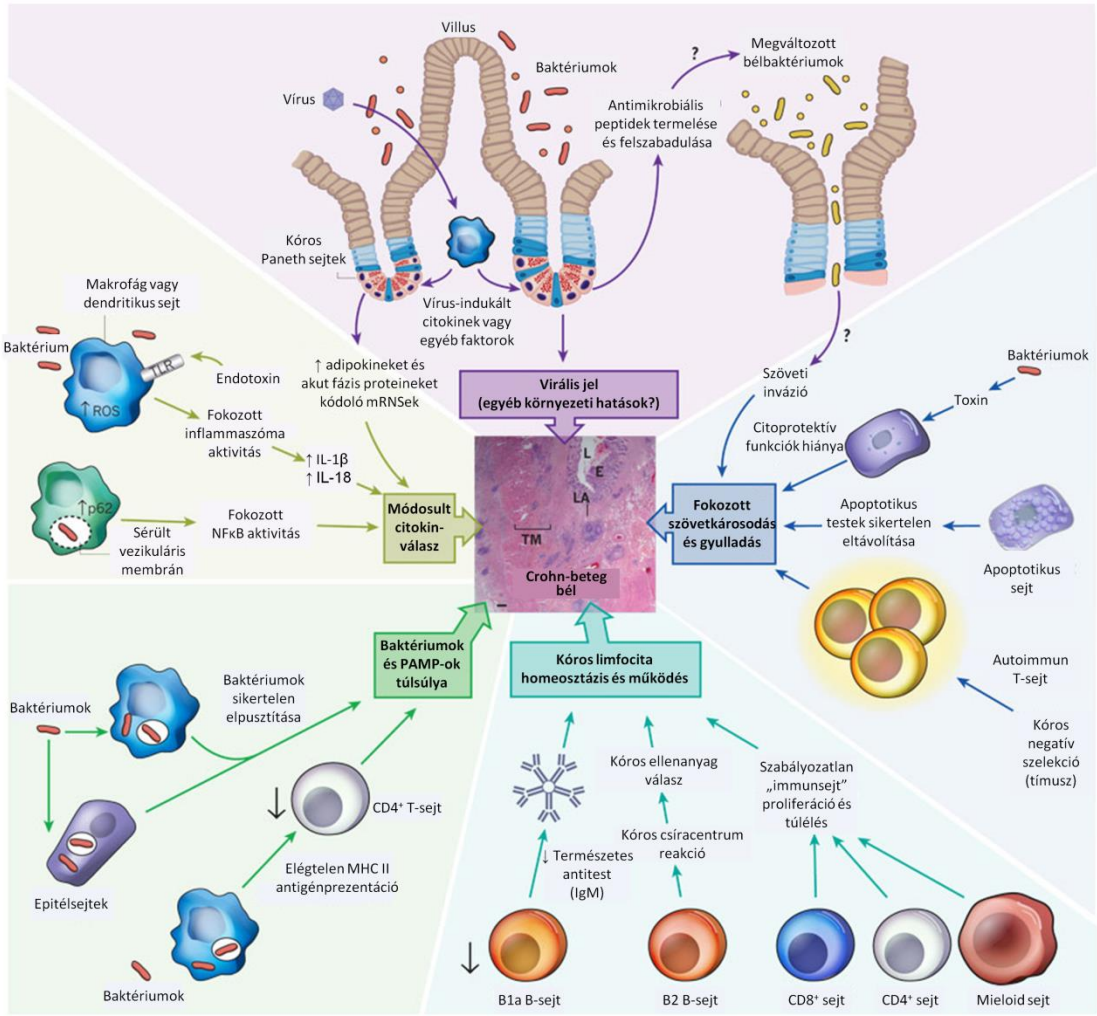
A (makro)autofágia folyamatának precíz végrehajtását az ATG (autophagy-related) proteinek összehangolt működése biztosítja, közülük az ATG16L1 fehérje modulátor funkciót lát el[206]. Az ATG16L1 az ATG5 és ATG12 molekulákkal együtt egy 350 kDa tömegű protein komplexet hoz létre, mely az autofág-rendszer membrán lokalizációjáért felel, illetve további fehérjékkel együtt az autofagoszóma-képzésben játszik kulcsszerepet[206]. Az ATG16L1 fehérjét egy centrálisan elhelyezkedő coiled-coil domén, illetve C-terminálisan elhelyezkedő

7 triptofán-aszparaginsav dipeptid repeat építi fel[207]. Előbbi a homo multimerek kialakításában vesz részt, utóbbi funkciója még ismeretlen[207].

Az ATG16L1 proteint kódoló gén a 2q37.1 kromoszómarégióban található, 19 exonból áll, mérete 43,9 kb[208]. A gén egy mutációját, a T300A aminosav pozícióban található treonin-alanin szubsztitúciót (rs2241880) elsőként Hampe és munkatársai hozták összefüggésbe a Crohn-betegség kialakulásával 2007-ben[82]; ezt követően a polimorfizmus és a Crohn-betegségre való hajlam közti kapcsolat számos nemzetközi tanulmányban is szignifikánsnak bizonyult[85,119,209-211]. Ez a variáns magyar Crohn-betegekben szintén kockázati tényezőt jelent [121,212]. Egy 2009-ben publikált nagyszabású, 13022 Crohn beteg és 17532 kontroll mintáját feldolgozó, 24 korábbi tanulmány eredményét elemző metaanalízis is megerősítette az rs2241880 hajlamosító szerepét a kaukázusi populációban[213]. Érdekes, hogy az ázsiai populációban nem találtak asszociációt a betegség kialakulásával[213]. A legtöbb tanulmányban az *ATG16L1* T300A variáns homozigóta genotípusa mutat szignifikáns összefüggést a betegség megjelenésével, hatása tehát recesszív módon érvényesül. Az ATG16L1 elsősorban a vékony- és vastagbél epitélsejtjeiben, fehérvérsejtekben, illetve a lépben expresszálódik[82]. A vékonybélben található Paneth-sejtekben is kimutatták az ATG16L1 jelenlétét: itt az antimikrobiális peptideket tartalmazó (pl.: defenzin) szekréciós granulumok exocitózisában játszik szerepet[214]. Az ATG16L1-nek eddig 5 splice variánsa ismert, amelyek expressziója ugyanakkor nem mutat különbséget a Crohn-betegek mintái és az egészséges kontroll szövetek között[82].

Az *ATG16L1* T300A variáns szerepét humán sejtvonalakon, illetve transzgenikus egérmodellekben is vizsgálták. Az *ATG16L1* T300A variáns jelenlétében a vizsgált humán intesztinális epitélsejtek (Caco-2 sejtvonal) csökkent hatékonysággal képesek autofágia révén eliminálni az internalizált *Salmonella typhimurium* patogént[215].

Cadwell és munkatársai több kísérletben vizsgálták az ATG16L1 Paneth-sejtekben játszott szerepét[214,216,217]. Az *ATG16L1*-szuppresszált egérben normál ileum és colon morfológia mellett, kóros, szabálytalan és csökkent számú szekréciós granulumok voltak megfigyelhetőek[214]. Az *ATG16L1* variánsra nézve homozigóta CD-betegek ileumából nyert szövetmintákban a Paneth-sejtek az ATG16L1-szuppresszált egérhez hasonlóan kóros morfológiát mutattak[216]. *ATG16L1*-szuppresszált egerekben intesztinális patogén norovírus-fertőzés hatására a Paneth-sejtek abnormális szövettani képe mellett, megváltozott génexpresszió – többek között proinflammatorikus citokinek mRNS szintézise – jelent meg; a kísérleti állatok az intesztinális károsodásra fokozott hajlamot mutattak[217].



3. ábra In vitro kísérletek illetve egérmodellek tanúsága szerint az autofágia defektusai, így a folyamatban részvevő autofág fehérjék hibás működése különböző mechanizmusok útján hozzájárulhat a Crohn-betegség kialakulásához[218]. E: epitélium; IgM: immunglobulin M; L: lumen; LA: limfoid aggregátumok; TM: megvastagodott izomréteg.

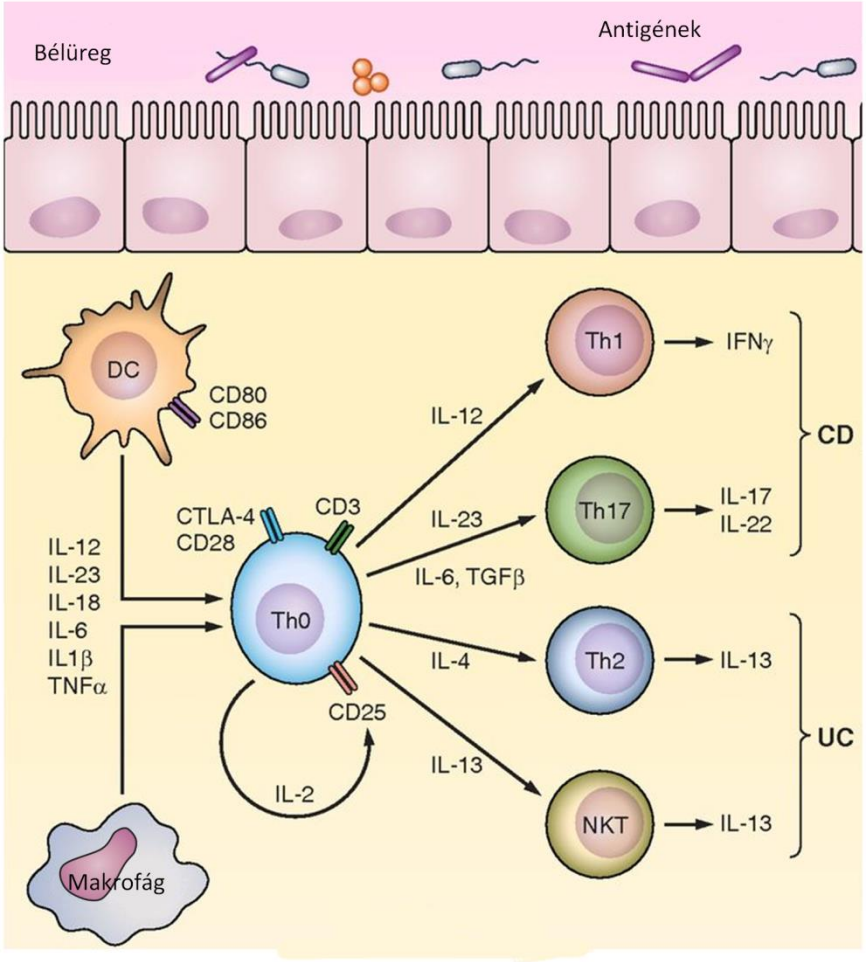
Interleukin 23 receptor (IL23R) – IBD17 – T-sejt differenciáció, gyulladás

A Crohn-betegekben manifesztálódó szövetkárosodásért az adaptív immunitás túlzott reakciója tehető felelőssé. Régóta ismert az a tény is, hogy CD-ben mind a perifériás, mind a centrális T helper (Th) sejtek INFγ-termelő Th1 irányba polarizálódnak, Th1 dominancia alakul ki, amely a gyulladásos folyamatoknak kedvez[219].

A Th1 sejtek mellett a T-limfociták egy másik alpopulációja is fontos szerephez jut a Crohn-betegség kialakulásában. A $CD4^+$ és $CD25^-$ Th17 limfociták legfőbb sajátossága az IL17 (főleg IL17A és IL17F) proinflammatorikus citokin termelése[220]. Az IL17-szekréció mellett a sejtek IL22, IL21, illetve CCL20 (CC kemokin receptor 6) expressziója is ismert[221].

Míg az IL21 termelését az IL6 indukálja (STAT3-függő módon)[221,222], addig a bél területére immunsejteket toborzó CCL20 expresszióját az IL17A indukálja[223]. A naiv T0 sejtek Th17 irányba történő differenciálódását az IL23 és TGFβ citokinek egyidejű expressziója váltja ki: gyulladásos citokinek (pl.: IL6) jelenlétében a TGFβ Th17 irányú elköteleződést indukál, míg az IL23 inkább a Th17 sejtpopuláció felsokszorozásában, illetve fenntartásában vesz részt[224] (**4. ábra**).

E két molekula egyébként fontos szerepet játszik a gyulladásgátló regulátoros T-sejtek (Treg) és a gyulladásserkentő Th17 limfociták közti egyensúly kialakításában is: IL23 hiányában a TGFβ $FoxP3^+$ Treg fejlődést vált ki[225]; IL23 hatására ugyanakkor csökken a bélben a $FoxP3^+$ sejtek száma, ami a gyulladás kialakulásának kedvez[226]. A Th17-sejtek felé történő differenciációt a STAT3, valamint a RORγ és RORα (retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma és alpha) transzkripciós faktorok serkentik, a Th1 és Th2 irányú fejlődést vezérlő transzkripciós faktorok viszont gátolják[227,228].



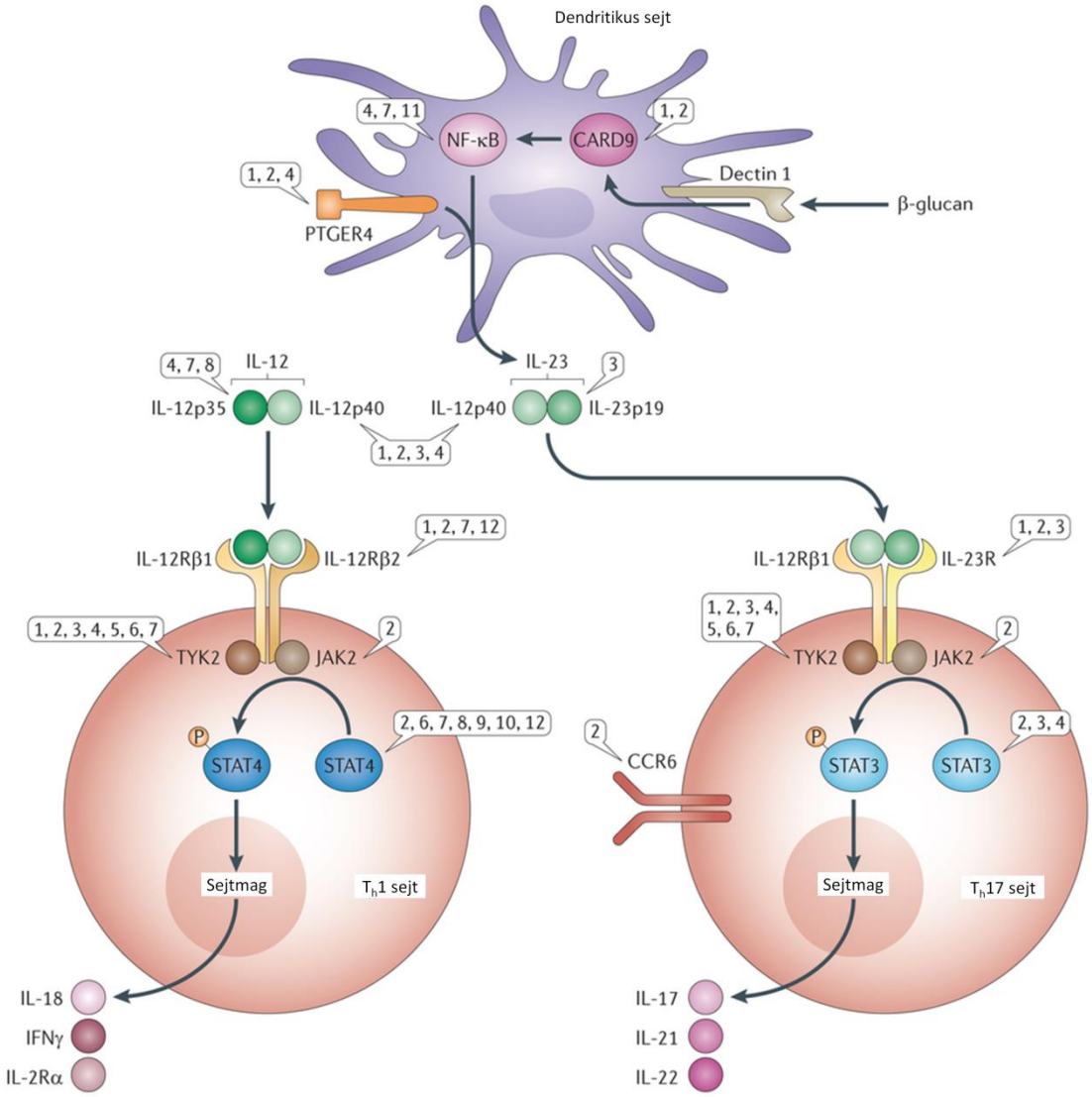
4. ábra T-sejt differenciáció[229]. CD: Crohn-betegség; UC: colitis ulcerosa.

Az elsősorban aktivált makrofágok, illetve dendritikus sejtek által termelt, p40 (IL12-vel közös) és a p19 alegységekből felépülő IL23 a Th17 sejtek IL17-expresszióját fokozza (IL17A, IL17F)[230]. Az IL17A az epitél- és endotélsejteken, fibroblasztokon és a leukocitákon található sejtfelszíni receptorán keresztül további gyulladásos mediátorok felszabadításával és a neutrofil granulociták aktiválásával vesz részt az immunválasz szabályozásában[231,232]. Az immunreguláció érzékeny egyensúlyának megbomlása gyulladásos és autoimmun betegségekhez vezet.

Az IL23/IL17 tengely kulcsfontosságú a krónikus gyulladásos folyamatok kialakulásában, bakteriális fertőzések elleni védekezésben; T-sejtek, makrofágok, fibroblasztok, endotélsejtek, epitélsejtek aktiválása révén lokális gyulladást indukál, gyulladásos citokinek, kemokinek, metalloproteinázok termelődését indítja el[232]. Az ileális dendritikus sejtek fokozott IL23 szekréciója indukált, T-sejt mediált colitises egérmodellben[234-236], illetve Crohn-betegekben[237] azt bizonyítja, hogy az IL23 döntő szerepet játszik a betegség patogenezisében. Az IL12 és IL23 citokineket egyaránt blokkoló, a p40 alegységet felismerő neutralizáló antitestekkel fékezhető a krónikus bélgyulladás kísérletes állatmodellben[238]. Kutatások igazolták, hogy IL23-specifikus p19 elleni ellenanyaggal hatékonyan kezelhető az aktív colitis[239].

A heterodimer IL23 funkcionális receptora a szintén heterodimer IL23R fehérje, amely elsősorban aktivált mieloid sejteken (makrofágok, dendritikus sejtek), illetve T-limfocitákon expresszálódik. A receptort felépítő két alegység közül az egyik az IL12R-al közös (IL12Rβ1, 19p13), míg a másik az IL23R-ra specifikus[240] (**5. ábra**). Az utóbbi, 629 aminosavból álló I-es típusú transzmembrán fehérje részei: szignál peptid, N-terminális fibronektin III-szerű domén, és egy 252 aminosavból álló, 3 potenciális tirozin foszforilációs helyet tartalmazó citoplazmatikus domén[240].

A fehérjét kódoló, nagyjából 92kb méretű gén az 1p31 kromoszómarégióban található, legalább 12 exon (Yu és Gallagher szerint 10-11 exon[241]) építi fel[240]. Az IL23R-nak számos izoformája létezik, humán mitogén-aktivált leukocitákban (PBMC) eddig 25 splice variánst azonosítottak[242,243]. Yu és Gallagher 2010-ben egy olyan 9 exonból álló splice variánst is detektált, amelyből a 9. exon hiányzik; ez a Δ9-nek elnevezett variáns a humán PBMC sejtek által expresszált összes IL23R mRNS mintegy 12-20%-át teszi ki[241].



5. ábra Az IL23R útvonal számos immunmediált kórképpel, köztük gyulladásos bélbetegséggel is összefüggést mutat[233]. 1: Spondylitis ankylopoetica; **2: Gyulladásos bélbetegségek;** 3: Psoriasis; 4: Sclerosis multiplex; 5: I-es típusú cukorbetegség; 6: Rheumatiod arthritis; 7: Primer biliáris cirrhosis; 8: Cöliákia; 9: Szisztémás lupus erythematosus; 10: Sjögren szindróma; 11: Colitis ulcerosa; 12: Behcet-kór. CARD9: caspase recruitment domain-containing protein 9; CCR6: CC kemokin receptor 6; IFNγ: interferon-γ; JAK2: Janus kináz 2; NF-κB: nukleáris faktor-κB; PTGER4: prosztaglandin E2 receptor EP4 altípus; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; TYK2: tirozin kináz 21.

Az *IL23R* és az *IL12Rβ2* gének közti szakaszon, illetve magában az *IL23R* génben található polimorfizmusok és a Crohn-betegség között elsőként Duerr és munkatársai[97] mutattak ki szignifikáns kapcsolatot. Az általuk leírt 10 SNP közül kiemelkedik az egészen alacsony allélfrekvenciát mutató variáns; ez, a fehérje citoplazmatikus doménjében lokalizálódó missense R381Q (rs11209026, 1142G>A, missense) mutáció erős védő hatással bír. A kutatócsoport további 9 SNP (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841,

rs11465804, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965) esetén talált szoros asszociációt a betegséggel. Az *IL23R* génvariánsok szerepét számos külföldi tanulmány vizsgálta és erősítette meg[85,89,98,99,119,120,244-249]. A dolgozatban vizsgált rs1004819 és CD közti kapcsolatot Glas, illetve Einarsdottir kutatócsoport is igazolta[120,250]. Érdekes, hogy egyedülálló módon a japán populációban nem találtak összefüggést az *IL23R* variánsok és a betegség kialakulása között[251]. Magyar Crohn-betegekben a – nemzetközi eredményekhez hasonlóan – az R381Q védő faktornak bizonyult[212], sőt, a gén 3'UTR régiójában található rs10889677 és az intronikus rs2201841 polimorfizmusok hajlamosító szerepét is sikerült bizonyítani[252].

A Wellcome Trust Case Control Consortium[98] és az Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium[253] eredményei azt bizonyítják, hogy az *IL23R* a főbb szeronegatív betegségek közös rizikófaktora. Az IL23-Th17 útvonal több további elemét (pl.: IL12p40, STAT3, JAK2, CCR6, TNFSF15, Tyk2) kódoló gének egyes variánsai szintén összefüggést mutatnak a betegséggel[254] (**5. ábra**).

Citotoxikus T limfocita antigén 4 (CTLA4) – T-sejt válasz gátlása, T-sejtes tolerancia kialakítása

A T-sejt aktiváció két jelet igényel, a T-sejt receptor (TCR) komplexen keresztüli antigén-specifikus stimuláció csak az ún. kostimulációs szignállal együtt vezet teljes aktivációhoz. Ezt a második jelet a CD28 molekula közvetíti, mely az APC felszínén megjelenő B7-1 (CD80) és B7-2 (CD86) ligandokat köti[255]. A CD28 kostimuláció az aktivált T-sejtekben az apoptotikus jelátviteli utakat bekapcsoló folyamatoknak is fontos eleme, a CD28-on keresztüli jelátvitel a sejtek túlélését segíti elő[256]. A B7 ligandokat nagyobb affinitással kötő sejtfelszíni CTLA4 molekula a T-sejt aktiváció későbbi szakaszában, az aktivációt követően 1-2 nappal jelenik meg, és a CD28 molekulával ellentétben gátló jeleket továbbít a T-sejt számára[257]. A CTLA4 molekula kötése gátolja az IL2 termelést[258], a CTLA4 jelátvitel gátlása éppen ezért serkenti a Th1-sejtek IL2, INFγ, IL3, TNFα termelését, valamint a Th2-sejtek IL3, IL4, IL5 és IL10 szekrécióját. A CTLA4 pontos hatásmechanizmusáról az utóbbi években egyre több adat került napvilágra. Kiderült, hogy a CTLA4-t expresszáló sejtek az APC felszínéről transz-endocitózissal képesek eltávolítani a B7-1 és B7-2 ligandmolekulákat, amelyek ezt követően a sejten belül lebontásra kerülnek[259,260]. Sőt, a CTLA4 a B7 ligandok hiányában is képes gátolni a TCR aktivációt[261].

A T-sejt aktiváció leállításán kívül a CD28 és CTLA4 molekulák a T-sejtes tolerancia kialakításában is fontos szerepet játszanak. Az immunrendszer különböző szabályozómechanizmusokkal biztosítja az immunológiai toleranciát. A centrális tolerancia az a mechanizmus, amikor a saját antigénekkel nagy-affinitással reagáló ún. autoreaktív limfociták érésük során klonális delécióval eliminálódnak. Erre a sorsra jut az autoreaktív timociták jelentős része is a tímuszban; a perifériára kerülő érett autoreaktív T-sejteket a perifériás tolerancia révén – többek között a tímuszban, illetve a periférián képződő regulátoros T-sejtek közreműködésével – ártalmatlanítja az immunrendszer. A CD28 és CTLA4 molekula a timociták negatív szelekciójának szabályozásában is részt vesz: a CD28 kostimuláció az autoreaktív $CD4^+$ T-sejtek klonális delécióját[262,263], míg a CTLA4 jelátvitel a timociták túlélését segíti elő[264-267]. Az, hogy a CTLA4 expressziója a csecsemőmirigy kortikomedulláris területén a legmagasabb, megerősíti a timociták negatív szelekciójában játszott szerepét[268].

Az adaptív immunválasz szabályozásában a $CD4^+$ regulátoros T-sejtek központi szerepet játszanak, számuk egyes autoimmun kórképekben csökken, míg rosszindulatú daganatos betegségekben nő[269]. Ezen sejtek jellegzetes sajátsága a forkhead családba tartozó transzkripciós faktor, a FoxP3 expressziója. Azokban a Crohn-betegekben, akik még nem kaptak kezelést, a perifériás Treg szám alacsony, terápia hatására, illetve remisszióban viszont megemelkedik[270,271]. A természetes Treg sejtek (nTreg) a tímuszban saját antigéneket felismerő $CD4^+$ $FoxP3^-$ prekurzorokból keletkeznek a TCR-autoantigén-MHCII kontaktus hatására. CD-ben a betegség aktív fázisában ez a centrális Treg populáció a bélben megnövekszik[271,272]. A regulátoros T limfociták másik alpopulációja, az ún. indukált Treg-ek (iTreg) a periférián a TCR közvetítette jel, illetve különböző citokinek (TGFβ, IL2, IL4, IL10) hatására differenciálódnak autoreaktív $CD4^+$ $FoxP3^-$ sejtekből[273]. A CD28 molekula a T-reg populációra is hatással van, a CD28 kostimuláció a periférián gátolja FoxP3 expressziót, és így az iTreg képződést[274,275]. A CD28-deficiens egerek tímuszában, illetve a periférián egyaránt csökken a $FoxP3^+$ regulátoros T-limfociták száma[276-278]. In vitro eredmények szerint a CTLA4, bár nem nélkülözhetetlen az iTreg képződéshez, a CTLA4-kötődés ugyanakkor fokozza a FoxP3 expressziót a sejtekben[279]. In vivo kísérletek igazolták, hogy a T-sejt receptor génátrendeződését irányító RAG-deficiens ($Rag^{-/-}$) egérben a $Ctla4^{-/-}$ egérből származó $CD4^+$ T-sejteknek csak csökkent hányada differenciálódik $FoxP3^+$ sejtté; a CTLA4 elősegíti a $FoxP3^+$ sejtek felhalmozódását a colon lamina propriában, míg a tímusz, lép, illetve mesenterikus nyirokcsomókban nem befolyásolja a T-reg populáció méretét[279].

A Treg sejtek hatásmechanizmusai közül a CTLA4 függő szuppresszió jelentőségét támasztja alá, hogy az aktivált T-sejteken kívül a perifférián található FoxP3^{+} Treg sejtek jelentős része is expresszál CTLA4-t[280,281], méghozzá konstitutívan és nagy mennyiségben[282]. A CTLA4 gátlása esetén állatmodellben szervspecifikus autoimmun betegségek, IBD és cukorbetegség idézhető elő[280]. A Treg sejtek CTLA4 dependens gátló hatása döntően az APC-ken keresztül valósul meg[283].

A CTLA4 fehérje – a vele szerkezetileg 30%-ban megegyező CD28-al együtt – az immunglobulin szupergén családba tartozik. A sejtfelszíni 45 kDa tömegű homodimer molekula[284] mellett egy 23 kDa-os monomer szolubilis formát is azonosítottak[257], funkcionális vizsgálatok szerint az utóbbi expressziója T-sejt aktiváció hatására csökken, míg a membránkötött CTLA4 formáé nő.

A CTLA4 fehérjét kódoló 4 exonból álló gén a 2q33.2 kromoszómarégióban található; az *ICOS*, *CTLA4* és *CD28* géncsoport tagja[285]. A génnek több egypontos variánsa is ismert, elsőként a leader peptid 17-es aminosav pozíciójában treonin-alanin szubtitucióval járó +49A/G mutációt azonosították[286]. Ezt a variánst számos autoimmun betegségben, így I-es típusú cukorbetegségben[286-293], sclerosis multiplexben[294-297], Graves-kórban[289,298-300], Hashimoto thyroiditisben[301], rheumatoid arthritisben[302,303] valamint cöliákiában[304-310] egyaránt vizsgálták. Az említett betegségek túlnyomó részében a G allélt találták hajlamosító hatásúnak, cöliákiában ugyanakkor az A allél esetén nő a betegség kialakulásának kockázata, míg más tanulmányokban egyik allél sem mutatott szignifikáns asszociációt a vizsgált autoimmun betegségekkel. A +49A/G mutáció Crohn-betegségben játszott szerepe sem teljesen tisztázott. Egy japán tanulmányban a GG genotípus hajlamosító hatását írták le, amely azonban kizárólag fisztulás betegek esetén volt szignifikáns (OR=2,67; P=0,038)[311]. Ezzel szemben Ben Alaya és munkatársai a másik allél, illetve az AA genotípus esetén igazoltak asszociációt a betegséggel (OR=1,90 és 4,41; P=0.002 és P=0,0003)[312]. Holland[313], kínai[313,314], cseh[315] és magyar[316] Crohn-os betegpopulációt vizsgáló tanulmányok mind negatív eredménnyel zárultak.

In vitro kísérletek szerint a *CTLA4* +49 GG homozigóta genotípus esetén az AA genotípushoz képest a T-sejtosztódás kontrollja csökkent mértékű[317], a GG genotípus így fokozott mértékű sejtosztódást eredményez, szemben az AA genotípusú sejtekkel, amelyek osztódása jobban szabályozott[318].

A *CTLA4* génnek számos további variánsa is ismert (például -1722T, -318 C/T, CT60 A/G, 6230 A/G, 3' UTR (AT)n). Ezek közül a leggyakrabban vizsgált CT60 variáns nem hajlamosít Crohn-betegségre[311,313,319]. Az (AT)n ismétlődés (rs60872763) 84 bp hosszú allélje

ugyanakkor szignifikáns asszociációt mutat a betegség kialakulásával a közép-kínai populációban[320].

Számos esetben a +49 A/G mutáció hatását nem önmagában, hanem több más *CTLA4* variánssal együtt vizsgálják[296,321-324], illetve a kromoszómarégióban tapasztalható nagyfokú kapcsoltság miatt az *ICOS* és *CD28* génvariánsokkal[325] alkotott haplotípus hatását mérik.

IBD5

Az 5q31 régióban található[64,66] nagyjából 250 kb kiterjedésű lókusz – az ún. IBD5 rizikó haplotípus – és a Crohn-betegség között szignifikáns asszociáció áll fenn[66,78]. Ebben a régióban számos, az immunológiai folyamatokat szabályozó – és így a betegség szempontjából érdekes – citokint kódoló gén található, mint például az IL4, IL5, IL13 citokin gének. Rioux és munkatársai 11 olyan egyenértékű, az IBD5 kockázati haplotípust alkotó, „helyettesítő" SNP-t jelöltek ki, amelyek önmagukban is – a haplotípussal pontosan megegyező mértékben – hajlamosítanak a betegségre, így bármelyikük felhasználható a további asszociációs vizsgálatokban[78,116,117,326-330]. E markerek közül talán legnépszerűbbek a IGR2096a_1, IGR2198a_1 és IGR2230a_1 polimorfizmusok.

Fokozatosan az IBD5 régióban helyet foglaló organikus kation transzporter gének (*OCTN1* és *OCTN2*, másnéven *SLC22A4* és *SLC22A5*) is a figyelem középpontjába kerültek. Az *SLC22A4* 9-es exonjában elhelyezkedő C1672T (L503F) és az *SLC22A5* promóter régiójában található G-207C polimorfizmusok között erős kapcsoltság áll fenn, az általuk alkotott TC haplotípus Crohn-betegekben szignifikánsan gyakrabban fordul elő[331]. Az előzetes funkcionális vizsgálatok azt sugallták, hogy ezek a variánsok az organikus transzporterek transzkripcióját, illetve működését befolyásolják. E haplotípus hajlamosító szerepét több tanulmány is megerősítette[329,332-338], de születtek ezzel ellentétes eredmények is[168,339-341]. Több esetben viszont az *OCTN1/2* génvariánsok csak akkor mutattak szignifikáns kapcsolatot a betegséggel, ha az IBD5 kockázati haplotípus is jelen volt[329,335,338,342-344].

Az *OCTN* gének Crohn-betegség patogenezisében játszott szerepe így idővel egyre inkább megkérdőjeleződött, a régiót jellemző magas LD azonban továbbra is jelentősen megnehezíti a tényleges funkcionálisan hajlamosító gének azonosítását. Silverberg és munkatársai[345] amellett, hogy megerősítették az IBD5 és a Crohn-betegség közti kapcsolatot (IGR2096a_1 marker), felvetették annak lehetőségét is, hogy az IBD5 régióban található további génekben, így az interferon szabályozó faktor 1 (*IRF1*), a PDZ és LIM domén 5 (*PDLIM*), valamint a prolil-4 hidroxiláz (*P4HA2*) génekben is nagy eséllyel lehet a betegség

kialakulásáért felelős igazi variáns. Ezt a véleményt az is alátámasztja, miszerint Crohn-betegekben fokozott IRF1 expresszió, illetve megnövekedett P4HA2 enzimatikus aktivitás mutatható ki[78]. Az *SLC22A5* G-207C mutáció Silverberg eredményei alapján kikerült a potenciális SNP-k köréből; az IBD5 lókusz és a CD kapcsolatát viszont további GWA tanulmányok is megerősítették[82,98,99]

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja a nemzetközi, illetve hazai irodalom által leírt főbb hajlamosító lókuszok, így a *CARD15, ATG16L1, IL23R* gének, valamint az IBD5 lókusz közti statisztikai interakció vizsgálata magyar Crohn-betegekben. A következő polimorfizmusok/mutációk vizsgálatát tűztük ki célul:

1) *CARD15* gén: rs2066844 (R702W), rs2066845 (G908R), rs2066847 (L1007fs)
2) *ATG16L1* gén: rs2241880 (T300A)
3) *IL23R* gén: rs1004819 és rs2201841
4) IBD5 lókusz: rs1762208 (IGR2230a_1), rs11739135 (IGR2198a_1), rs12521868 (IGR2096a_1)

Célunk volt továbbá a *CTLA4* gén +49A/G (rs231775) mutáció, valamint a három fenti IBD5 variáns kombinációjának statisztikai elemzése a hazai Crohn-beteg populációban.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált populáció

3.1.1. Crohn-betegek

Intézetünk biobankja a Nemzeti Biobank Hálózat (www.biobanks.hu) tagjaként működik, valamint részét képezi az összeurópai Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI) programnak (http://bbmri.eu/bbmri/). Az általunk vizsgált Crohn-betegek mintái - melyek gyűjtése 2003 óta folyamatosan zajlik az Orvosi Genetikai Intézetben - az ország több pontjáról érkeztek. A minták gyűjtésének színhelyei Szombathely (Dr. Lakner Lilla, Vas Megyei Markusovszky Kórház, Gasztroenterológiai és Belgyógyászati Osztály), Zalaegerszeg (Dr. Gasztonyi Beáta, Dr. Szenes Mária, Zala Megyei Kórház, II. Belgyógyászati Osztály); Pécs (Dr. Gasztonyi Beáta, Dr. Sarlós Patrícia, Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, I.sz Belgyógyászati Klinika); Békéscsaba (Dr. Varga Márta, Réthy Pál Kórház, Belgyógyászati és Gasztroenterológiai Osztály); Miskolc (Dr. Orosz Péter, Bosod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház, Belgyógyászati Klinika) valamint Budapest (Dr. Miheller Pál, Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II Belgyógyászati Klinika) voltak.

A vizsgálatba bevont személyek minden esetben beleegyeztek a genetikai analízisbe, mely etikai bizottsági engedély birtokában (ETT TUKEB), és az 1975-ös Helsinki deklaráció alapelveinek megfelelően történt. Az *IL23R, ATG16L1, CARD15* gének és IBD5 lókusz vizsgálata során 315 Crohn-beteg (151 férfi és 164 nő, átlagéletkor: 38,7 ± 0,79 év) DNS mintáját genotipizáltuk, míg a *CTLA4* gén és IBD5 lókusz analízisébe 305 Crohn-beteget (146 férfi és 159 nő, átlagéletkor 38,7 ± 0,80 év) vontunk be. A genetikai analízist részletes klinikai vizsgálat előzte meg, mely magába foglalta a részletes kórelőzmény felvételét, fizikális és laboratóriumi vizsgálatot, endoszkópos és hisztológiai eljárás során nyert eredményeket.

3.1.2. Kontroll csoport

A kontroll csoportot autoimmun betegségben nem szenvedő, egészséges véradók alkották. A betegekhez korban illeszkedő, egészséges személyek kiválasztása random módon történt. Az *IL23R, ATG16L1, CARD15* gének és IBD5 lókusz vizsgálata során 314 kontroll személy (170 férfi és 144 nő, átlagéletkor 40,8 ± 0,80 év) genotípusát határoztuk meg; a *CTLA4* gén és IBD5 variánsok analízisébe 310 kontroll személyt (169 férfi, 141 nő, átlagéletkor 40,8 ± 0,80 év) vontunk be.

3.2. Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1. PCR reakció

Vizsgálatainkat EDTA-val alvadásgátolt perifériás vérből rutin kisózásos módszerrel izolált DNS mintákon végeztük el. Az amplifikációhoz általunk tervezett, specifikus primereket használtunk (**4. táblázat**). A PCR reakció a következő kondíciók szerint történt: elődenaturáció 2 perc 96°C-on, ezt követően 35 cikluson keresztül 30 másodperc denaturálás 95°C-on, primerkötődés: 45 másodperc 50ºC-on (rs2066844), 54 ºC-on (rs1004819), 55ºC-on (rs2241880 és rs2201841), 58ºC-on (rs17622208, rs11739135, rs12521868 és rs231775), 60ºC (rs2066847), illetve 62ºC-on (rs2066845), majd 45 másodperc extenzió 72°C-on, amelyet 5 perc végső extenzió követett 72°C-on. A PCR termék detektálása gélelektroforézissel, 1,5%-os agaróz gélen, etidium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt.

5. táblázat Primer szekvenciák

Gén/Lókusz	SNP	Primerek (5'-3')
IL23R	rs1004819	Forward: GCATTCTAGGACCGTTTTGG Reverse: ATCTGGTGGAAATATGTGAAACCTA
IL23R	rs2201841	Forward: GGCAAAAGGGAATTGAGAGG Reverse: GGCCTATGATTATGCTTTTTCCTG[#]
ATG16L1	rs2241880	Forward: CTCTGTCACCATATCAAGCGTGG Reverse: TCTAGAAGGACAGGCTATCAACAGATG
CARD15	rs2066844	Forward: GAGCCGCACAACCTTCAGATC Reverse: ACTTGAGGTGCCCAACATTCAG
CARD15	rs2066845	Forward: GAGGCCACTCTGGGATTGAG Reverse: TAGACTCTGAAGCTTACCTGCGC[#]
CARD15	rs2066847	Forward: TGGCTAACTCCTGCAGTCTC Reverse: GATCCTCAAAATTCTGCCATTC
IBD5	rs1762208	Forward: CAGAAGAATGCCCTTGATGTG Reverse: TCAGAAGCTGTCCATCCCAC
IBD5	rs11739135	Forward: AGACACTGGGACATCATCTGTCTG Reverse: GGGCAATTCTATGAGGACATTTAGA
IBD5	rs12521868	Forward: CAAGATTTCTGCCATAGCCTCCT Reverse: GGAGGGTGGTGTAGCCAGAGTAG
CTLA4	rs231775	Forward: GTTCAAACACATTTCAAAGCTTCAG Reverse: TATTCAGGACTATGGCTATCCTTTC

[#]Mismatch bázist aláhúzással jelöltük.

3.2.2. RFLP

A genotípusok meghatározásához (rs2066844 kivételével) restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) vizsgálatot alkalmaztunk. A módszerek tervezésénél, a restrikciós endonukleázok kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy valamennyi PCR termék tartalmazzon egy, az emésztés hatékonyságának ellenőrzésére szolgáló obligát hasítóhelyet is. A vizsgálat során használt endonukleázokat, valamint azok hasítási mintázatát az **5. táblázat** foglalja össze. A reakcióhoz 1 U specifikus enzimet, 10-15 µl PCR-terméket, 10x puffert és steril desztillált vizet használtunk, majd az inkubálást a restrikciós enzim hőmérsékleti igényeinek megfelelően végeztük. Az egyes DNS fragmentumok elkülönítése gélelektroforézissel, 3%-os agaróz gélen, etidium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt standard DNS létra mellett.

6. táblázat Restrikciós endonukleázok és hasítási mintázatuk

Gén	Variáns	Endonukleáz	PCR termék	Fragmentek	Genotípus
IL23R	rs1004819	TaaI	270 bp	13+71+185 bp 13+71+185+257 bp 13+257 bp	GG GA AA
IL23R	rs2201841	HpyF3I	420 bp	163+257 bp 25+163+232+257 bp 25+163+232 bp	TT TC CC
ATG16L1	rs2241880	LweI	282 bp	16+266 bp 16+117+149+266 bp 16+117+149 bp	AA AG GG
CARD15	rs2066845	HinP1I	233 bp	22+211bp 22+72+139+211 bp 22+72+139bp	GG GC CC
CARD15	rs2066847	BspLI	273 bp	93+180 bp 41+93+139+180 bp 41+93+139 bp	-- - insC insC insC
IGR2230a_1	rs1762208	DdeI	438 bp	122+128+188 bp 122+128+188+310 bp 128+310 bp	GG GA AA
IGR2198a_1	rs11739135	Hin1II	280 bp	38+60+182 bp 38+60+182+202 bp 60+220 bp	GG GC CC
IGR2096a_1	rs12521868	Tru1I	269 bp	81+188 bp 32+81+156+188 bp 32+81+156 bp	GG GT TT
CTLA4	rs231775	BseXI	527 bp	115+152+260 bp 115+152+260+375 bp 152+375 bp	AA AG GG

3.2.3. Direkt szekvenálás

Valamennyi általunk tervezett PCR-RFLP módszer specificitását direkt szekvenálással ellenőriztük, az rs2066844 variáns genotipizálását pedig kizárólag ezzel a technikával végeztük. A szekvenálás BigDye Terminator v.1.1 cycle sequencing kit alkalmazásával, ABI PRISM 3100 automata szekvenáló készülékkel (Foster City, CA, USA) történt. A szekvenciák analízise a Winstar genetikai programcsomag (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) segítségével történt.

3.3. Statisztikai módszerek

A genetikai kapcsoltság vizsgálatához, illetve a Hardy-Weinberg egyensúly teljesülésének ellenőrzéséhez Haploview 4.1 programot használtunk. A statisztikai analízist SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) programcsalád segítségével végeztük. Az egy-lókusz analízis során az allélfrekvenciák összehasonlítása Pearson χ^2 próbával történt. Az egyes genetikai eltérések és a betegség közötti asszociáció feltárására korra és nemre korrigált bináris logisztikus regressziót alkalmaztunk.

A két-lókusz analízis során a génvariánsok kombinációinak vizsgálata előtt a genotípusokat annak megfelelően csoportosítottuk, hogy az egy-lókusz vizsgálat során az adott mutáció/polimorfizmus domináns (AB+BB) vagy recesszív (BB) jelleget mutatott-e. Mindemellett a *CARD15* gén esetén létrehoztunk egy új kategóriát is (*CARD15* státusz). Utóbbit a következőképpen definiáltuk: a vizsgált személy *CARD15*– (azaz vad típusú), ha mindhárom variánsra nézve normál genotípussal rendelkezik; illetve *CARD15*+, ha legalább egy mutáns allélt hordoz. A különböző kombinációk és a betegség közti asszociáció vizsgálatát logisztikus regresszióval („interaction term” bevonásával), illetve χ^2 próbával végeztük (2x2 kontingencia tábla). Referencia genotípusok: *IL23R* rs1004189 normál (GG); *IL23R* rs2201841 normál+heterozigóta (TT+TC); *ATG16L1* rs2241880 normál+heterozigóta (AA+AG); *CARD15* R702W normál (CC); *CARD15* G908R normál (GG); *CARD15* 1007fs normál (– –); *CARD15*– státusz; IGR2230a_1 normál (GG); IGR2198a_1 normál (GG); IGR2096a_1 normál (GG) genotípus. Az esélyhányados (OR) valamennyi esetben a beteg és a kontroll populáció összehasonlítására vonatkozik 95%-os konfidencia intervallummal (95% CI), a szignifikancia szintet $P<0,05$-nél húztuk meg. Az egyes kombinációk vizsgálata során számos hipotézist teszteltünk, ami korrekciót igényel. Mivel a Bonferroni korrekció

nagyszámú összehasonlítás esetén konzervatív módszer, ezért a többszörös hipotézis korrekciójához Benjamini-Hochberg módszert alkalmaztunk (FDR=0,05).[1]

[1] Az Eredmények c. fejezet táblázatai a dolgozat alapjául szolgáló publikációk eredeti, Benjamini-Hochberg korrekció előtti szignifikancia (*P*) értékeit tartalmazzák. Abban az esetben, ha a *P* értékek utólagos korrekciója során az eredmény szignifikanciája elveszett, ezt minden esetben jelöltük a PhD disszertáció szövegében.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Egy-lókusz eredmények

Allél-és genotípus eloszlás

Valamennyi vizsgált allél eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúly követelményeinek a beteg és kontroll csoportban egyaránt. Az *IL23R*, *ATG16L1*, *CARD15* gének valamint az IBD5 lókusz általunk vizsgált variánsainak allélfrekvenciáit és genotípus eloszlását a **6. és 7. táblázat** mutatja.

7. táblázat Az *IL23R*, *ATG16L1* és IBD5 genotípus-és allélfrekvenciái betegekben és kontrollokban

	CD	Kontroll	OR (95% CI)*	*P*
IL23R (rs1004189)				
GG	119 (37,8%)	151 (48,1%)		
GA	152 (48,3%)	140 (44,6%)		
GA+AA	196 (62,2%)	163 (51,9%)	1,50 (1,09-2,08)	0,013
AA	44 (14,0%)	23 (7,3%)	2,05 (1,20-3,50)	0,008
RAF	0,381	0,296		0,001
IL23R (rs2201841)				
TT	131 (41,6%)	152 (48,4%)		
TC	139 (44,1%)	145 (46,2%)		
TC+CC	184 (58,4%)	162 (52,6%)	1,28 (0,93-1,76)	0,14
CC	45 (14,3%)	17 (5,4%)	2,97 (1,65-5,33)	<0,001
RAF	0,363	0,285		0,003
ATG16L1 T300A (rs2241880)				
AA	56 (17,8%)	72 (22,9%)		
AG	151 (47,9%)	163 (51,9%)		
AG+GG	259 (82,2%)	242 (77,1%)	1,45 (0,98-2,17)	0,06
GG	108 (34,3%)	79 (25,2%)	1,69 (1,19-2,41)	0,004
RAF	0,583	0,511		0,011
IGR2198a_1 (rs11739135)				
GG	91 (28,9%)	120 (38,2%)		
GC	160 (50,8%)	144 (45,9%)		
GC+CC	251 (79,7%)	194 (61,8%)	1,54 (1,10-2,15)	0,013
CC	64 (20,3%)	50 (15,9%)	1,32 (0,87-1,99)	0,19
RAF	0,457	0,389		0,014
IGR2096a_1 (rs12521868)				
GG	94 (29,8%)	120 (38,2%)		
GT	149 (47,3%)	142 (45,2%)		
GT+TT	221 (70,2%)	194 (61,8%)	1,44 (1,03-2,02)	0,034
TT	72 (22,9%)	52 (16,6%)	1,45 (0,97-2,17)	0,07
RAF	0,465	0,392		0,009

RAF: rizikó allél frekvencia; *korra és nemre korrigált érték.

8. táblázat A vizsgált *CARD15* variánsok genotípus-és allélfrekvenciái betegekben és kontrollokban

	CD	Kontroll	OR (95% CI)*	*P*
CARD15 R702W (rs2066844)				
CC	275 (87,3%)	294 (93,6%)		
CT	38 (12,1%)	18 (5,7%)		
CT+TT	40 (12,7%)	20 (6,4%)	2,13 (1,19-3,80)	0,011
TT	2 (0,6%)	2 (0,6%)	0,62 (0,06-6,98)	0,70
RAF	0,067	0,035		0,011
CARD15 G908R (rs2066845)				
GG	299 (94,9%)	305 (97,1%)		
GC	16 (5,1%)	9 (2,9%)		
GC+CC	16 (5,1%)	9 (2,9%)	1,65 (0,71-3,86)	0,24
CC	0 (0,0%)	0 (0,0%)	n	n
RAF	0,025	0,014		0,17
CARD15 L1007fs (rs2066847)				
– –	264 (83,8%)	291 (92,7%)		
– C	42 (13,3%)	23 (7,3%)		
– C+CC	51 (16,2%)	23 (7,3%)	2,57 (1,51-4,36)	<0,001
CC	9 (2,9%)	0 (0,0%)	n	n
RAF	0,095	0,037		<0,001
CARD15 státusz[#]				
–	220 (69,8%)	262 (83,4%)		
+	95 (30,2%)	52 (16,6%)	2,17 (1,46-3,21)	<0,001

RAF: rizikó allél frekvencia; n: nem számolt érték; *korra és nemre korrigált érték.
[#]*CARD15* státusz: – (vad típus) és + (legalább egy mutáns allélt hordozó személy).

Az *IL23R* rs1004819 A allél, illetve rs2201841 C allél gyakrabban fordult elő a betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva (*P*=0,001 és *P*=0,003). Az rs1004819 A allél, illetve a homozigóta genotípus (AA) hordozása egyaránt növelte a betegség kialakulásának kockázatát (*P*=0,013 és *P*=0,008). Az rs2201841 esetén a rizikó allél (C) kizárólag homozigóta formában növelte a Crohn-betegségre való hajlamot (*P*<0,001), mintegy háromszorosára emelve a megbetegedés esélyét. Az *ATG16L1* rs2241880 G allél gyakorisága a kontrollcsoporthoz képest a betegekben magasabbnak adódott (*P*=0,011), a homozigóta genotípus hordozása hajlamosító faktornak mutatkozott (*P*=0,004). Az általunk vizsgált két IBD5 marker (IGR2198a_1 és IGR2096a_1) esetén a két rizikó allél (C és T) Crohn-betegekben gyakrabban fordult elő (*P*=0,014 és *P*=0,009). Mind az IGR2198a_1 C, mind az IGR2096a_1 T allél hordozása és a betegség kialakulása között szignifikáns kapcsolatot találtunk (*P*=0,013 és *P*=0,034). A *CARD15* gén esetén két variáns, az R702W T allél és L1007fs inszerció esetén a betegcsoportban emelkedett allélfrekvenciát mértünk (*P*=0,011 és *P*<0,001), ezen allélek hordozása növelte a betegség kialakulásának esélyét (*P*=0,011 és *P*<0,001). A harmadik *CARD15* variáns (G908R) esetén nem volt különbség a betegek és

kontrollok között sem az allélfrekvenciák, sem a genotípusok szintjén. A három *CARD15* variáns figyelembevételével képzett *CARD15* státusz szintén növelte a betegség kialakulásának kockázatát, a rizikó mértéke az R702W és L1007fs variánsok OR értékei közé esett.

A *CTLA4* gén és IBD5 lókusz általunk vizsgált variánsainak allél-és genotípus megoszlását a **8. táblázat** foglalja össze. A *CTLA4* +49 A/G esetén ugyan nem találtunk szignifikáns különbséget a Crohn-betegek és a kontrollcsoport között, a vadtípusú allél (A) viszont gyakrabban fordult elő a betegekben (*P*=0,073). Az IGR2198a_1 C és IGR2096a_1 T allélek esetén a fentiekhez hasonló eredményt kaptunk. Az IGR2230a_1 marker allél- és genotípus frekvencia értékei nem különböztek a két csoportban.

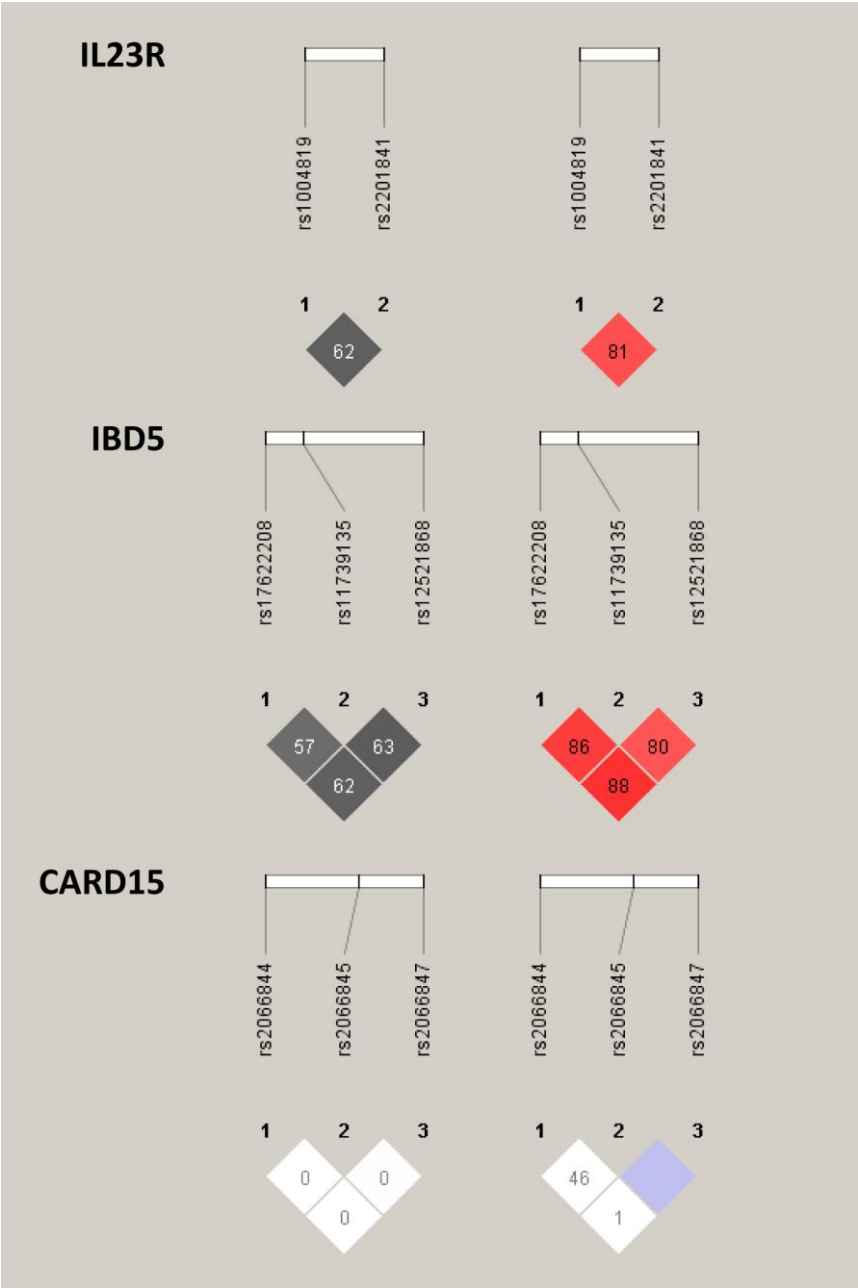
9. táblázat A *CTLA4* és IBD5 genotípus- és allélfrekvenciái betegekben és kontrollokban

	CD	**Kontroll**	**OR (95% CI)***	***P***
CTLA4 (rs231775)				
GG	33 (10,8%)	48 (15,5%)		
GA	144 (47,2%)	148 (47,7%)	0,99 (0,72-1,36)	0,954
GA+AA	272 (89,2%)	262 (84,5%)	1,51 (0,94-2,44)	0,088
AA	128 (42,0%)	114 (36,8%)	1,23 (0,89-1,70)	0,213
RAF	0,656	0,606		0,073
IGR2230a_1 (rs17622208)				
GG	71 (23,3%)	91 (29,4%)		
GA	158 (51,8%)	149 (48,1%)	1,13 (0,82-1,56)	0,441
GA+AA	234 (76,7%)	219 (70,6%)	1,35 (0,94-1,95)	0,102
AA	76 (24,9%)	70 (22,6%)	1,16 (0,80-1,69)	0,431
RAF	0,508	0,466		0,140
IGR2198a_1 (rs11739135)				
GG	88 (28,9%)	120 (38,7%)		
GC	155 (50,8%)	140 (45,2%)	1,24 (0,91-1,71)	0,179
GC+CC	217 (71,1%)	190 (61,3%)	1,55 (1,10-2,17)	0,012
CC	62 (20,3%)	50 (16,1%)	1,33 (0,88-2,01)	0,179
RAF	0,457	0,387		0,013
IGR2096a_1 (rs12521868)				
GG	91 (29,8%)	120 (38,7%)		
GT	144 (47,2%)	138 (44,5%)	1,09 (0,79-1,50)	0,592
GT+TT	214 (70,2%)	190 (61,3%)	1,45 (1,03-2,03)	0,032
TT	70 (23,0%)	52 (16,8%)	1,47 (0,98-2,19)	0,062
RAF	0,466	0,390		0,008

RAF: rizikó allél frekvencia; *korra és nemre korrigált érték.

Kapcsoltság

Az *IL23R* és *CARD15* génen, illetve az IBD5 lókuszon belül a vizsgált variánsok közötti kapcsoltság (linkage disequilibrium, LD) értékeket a **3. ábra** mutatja. A sötét szín magas LD értéket jelez (R^2=0,63 az IGR2198a_1 és IGR2096a_1 között; R^2=0,57 az IGR2230a_1 és IGR2198a_1 között; R^2=0,62 az IGR2096a_1 és IGR2230a_1 között; R^2=0,62 az *IL23R* rs1004819 és rs2201841 között; valamint R^2=0 a vizsgált három *CARD15* variáns között, páronként).



6. ábra A vizsgált lókuszokon belüli LD értékek. A négyzetben található számok az R^2 (szürkeárnyalattal jelzett), illetve D (színes) korrelációs együtthatók értékét mutatják.

4.2. Két-lókusz eredmények

***ATG16L1, CARD15, IL23R,* IBD5**

Elsőként bináris logisztikus regresszióval vizsgáltuk az *ATG16L1, CARD15, IL23R* gének és az IBD5 lókusz kombinációit (ez utóbbit ebben az esetben az IGR2198a_1 marker képviselte). Egyetlen génkombináció sem mutatott szignifikáns kapcsolatot a betegség kialakulásával (**9. táblázat**). A legalacsonyabb *P* értéket (*P*=0,25) az *IL23R* rs2201841*IGR2198a_1 párosításnál kaptuk. Ezután az egyes génvariánsok és markerek genotípusait páronként összerendezve 2x2-es kontingencia táblákat képeztünk, majd χ^2-teszttel becsültük meg az egyes allél/genotípus kombinációk relatív kockázatát a legkevésbé hajlamosító referencia genotípus kombinációkhoz viszonyítva.

10. táblázat Az *IL23R, ATG16L1* gének, *CARD15* státusz és az IBD5 lókusz (IGR2198a_1) együttes vizsgálata

Modell	OR (95% CI)[†]	*P*
IL23R rs1004189 * *ATG16L1*	1,51 (0,73-3,11)	0,26
IL23R rs2201841 * *ATG16L1*	1,01 (0,29-3,57)	0,99
IL23R rs1004189 * *CARD15* státusz[#]	1,20 (0,54-2,67)	0,65
IL23R rs2201841 * *CARD15* státusz	1,57 (0,30-8,31)	0,60
IL23R rs1004189 * IGR2198a_1	1,30 (0,71-2,36)	0,40
IL23R rs2201841 * IGR2198a_1	0,46 (0,12-1,75)	0,25
ATG16L1 * *CARD15* státusz	1,49 (0,59-3,80)	0,40
ATG16L1 * IGR2198a_1	0,95 (0,45-2,00)	0,89
CARD15 státusz * IGR2198a_1	0,75 (0,33-1,71)	0,49

[#]*CARD15* státusz: – (vad típus) és + (legalább egy mutáns allélt hordozó személy).
[†]Korra és nemre korrigált érték.

IL23R* és *CARD15

Az *IL23R* genotípusokat a vizsgált *CARD15* variánsok alapján csoportosítottuk, az alcsoportok mintaszámait a **10. táblázat** mutatja.

Az *IL23R* rs1004189 és a három *CARD15* variáns kombinációinak vizsgálata során a következő allélkombinációkat tekintettük referenciának: rs1004189 GG / R702W CC; rs1004189 GG / G908R GC+CC; rs1004189 GG / L1007fs – –, rs1004189 GG / *CARD15* – státusz. Az *IL23R* rs2201841 és a három *CARD15* variáns párosításakor ezek a genotípus kombinációk szolgáltak viszonyítási alapként: rs2201841 TT+TC / R702W CC; rs2201841 TT+TC / G908R GC+CC; rs2201841 TT+TC / L1007fs – –, rs2201841 TT+TC / *CARD15* –

státusz. Az egyes genotípus kombinációkat, illetve a hozzájuk tartozó relatív esélyhányadosokat a **11. táblázat** foglalja össze.

11. táblázat *CARD15, IL23R* és *ATG16L1* együttes vizsgálata: csoportosítás és esetszámok

		IL23R rs1004189		*IL23R* rs2201841		*ATG16L1*	
		GG	GA+AA	TT+TC	CC	AA+AG	GG
	CARD15 R702W						
	CC	102 (32,4%)	173 (54,9%)	234 (74,3%)	41 (13,0%)	180 (57,1%)	95 (30,2%)
	CT+TT	17 (5,4%)	23 (7,3%)	36 (11,4%)	4 (1,3%)	27 (8,6%)	13 (4,1%)
	CARD15 G908R						
CD	GG	113 (35,9%)	186 (59,0%)	258 (81,9%)	41 (13,0%)	197 (62,5%)	102 (32,4%)
	GC+CC	6 (1,9%)	10 (3,2%)	12 (3,8%)	4 (1,3%)	10 (3,2%)	6 (1,9%)
	CARD15 L1007fs						
	– –	99 (31,4%)	165 (52,4%)	226 (71,7%)	38 (12,1%)	173 (54,9%)	91 (28,9%)
	–C+CC	20 (6,3%)	31 (9,8%)	44 (14,0%)	7 (2,2%)	34 (10,8%)	17 (5,4%)
	CARD15 státusz						
	–	84 (26,7%)	136 (43,2%)	189 (60,0%)	31 (9,8%)	143 (45,4%)	77 (24,4%)
	+	35 (11,1%)	60 (19,0%)	81 (25,7%)	14 (4,4%)	64 (20,3%)	31 (9,8%)
	CARD15 R702W						
	CC	141 (44,9%)	153 (48,7%)	278 (88,5%)	16 (5,1%)	220 (70,1%)	74 (23,6%)
	CT+TT	10 (3,2%)	10 (3,2%)	19 (6,1%)	1 (0,3%)	15 (4,8%)	5 (1,6%)
	CARD15 G908R						
Kontroll	GG	146 (46,5%)	159 (50,6%)	288 (91,7%)	17 (5,4%)	227 (72,3%)	78 (24,8%)
	GC+CC	5 (1,6%)	4 (1,3%)	9 (2,9%)	0 (0%)	8 (2,5%)	1 (0,3%)
	CARD15 L1007fs						
	– –	141 (44,9%)	150 (47,8%)	275 (87,6%)	16 (5,1%)	217 (69,1%)	74 (23,6%)
	–C+CC	10 (3,2%)	13 (4,1%)	22 (7,0%)	1 (0,3%)	18 (5,7%)	5 (1,6%)
	CARD15 státusz						
	–	126 (40,1%)	136 (43,3%)	247 (78,7%)	15 (4,8%)	194 (61,8%)	68 (21,7%)
	+	25 (8,0%)	27 (8,6%)	50 (15,9%)	2 (0,6%)	41 (13,1%)	11 (3,5%)

Az *IL23R* rs1004189 rizikó alléljának (A) hordozása a referencia genotípus kombinációhoz képest megemelte a Crohn-betegség kialakulásának esélyét mindhárom esetben, ha a *CARD15* különböző, vizsgált variánsainak normál genotípusával párosítottuk (R702W P=0,009; G908R P=0,012; L1007fs P=0,009). Az rs2201841 homozigóta (CC) genotípus esetén is hasonló hatást figyeltünk meg (R702W P<0,001; G908R P=0,001; L1007fs P<0,001). Az R702W T allél hordozása (P=0,037), illetve az L1007fs inszerció jelenléte (–C+CC) (P=0,008) az rs1004189 normál genotípus háttér mellett szintén hajlamosítónak bizonyult. Az R702W T allél megléte (P=0,005), illetve az L1007fs inszerció hordozása (+C+CC) (P=0,001) ugyancsak szignifikánsan növelte a betegség kockázatát azokban a vizsgált személyekben, akik az rs2201841 homozigóta genotípustól eltérő genotípussal (TT+TC) rendelkeztek. A G908R C allél sem az rs1004189 normál genotípussal

kombinálva, sem az rs2201841 TT+TC genotípus háttér mellett nem emelte szignifikánsan a betegség kialakulásának kockázatát a referencia genotípus kombinációhoz viszonyítva. Az rs1004189 A allél és az R702W T allél együttes hordozása a rizikót a 3-szorosára növelte (*P*=0,003), az L1007fs inszerció hordozásával kombinálva közel 3,5-szeres OR értéket kaptunk (*P*<0,001). Az rs2201841 CC genotípus és az R702W T allél párosítás nem mutatott szignifikáns kapcsolatot a betegség kialakulásának valószínűségével, ugyanakkor az L1007fs inszerció hordozásával kombinálva majdnem 9-szeres kockázatemelkedést mértünk (*P*=0,017). Az rs1004189 A allél hordozását, vagy az rs2201841 CC genotípust *–CARD15* státusszal kombinálva megemelkedett OR értéket kaptunk (*P*=0,029 és *P*=0,002), valamint a *+CARD15* státusz is fokozta a betegség kockázatát normál *IL23R* háttér mellett (*P*=0,012 és *P*<0,001). Abban az esetben, ha a *+CARD15* státuszhoz az rs1004189 A allél vagy az rs2201841 CC genotípus társult, a relatív kockázat több mint a 3-szorosára, illetve 9-szeresére nőtt (*P*<0,001 mindkét esetben).

12. táblázat *IL23R, ATG16L1* és *CARD15* együttes vizsgálata: relatív OR értékek

	IL23R rs1004189		*IL23R* rs2201841		*ATG16L1*	
	GG	GA+AA	TT+TC	CC	AA+AG	GG
CARD15 R702W						
CC	1	**1,56 (1,12-2,19)**	1	**3,04 (1,67-5,57)**	1	**1,57 (1,09-2,25)**
CT+TT	**2,35 (1,03-5,34)**	**3,18 (1,45-6,97)**	**2,25 (1,26-4,03)**	4,75 (0,53-42,81)	**2,20 (1,14-4,26)**	**3,18 (1,11-9,08)**
CARD15 G908R						
GG	1	**1,51 (1,09-2,09)**	1	**2,69 (1,49-4,86)**	1	**1,51 (1,06-2,14)**
GC+CC	1,55 (0,46-5,21)	3,23 (0,99-10,57)	1,49 (0,62-3,59)	n	1,44 (0,56-3,72)	6,91 (0,83-57,92)
CARD15 L1007fs						
– –	1	**1,57 (1,12-2,20)**	1	**2,89 (1,57-5,32)**	1	**1,54 (1,07-2,22)**
–C+CC	**2,85 (1,28-6,35)**	**3,40 (1,69-6,82)**	**2,43 (1,42-4,18)**	**8,52 (1,04-69,74)**	**2,37 (1,29-4,34)**	**4,27 (1,54-11,79)**
CARD15 státusz						
–	1	**1,50 (1,04-2,16)**	1	**2,70 (1,42-5,15)**	1	**1,54 (1,04-2,27)**
+	**2,10 (1,17-3,76)**	**3,33 (1,96-5,67)**	**2,12 (1,42-3,16)**	**9,15 (2,05-40,74)**	**2,12 (1,35-3,31)**	**3,82 (1,86-7,86)**

***P*<0,05**

ATG16L1 és *CARD15*

Az *ATG16L1* genotípusokat a vizsgált *CARD15* variánsok szerint csoportosítottuk, az alcsoportok mintaszámait a **10. táblázat** tartalmazza. Az *ATG16L1* és a három *CARD15* génvariáns kombinációinak analízise során a következő allélkombinációkat tekintettük

referenciának: *ATG16L1* AA+AG / R702W CC; *ATG16L1* AA+AG / G908R GC+CC; *ATG16L1* AA+AG / L1007fs – –, valamint *ATG16L1* AA+AG / –*CARD15* státusz. A genotípus kombinációkat, illetve a hozzájuk tartozó relatív esélyhányadosokat a **11. táblázat** szemlélteti.

Az *ATG16L1* GG genotípus vadtípusú *CARD15* genotípus mellett növelte a betegségre való hajlamot (R702W *P*=0,014; G908R *P*=0,022; L1007fs *P*=0,020). Az R702W T allél, illetve az L1007fs inszerció megléte kockázatnövelő hatást mutatott azokban a személyekben, akik az *ATG16L1* A alléllal rendelkeztek (*P*=0,017 és *P*=0,004). A G908R C allél esetén hasonló hatást nem figyeltük meg. Az *ATG16L1* homozigóta genotípus és az R702W T allél egyidejű hordozása a relatív kockázatot több mint a háromszorosára (*P*=0,023), az *ATG16L1* GG / L1007fs –C+CC kombináció pedig több mint a 4-szeresére emelte (*P*=0,003). Az *ATG16L1* GG genotípust –*CARD15* státusszal kombinálva megemelkedett OR értéket kaptunk (*P*=0,031), valamint a +*CARD15* státusz is fokozta a betegség kockázatát *ATG16L1* AA+AG háttér mellett (*P*=0,001). Abban az esetben, ha a +*CARD15* státuszhoz az *ATG16L1* GG genotípus társult, a relatív kockázat közel a 4-szeresére nőtt (*P*<0,001).

ATG16L1* és *IL23R

Az *ATG16L1* genotípusokat a vizsgált *IL23R* variánsok alapján csoportosítottuk, az alcsoportok mintaszámait az **12. táblázat** foglalja össze. Az *ATG16L1* és a két *IL23R* génvariáns kombinációinak vizsgálata során a következő allélkombinációkat tekintettük referenciának: rs1004189 GG / *ATG16L1* AA+AG, valamint rs2201841 TT+TC / *ATG16L1* AA+AG. A genotípus kombinációkat, illetve a hozzájuk tartozó relatív esélyhányadosokat a **13. táblázat** mutatja.

Az rs2201841 CC genotípus szignifikánsan növelte a betegség kockázatát azokban a vizsgált személyekben, akik az *ATG16L1* homozigóta genotípusától eltérő (AA+AG) genotípussal rendelkeztek (*P*=0,005), az *IL23R* rs1004189 A allélt hordozóknál ilyen hatást nem tapasztaltunk. Az *ATG16L1* homozigóta (GG) genotípus az rs2201841 a vad típusú T allél jelenlétében (TT+TC) hajlamosító faktornak bizonyult (*P*=0,034), az rs1004189 normál genotípus (GG) jelenlétében ugyanakkor nem jelentett rizikót. Az *ATG16L1* GG genotípus és az rs1004189 A allél együttes hordozása esetén közel 2,5-szer nagyobb volt a betegség kialakulásának esélye, mint a referenciának tekintett genotípus kombinációval bíró személyé (*P*<0,001). Az *ATG16L1* GG genotípust az *IL23R* rs2201841 homozigóta genotípussal párosítva ez a kockázat több, mint 4,5-szeresre nőtt (*P*=0,001).

13. táblázat *IL23R* és *ATG16L1* és IBD5 együttes vizsgálata: csoportosítás és esetszámok

		IL23R rs1004189		*IL23R* rs2201841		*ATG16L1*	
		GG	GA+AA	TT+TC	CC	AA+AG	GG
Crohn-betegek	IGR2198a_1						
	GG	29 (9,2%)	62 (19,7%)	78 (24,8%)	13 (4,1%)	58 (18,4%)	33 (10,5%)
	GC+CC	90 (28,6%)	134 (42,5%)	192 (61,0%)	32 (10,2%)	149 (47,3%)	75 (23,8%)
	IGR2096a_1						
	GG	29 (9,2%)	65 (20,6%)	80 (25,4%)	14 (4,4%)	59 (18,7%)	35 (11,1%)
	GT+TT	90 (28,6%)	131 (41,6%)	190 (60,3%)	31 (9,8%)	148 (47,0%)	73 (23,2%)
	ATG16L1						
	AA+AG	83 (26,3%)	124 (39,4%)	181 (57,5%)	26 (8,3%)	-	-
	GG	36 (11,4%)	72 (22,9%)	89(28,3%)	19 (6,0%)	-	-
Kontroll	IGR2198a_1						
	GG	48 (15,3%)	72 (22,9%)	116 (36,9%)	4 (1,3%)	90 (28,7%)	30 (9,6%)
	GC+CC	103 (32,8%)	91 (29,0%)	181 (57,6%)	13 (4,1%)	145 (46,2%)	49 (15,6%)
	IGR2096a_1						
	GG	49 (15,6%)	71 (22,6%)	115 (36,6%)	5 (1,6%)	88 (28,0%)	32 (10,2%)
	GT+TT	102 (32,5%)	92 (29,3%)	182 (58,0%)	12 (3,8%)	147 (46,8%)	47 (15,0%)
	ATG16L1						
	AA+AG	110 (35,0%)	125 (39,8%)	223 (71,0%)	12 (3,8%)	-	-
	GG	41 (13,1%)	38 (12,1%)	74 (23,6%)	5 (1,6%)	-	-

IL23R és IBD5

Az *IL23R* genotípusokat a vizsgált IBD5 markerek alapján csoportosítottuk, az egyes alcsoportok mintaszámait az **12. táblázat** mutatja. A két *IL23R* génvariáns és a két IBD5 marker kombinációinak vizsgálata során a következő allélkombinációkat alkalmaztuk referenciaként: rs1004189 GG / IGR2198a_1 GG; rs1004189 GG / IGR2096a_1 GG; illetve rs2201841 TT+TC / IGR2198a_1 GG és rs2201841 TT+TC / IGR2096a_1 GG. A genotípus kombinációkat, illetve a hozzájuk tartozó relatív esélyhányadosokat a **13. táblázat** szemlélteti.

Az rs1004189 A allél hordozása normál IBD5 genotípus mellett nem bírt kockázatnövelő hatással, az rs2201841 CC genotípusnál ugyanakkor emelkedett, több mint 4-szeres OR értéket találtunk (P=0,005 IGR2198a_1; P=0,006 IGR2096a_1). Sem az IGR2198a_1 C allél, sem pedig az IGR2096a_1 T allél nem befolyásolta a betegségre való hajlamot a normál rs1004189 genotípussal rendelkező alanyokban, az rs2201841 TT+TC genotípus háttér mellett viszont igen (P=0,011 és P=0,027). Az rs1004189 GA+AA / IGR2198a_1 GC+CC, illetve az rs1004189 GA+AA / IGR2096a_1 GT+TT kombinációk szignifikánsan nagyobb kockázatot jelentettek, mint a referencia genotípus kombináció (P=0,001 mindkét esetben). Az IBD5 rizikó allélek párosítása az *IL23R* az rs2201841 homozigóta genotípussal ugyancsak növelte a Crohn-betegség kockázatát (P<0,001 mindkét

esetben), ám ez az érték alul maradt a normál IBD5 genotípus / rs2201841 CC párosításnál kapott értékhez képest.

14. táblázat *IL23R* és *ATG16L1* és IBD5 együttes vizsgálata: relatív OR értékek

	IL23R rs1004189		*IL23R* rs2201841		*ATG16L1*	
	GG	GA+AA	TT+TC	CC	AA+AG	GG
IGR2198a_1						
GG	1	1,43 (0,80-2,53)	1	**4,83 (1,52-15,37)**	1	1,71 (0,94-3,09)
GC+CC	1,45 (0,84-2,48)	**2,44 (1,43-4,15)**	**1,58 (1,11-2,24)**	**3,66 (1,81-7,41)**	**1,60 (1,07-2,38)**	**2,38 (1,46-3,87)**
IGR2096a_1						
GG	1	1,55 (0,88-2,73)	1	**4,03 (1,39-11,62)**	1	1,63 (0,91-2,92)
GT+TT	1,49 (0,87-2,56)	**2,41 (1,42-4,09)**	**1,50 (1,06-2,13)**	**3,71 (1,80-7,67)**	**1,50 (1,01-2,24)***	**2,32 (1,42-3,79)**
ATG16L1						
AA+AG	1	1,34 (0,92-1,95)	1	**2,67 (1,31-5,44)**	-	-
GG	1,16 (0,68-1,99)	**2,51 (1,55-4,08)**	**1,48 (1,03-2,14)**	**4,68 (1,72-12,78)**	-	-

***P*<0,05**

*****Benjamini-Hochberg korrekció után nem szignifikáns érték

ATG16L1 és IBD5

Az *ATG16L1* genotípusokat a vizsgált IBD5 markerek alapján csoportosítottuk, az alcsoportok mintaszámait a **12. táblázat** foglalja össze. Az *ATG16L1* génvariáns és a három IBD5 marker kombinációinak vizsgálata során a következő referencia genotípusokhoz viszonyítottunk: *ATG16L1* AA+AG / IGR2198a_1 GG; valamint *ATG16L1* AA+AG / IGR2096a_1 GG. A genotípus kombinációkat, illetve a hozzájuk tartozó relatív esélyhányadosokat a **13. táblázat** mutatja.

Az *ATG16L1* homozigóta (GG) genotípus a normál IBD5 genotípussal bíró személyekben nem mutatott szignifikáns kapcsolatot a betegség kialakulásával; az IGR2198a_1 C allél, illetve az IGR2096a_1 T allél hordozása viszont közel 1,5-szeresére emelte a betegség kockázatát, abban az esetben, ha az *ATG16L1* vad típusú (A) alléllal társult (*P*=0,022 és *P*=0,046; utóbbi a Benjamini-Hochberg korrekció után már nem bizonyult szignifikánsnak). IGR2198a_1 C, illetve az IGR2096a_1 T allélt az *ATG16L1* homozigóta (GG) genotípussal kombinálva 2,3-szoros rizikónövekedést figyeltünk meg a referencia genotípus kombinációhoz képest (*P*<0,001 és *P*=0,001).

IBD5 és *CARD15*

Az IBD5 genotípusok *CARD15* mutációk szerinti felosztását a **14. táblázat** mutatja. Az IGR2198a_1 és a három *CARD15* génvariáns kombinációinak vizsgálata során a referenciaként használt allélkombinációk a következők voltak: IGR2198a_1 GG / R702W CC; IGR2198a_1 GG / G908R GC+CC; IGR2198a_1 GG / L1007fs – –, valamint IGR2198a_1 GG / –*CARD15* státusz. Az IGR2096a_1 marker és a *CARD15* variánsok párosításakor a következő genotípus kombinációkhoz viszonyítottunk: IGR2096a_1 GG / R702W CC; IGR2096a_1 GG / G908R GC+CC; IGR2096a_1 GG / L1007fs – –, valamint IGR2096a_1 GG / –*CARD15* státusz. A genotípus kombinációkat, illetve a hozzájuk tartozó relatív esélyhányadosokat a **15. táblázat** szemlélteti.

15. táblázat *CARD15* és IBD5 együttes vizsgálata: csoportosítás és esetszámok

		IGR2198a_1		IGR2096a_1	
		GG	GC+CC	GG	GT+TT
Crohn-betegek	*CARD15* R702W				
	CC	78 (24,8%)	197 (62,5%)	79 (25,1%)	196 (62,2%)
	CT+TT	13 (4,1%)	27 (8,6%)	15 (4,8%)	25 (7,9%)
	CARD15 G908R				
	GG	87 (27,6%)	212 (67,3%)	89 (28,3%)	210 (66,7%)
	GC+CC	4 (1,3%)	12 (3,8%)	5 (1,6%)	11 (3,5%)
	CARD15 L1007fs				
	– –	73 (23,2%)	191 (60,6%)	77 (24,4%)	187 (59,4%)
	–C+CC	18 (5,7%)	33 (10,5%)	17 (5,4%)	34 (10,8%)
	CARD15 státusz				
	–	62 (19,7%)	158 (50,2%)	63 (20,0%)	157 (49,8%)
	+	29 (9,2%)	66 (21,0%)	31 (9,8%)	64 (20,3%)
Kontroll	*CARD15* R702W				
	CC	114 (36,3%)	180 (57,3%)	113 (36,0%)	181 (57,6%)
	CT+TT	6 (1,9%)	14 (4,5%)	7 (2,2%)	13 (4,1%)
	CARD15 G908R				
	GG	117 (37,3%)	188 (59,9%)	117 (37,3%)	188 (59,9%)
	GC+CC	3 (1,0%)	6 (1,9%)	3 (1,0%)	6 (1,9%)
	CARD15 L1007fs				
	– –	111 (35,4%)	180 (57,3%)	110 (35,0%)	181 (57,6%)
	–C+CC	9 (2,9%)	14 (4,5%)	10 (3,2%)	13 (4,1%)
	CARD15 státusz				
	–	102 (32,5%)	160 (51,0%)	100 (31,8%)	162 (51,6%)
	+	18 (5,7%)	34 (10,8%)	20 (6,4%)	32 (10,2%)

Mindkét vizsgált IBD5 marker rizikó allélja növelte a betegség kockázatát abban az esetben, ha a *CARD15* génvariánsok valamely normál genotípusával párosítottuk (IGR2198a_1: P=0,009 R702W; P=0,016 G908R; P=0,009 L1007fs, illetve IGR2096a_1:

P=0,014 R702W; *P*=0,026 G908R; *P*=0,032 L1007fs). Az R702W T allél, illetve az L1007fs inszerció hordozása 3-szorosára emelte a Crohn-betegség kialakulásának esélyét az IGR2198a_1 normál genotípussal (GG) bíró személyekben (*P*=0,02 és *P*=0,008). Az IGR2096a_1 normál genotípus (GG) mellett az R702W T allél, illetve az L1007fs inszerció megléte szintén növelte az OR értéket a referencia genotípus kombinációhoz képest (*P*=0,016 és *P*=0,033). A 908R C allél hordozása nem befolyásolta a betegségre való hajlamot a két normál IBD5 genotípussal kombinálva. Az IGR2198a_1 GC+CC / R702W CT+TT kombináció ugyan magasabb rizikót mutatott a referencia genotípus kombinációhoz viszonyítva, az OR érték azonban alacsonyabbnak adódott, mint az IGR2198a_1 GG / R702W CT+TT esetében (*P*=0,003). Az IGR2096a_1 GT+TT / R702W CT+TT kombinációnál hasonló jelenséget figyeltünk meg (*P*=0,005). Az L1007fs inszerció mind az IGR2198a_1, mind az IGR2096a_1 rizikó allélt hordozó személyekben több mint 3,5-szeresére növelte a betegség kockázatát (*P*<0,001 mindkét esetben). Az IGR2198a_1 C, vagy az IGR2096a_1 T allél hordozását –*CARD15* státusszal kombinálva a kockázat megemelkedett (*P*=0,013 és *P*=0,028), valamint a +*CARD15* státusz is fokozta a betegség kockázatát normál IBD5 háttér mellett (*P*=0,004 és *P*=0,005). Abban az esetben, ha a +*CARD15* státuszhoz az IGR2198a_1 C vagy az IGR2096a_1 T allél társult, a relatív kockázat több mint a 3-szorosára nőtt (*P*<0,001 mindkét esetben).

16. táblázat IBD5 és *CARD15* együttes vizsgálata: relatív OR értékek

	IGR2198a_1		IGR2096a_1	
	GG	GC+CC	GG	GT+TT
CARD15 R702W				
CC	1	**1,60 (1,13-2,27)**	1	**1,55 (1,09-2,20)**
CT+TT	**3,17 (1,15-8,69)**	**2,819 (1,39-5,72)**	**3,07 (1,20-7,86)**	**2,75 (1,32-5,70)**
CARD15 G908R				
GG	1	**1,52 (1,08-2,13)**	1	**1,47 (1,05-2,06)**
GC+CC	1,79 (0,39-8,22)	2,69 (0,97-7,45)	2,19 (0,51-9,41)	2,41 (0,86-6,77)
CARD15 L1007fs				
– –	1	**1,61 (1,13-2,31)**	1	**1,48 (1,03-2,11)**
–C+CC	**3,04 (1,30-7,14)**	**3,58 (1,80-7,16)**	**2,43 (1,06-5,59)**	**3,74 (1,85-7,54)**
CARD15 státusz				
–	1	**1,63 (1,11-2,39)**	1	**1,54 (1,05-2,26)**
+	**2,65 (1,36-5,17)**	**3,19 (1,90-5,37)**	**2,46 (1,29-4,69)**	**3,18 (1,87-5,39)**

***P*<0,05**

IBD5 és *CTLA4*

Elsőként korra és nemre korrigált bináris logisztikus regresszióval vizsgáltuk a *CTLA4* gén és az IBD5 markerek kombinációit. Egyik párosítás esetén sem találtunk szignifikáns kapcsolatot a betegség kialakulásával (**16. táblázat**), a legalacsonyabb *P* értéket (*P*=0,13) a *CTLA4**IGR2096a_1 párosnál kaptuk. Ezután a *CTLA4* +49A/G és IBD5 markerek genotípusait páronként összerendezve 2x2-es kontingencia táblákat képeztünk, majd χ^2-teszttel becsültük meg az egyes allél/genotípus kombinációk relatív kockázatát a legkevésbé hajlamosító referencia genotípus kombinációkhoz viszonyítva.

17. táblázat *CTLA4* és IBD5 (IGR2198a_1)

Modell	OR (95% CI)†	*P*
CTLA4 rs231775 * IGR2230a_1	1,42 (0,67-3,02)	0,36
CTLA4 rs231775 * IGR2198a_1	1,23 (0,61-2,46)	0,57
CTLA4 rs231775 * IGR2096a_1	1,71 (0,85-3,43)	0,13

†Korra és nemre korrigált érték.

A *CTLA4* genotípusokat a vizsgált IBD5 markerek alapján csoportosítottuk, az alcsoportok mintaszámait a **17. táblázat**ban foglaltuk össze. A *CTLA4* és a három IBD5 marker kombinációinak vizsgálata során a következő allélkombinációkat tekintettük referenciának: *CTLA4* GA+GG / IGR2230a_1 GG; *CTLA4* GA+GG / IGR2198a_1 GG; valamint *CTLA4* GA+GG / IGR2096a_1 GG. A genotípus kombinációkat, illetve a hozzájuk tartozó relatív esélyhányadosokat a **18. táblázat** mutatja.

18. táblázat *CTLA4* és IBD5 együttes vizsgálata: csoportosítás és esetszámok

		IGR2230a_1		IGR2198a_1		IGR2096a_1	
		GG	GA+AA	GG	GC+CC	GG	GT+TT
	CTLA4						
Crohn-betegek	GA+GG	47 (15,4%)	130 (42,6%)	56 (18,4%)	121 (39,7%)	61 (20,0%)	116 (38,1%)
	AA	24 (7,9%)	104 (34,1%)	32 (10,5%)	96 (31,4%)	30 (9,8%)	98 (32,1%)
	CTLA4						
Kontroll	GA+GG	59 (19,0%)	137 (44,2%)	78 (25,2%)	118 (38,1%)	76 (24,5)	120 (38,7)
	AA	32 (10,3%)	82 (26,5%)	42 (13,5%)	72 (23,2%)	44 (14,2)	70 (22,6)

A *CTLA4* GA+GG genotípus háttér mellett az IGR2198a_1 C allél nem befolyásolta a betegség kialakulásának kockázatát, a *CTLA4* +49 AA genotípussal együtt viszont növelte azt

(*P*=0,008). Az IGR2096a_1 T allél és a *CTLA4* +49 AA genotípus egyidejű hordozása szintén emelkedett rizikót jelentett (*P*=0,016). A többszörös hipotézisek Benjamini-Hochberg módszerrel történt korrekciója után (FDR=0,05) ezek az értékek már nem bizonyultak szignifikánsnak.

Az IGR2230a_1 esetén nem találtunk összefüggést egyik vizsgált kombinációnál sem, bár a *CTLA4* AA / IGR2230a_1 GA+AA kombináció közel szignifikánsnak adódott (*P*=0,57).

19. táblázat *CTLA4* és IBD5 együttes vizsgálata: relatív OR értékek

	IGR2230a_1		IGR2198a_1		IGR2096a_1	
	GG	GA+AA	GG	GC+CC	GG	GT+TT
CTLA4						
GA+GG	1	1,19 (0,76-1,87) [#]	1	1,43 (0,93-2,19)	1	1,20 (0,79-1,84)
AA	0,941 (0,490-1,810)	1,59 (0,99-2,57)	1,06 (0,60-1,88)	**1,86 (1,17-2,94)***	0,85 (0,48-1,51)	**1,74 (1,11-2,75)***

[#]Referencia genotípus: IGR2230a_1, IGR2198a_1 és IGR2096a_1: normál genotípus; *CTLA4*: homozigóta (GG) és heterozigóta genotípus összevont csoportja.
***P*<0,05**
*Benjamini-Hochberg korrekció után nem szignifikáns érték

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A *CARD15* mint első Crohn-betegségre hajlamosító gén megismerése óta (2001), az egész genomot lefedő kapcsoltsági és asszociációs vizsgálatok, illetve nagyméretű metaanalízisek során[102,346] számos további lókusz kapcsolatát is igazolták a betegség kialakulásával, így ma már közel 140, a betegség kialakulásának kockázatát befolyásoló lókuszt ismerünk. Az egyes potenciális lókuszok vizsgálata azonban önmagában nem elégséges, a gének közötti interakcióval (episztázissal) – amely a komplex betegségek genetikai architektúrájának alapvető velejárója[347] – szintén számolni kell, ezek vizsgálata további információt adhat a betegség kialakulásának okáról, folyamatáról. Bizonyos variánsok együttes hordozásának elemzése segítheti a kockázat becslését, magas rizikójú csoportok azonosítását is.

Egy-lókusz vizsgálatok

Tanulmányunkban négy, a Crohn-betegséggel a nemzetközi eredmények szerint egyértelmű asszociációt mutató lókusz közti statisztikai interakció felderítését tűztük ki célul. Az *IL23R* gén két variánsát, az *ATG16L1* gén egy mutációját, a *CARD15* gén 3 mutációját, míg az IBD5 lókusz 2 variánsát vizsgáltuk magyar betegekben és kontrollokban.

Az *IL23R* rs2201841 variáns hajlamosító hatását intézetünk már korábban leírta a hazai CD populációban[252], az rs1004819 mutációt viszont elsőként vizsgáltuk a magyar Crohn-betegek körében. A betegség kialakulásának kockázata az *ATG16L1* rs2241880 homozigóta genotípus esetén 1,7-szeresnek adódott, eredményeink összhangban vannak a korábbi magyar, illetve nemzetközi adatokkal[82,121,212]. A *CARD15* R702W és L1007fs variánsok hajlamosító szerepét szintén megerősítettük a hazai beteg populációban. Mivel a korábbi adatok alapján sem az *SLC22A4* sem az *SLC22A5* variánsok, illetve a TC haplotípus sem jelent rizikótényezőt a betegség kialakulásának szempontjából[168,348], két másik, az IBD5 haplotípus részét képező SNP, az IGR2198a_1 és IGR2096a_1 variáns viszont szignifikáns kapcsolatot mutat[349], ezért a gének közti interakciók vizsgálatára az utóbbiakat választottuk.

Az egyértelműen hajlamosító lókuszok hatásának analízise mellett kíváncsiak voltunk arra is, hogy a betegség szempontjából indifferens mutációk mutatnak-e változást, ha hajlamosító variánsokkal kombináljuk azokat. Választásunk a *CTLA4* gén +49A/G variánsára, illetve az IBD5 régióban található IGR2230a_1 markerre esett, melyek a magyar Crohn-beteg populációban korábban közömbös hatásúnak bizonyultak[316,350]. Jelen tanulmányban, a

korábbihoz képest jelentősen emelt számú betegcsoport vizsgálata során szintén nem találtunk szignifikáns asszociációt a *CTLA4* +49 A/G és a betegség kialakulása között, eredményeink ugyanakkor egyfajta tendenciát sejtethetnek. A magyar beteg populációban 2009-ben vizsgált IGR2230a_1 polimorfizmus szintén neutrális hatásúnak bizonyult[351].

ATG16L1* és *CARD15

Hampe és munkatársai a három legismertebb *CARD15* variáns és az *ATG16L1* T300A (rs2241880) mérsékelt, de szignifikáns statisztikai interakcióját mutatta ki egy 735 Crohn-beteget és 368 kontroll személyt tartalmazó német mintacsoportban[82]. Az *ATG16L1* GG genotípus nemcsak, hogy rizikófaktornak bizonyult a vizsgált *CARD15* mutációk hiányában, hanem a *CARD15* magas kockázatot jelentő összevont csoportjában is (compound heterozigóták + homozigóták mindhárom mutációra nézve) nagyobb OR értéket tapasztaltak az *ATG16L1* G allél jelenlétében az alacsony kockázattal bíró genotípusokhoz (vadtípusúak valamint heterozigóták) viszonyítva. Ugyanakkor, ahogy azt Hampe munkacsoportja is leírta, a magas kockázatú genotípusok száma alacsony volt a kontrollok között, ez viszonylag széles konfidencia intervallumot eredményezett.

Prescott és munkatársai 1236 beteget és 1235 kontroll személyt tömörítő vizsgálatában[118] - bár az *ATG16L1* a *CARD15* státusztól függetlenül is fokozta a Crohn-betegség kialakulására való hajlamot - az *ATG16L1* G allélfrekvenciája magasabbnak bizonyult a *CARD15* hordozó csoportban a *CARD15* negatív csoporthoz képest, ami a két lókusz közti gyenge interakció jeleként is felfogható. Egy, az újzélandi Crohn-populációt vizsgáló tanulmány mindamellett, hogy megerősítette az *ATG16L1* GG genotípus *CARD15*-től független hajlamosító szerepét, a két lókusz additív hatásáról is beszámolt[119]. Gyermek Crohn-betegek mintáinak vizsgálata során Lacher és munkatársai nem találtak episztatikus interakciót az *ATG16L1* és *CARD15* gének között, a hajlamosító allélek együttes hordozása esetén azonban a betegség kockázata megemelkedett[352]. Több, a két gén közti statisztikai interakciót vizsgáló tanulmány végződött negatív eredménnyel[85,121-123,210,211]. Az *ATG16L1* gén egy másik variánsa, az rs10210202 polimorfizmus sem mutatott szignifikáns statisztikai interakciót a *CARD15* génnel[91]. Büning és munkatársai német és holland betegpopuláció mellett 147 magyar, Szegeden gyűjtött Crohn-beteg mintáit is elemezték, az *ATG16L1* T300A és a *CARD15*+ státusz között azonban nem volt nyoma statisztikai interakciónak az egyes vizsgált populációkban, illetve azok egyesítése után sem[353].

Az általunk vizsgált 315, az ország több régiójából (Budapest, Pécs, Szombathely, Miskolc, Békéscsaba, Zalaegerszeg) származó Crohn-beteg mintájának feldolgozása során

megerősítettük a nemzetközi irodalomban összefoglaltakat. Az *ATG16L1* T300A mutáció homozigóta formában a *CARD15* R702W és L1007fs mutációktól független hajlamosító tényezőnek bizonyult, hiszen ezek hiányában az egy-lókusz hatáshoz hasonló rizikót mértünk. A magyar populációban rizikófaktort jelentő *CARD15* mutációk az *ATG16L1* gén vizsgált variánsával együtt ugyanakkor 3-4-szeresére emelték a betegség kialakulásának esélyét, a három *CARD15* mutáció összevonásával képzett *CARD15* státusz esetén szintén hasonló hatást tapasztaltunk.

A *CARD15* és az *ATG16L1* közti kapcsolatot a fehérjeszintű vizsgálatok is valószínűsítik. A NOD1 és NOD2 fehérjék mint intracelluláris szenzorok fontos szerepet játszanak az invazív baktériumok (MDP) által előidézett autofág folyamatokban; a baktériumok bejutási helyén az ATG16L1 fehérjével együtt a sejtmembrán citoszolikus oldalán kolokalizálódnak és közreműködnek az autofagocitózis elindításában[354].

Cooney és munkatársai kimutatták, hogy az autofágia MDP-vel történő aktiválása primer humán dendritikus sejtekben fokozza a baktériumok elpusztításának hatékonyságát, illetve elősegíti az MHCII molekulán keresztül történő antigén prezentációt. Sőt, azokban a dendritikus sejtekben, melyek *ATG16L1* vagy *NOD2* variánst hordozó Crohn-betegekből származtak, sérültek ezek a funkciók[354].

Egy másik kutatócsoport eredményei szerint a NOD1 és NOD2 – a RIP2 molekulától és az NF-κB transzkripciós faktortól független módon – az invazív baktériumok bejutási helyére, a plazmamembránhoz irányítja az ATG16L1 fehérjét; a *NOD2* frameshift mutációra homozigóta betegek sejtjeiben ugyanakkor ez nem történik meg, így a baktériumok autofágiával történő eltávolítása sikertelen[355].

Homer és munkatársai kísérleteik során szintén funkcionális interakciót tártak fel a két gén között: ebben az esetben az *ATG16L1* befolyásolja a másik működését [356]. Az autofágia útvonal különböző lépéseinek szelektív gátlásával csökkent NOD2 jelátvitel-aktivációt értek el, az *ATG16L1* iRNS-vel történő gátlása szintén sérült NFκB jelátvitelt eredményezett. Cooney és Travassos eredményeivel szemben ebben a tanulmányban az *ATG16L1* T300A homozigóták PBMC-i nem tértek el funkcionálisan a normál+heterozigóta csoporttól: nem mutatkozott különbség az MDP-stimuláció hatására történő TNFα szekrécióban, a NOD2 jelátviteli folyamatokban, az autofágia mértékét és dinamikáját illetően sem. Humán eredetű vastagbél epitélsejtekben ugyanakkor az *ATG16L1* T300A variáns a NOD2 funkció kiesését idézte elő[356].

Plantinga és munkatársai kimutatták, hogy az *ATG16L1* T300A variánst hordozó betegekből izolált PBMC-k fokozott mennyiségben termelik az IL1β és IL6

proinflammatorikus citokineket NOD2 liganddal történő stimulálás hatására [357]. A hatás specifikus, TLR2, illetve TLR4 agonistákkal való stimulálás nem járt hasonló eredménnyel. A kutatócsoport megfigyelései szerint a T300A polimorfizmus jelenlétében az IL1β mRNS szintje emelkedett meg, vagyis nem az inaktív pro-IL1β molekulát aktív formává alakító cisztein-proteáz kaszpáz-1 út aktiválódott. A NOD2 által mediált autofagoszóma-képződés viszont egyidejűleg csökkent a T300A mutáció hatására. Éppen ezért a szerzők a NOD2 jelátvitelben az ATG16L1 modulátor szerepét hangsúlyozzák. A normál fehérje jelenlétében az autofágia irányába, mutáció esetén a RIP2 jelátviteli út felé terelődik az egyensúly, aminek következtében az IL1β mRNS transzkripció szintje végül megemelkedik[357]. A proinflammatorikus citokin fokozott szekréciója magyarázatot adhat a gyulladás kialakulására Crohn-betegekben, másrészt viszont az *ATG16L1* T300A homozigóta genotípus relatív gyakorisága, illetve az a tény, hogy szinte minden Gram+ és – baktérium aktiválhatja a NOD2 molekulát, feltételezi, hogy más immunológiai faktoroknak is fontos szerepük van a gyulladás kialakulásában.

***ATG16L1* és IBD5**

Az *ATG16L1* T300A variáns és az IBD5 lókusz közti statisztikai interakciót vizsgáló nemzetközi tanulmányok mind negatív eredménnyel zárultak[118,121,122]. Az *ATG16L1* mutáció az IGR2096a_1 markertől[118], az *SLC22A4* C1672T és *SLC22A5* G-207C génvariánsoktól[121], illetve az ezek által alkotott IBD5 haplotípustól[85] függetlenül növelte a Crohn-betegség kialakulásának kockázatát. Az általunk vizsgált betegpopulációban a T300A mutáció és két IBD5 marker, az IGR2198a_1 és IGR2096a_1 variánsok közti interakciót elemeztük. Az *ATG16L1* T300A homozigóta formában mindkét IBD5 marker esetén független hajlamosító tényezőnek bizonyult, a kapott OR érték az egy-lókusz vizsgálat eredményével megegyező mértékű. Normál *ATG16L1* genotípus mellett az IGR2198a_1 C allél, illetve az IGR2096a_1 T allél hordozása a betegség kialakulásának esélyét szintén szignifikánsan emelte a referencia genotípus kombinációhoz képest. Az *ATG16L1* T300A génvariáns a vizsgált IBD5 markerek egyikével párosítva magasabb kockázatot jelentett a betegség kialakulására nézve, mint amikor egymástól függetlenül vizsgáltuk azokat.

ATG16L1* és *IL23R

Az *ATG16L1* T300A génvariáns és a Crohn-betegség kapcsolatát egy időben elsőként leíró két GWA tanulmány közül ugyan az egyik[85] kitért az *ATG16L1* és IL23R gének közti interakció analízisére, de nem talált szignifikáns kapcsolatot a T300A és az *IL23R* gén vizsgált 13 SNP-je között. Parkes és munkacsoportja az *IL23R* rs11805303 variánst az *ATG16L1* rs10210302 polimorfizmussal kombinálta, statisztikai interakciót azonban nem talált[91]. Roberts és munkatársai a T300A és az *IL23R* védő hatású ritka variánsa, az rs11209026 (Arg381Gln) közötti interakciót vizsgálták új-zélandi betegek és kontrollok mintáin, és a két gén egymástól független hatását erősítették meg[119]. Cotterill munkacsoportja egy nagy volumenű, 13 ezer mintát tömörítő meta-analízisében szintén ugyanezt a párosítást vizsgálta, a statisztikai interakció elemzése azonban ebben az esetben is negatív eredménnyel zárult[211]. Glas és munkatársai 833 német Crohn-beteg és 1381 kontroll személy mintáját dolgozták fel, az *ATG16L1* T300A valamint az *IL23R* gén 10 ismert variánsa – így az rs11209026 (Arg381Gln), rs1004189 és rs2201841 – között ugyanakkor nem találtak interakciót[120]. Magyar Crohn-betegekben Lakatos és munkatársai bár vizsgálták az *ATG16L1* T300A és az *IL23R* Arg381Gln variánsokat, ám a tanulmány nem terjedt ki a két gén közti statisztikai interakció vizsgálatára[212].

Az *IL23R* gén jelen dolgozatban vizsgált két variánsa egymástól eltérő módon viselkedett az *ATG16L1* T300A mutációval történő kombináció során. Az *IL23R* rs2201841 CC homozigóta genotípus és az *ATG16L1* T300A mutáció homozigóta formában egymástól függetlenül növelte a betegség kialakulására való hajlamot, együttes jelenlétük ugyanakkor a CD megjelenésének kockázatát mintegy 4,5-szeresre emelte. A másik, a magyar Crohn-beteg populációban általunk elsőként vizsgált *IL23R* rs1004189 mutáció kockázatnövelő hatása meglepő módon az *ATG16L1* T300A normál genotípus jelenlétében egyáltalán nem érvényesült, sőt az *ATG16L1* T300A homozigóta formája sem mutatott szignifikáns asszociációt a betegséggel normál rs1004189 háttér mellett. A két polimorfizmus együttes hatása ugyanakkor 2,5-szeres OR értéket eredményezett, ami magasabb, mint amit az *IL23R* rs1004189 egy-lókusz vizsgálata során kaptunk.

IL23R* és *CARD15

Miután az *IL23R* génvariánsok szerepe a Crohn-betegség kialakulásában egyértelművé vált, kezdetét vette az azonosított SNP-k és a *CARD15* mutációk közötti interakció keresése. Az *IL23R* gén ismert polimorfizmusai közül elsősorban az rs11209026 génvariáns az, amelyet a *CARD15* három mutációjával együtt vizsgáltak, szignifikáns interakciót azonban nem

találtak köztük[122,211,245,248,358]. Roberts és munkatársai által feldolgozott új-zélandi mintacsoportban az Arg381Gln variáns ugyan a *CARD15* mutációktól függetlenül fokozta a betegség kialakulásának kockázatát, de ez a hatás csak a vadtípusú *CARD15* genotípus mellett volt megfigyelhető[119]. Mivel az Arg381Gln a legmagasabb OR értéket a *CARD15* magas rizikójú genotípusának jelenlétében adta, ezért a munkacsoport az Arg381Gln és *CARD15* között additív hatást feltételezett. Cummings és munkatársai 604 Crohn-beteg, valamint 993 kontroll személy bevonásával végzett tanulmányában az *IL23R* nyolc variánsát vizsgálta a *CARD15* génnel párosítva, de nem találtak statisztikai interakciót a két gén között[246]. Az *IL23R* rs1004819 variánsa és a *CARD15* gén közti interakciót vizsgáló tanulmány szintén negatív eredménnyel zárult[120].

Jelen dolgozatban vizsgált mindkét *IL23R* variáns normál *CARD15* genotípus háttér mellett szignifikánsan emelte a betegség kialakulásának kockázatát; a *CARD15* R702W és L1007fs mutációk rizikó hatása a két *IL23R* mutáció hiányában is érvényesült. A második legmagasabb kockázatot az rs2201841 és L1007fs mutációk kombinációja eredményezte, ez a referencia genotípushoz képest 8,5-szer nagyobbnak adódott; míg a legnagyobb OR értéket a pozitív *CARD15* státusz és az rs2201841 együttes vizsgálata során kaptuk (OR=9). Érdekes módon az *IL23R* rs2201841 és *CARD15* R702W kombináció esetén nem találtunk szignifikáns asszociációt a betegség megjelenésével a referencia genotípus kombinációhoz viszonyítva.

***IL23R* és IBD5**

Az *IL23R* gén és az IBD5 lókusz közti statisztikai interakció vizsgálatával szintén több nemzetközi tanulmány foglalkozott. Glas és munkatársai az *IL23R* rs1004819 variáns valamint az *SLC22A4/5* mutációk közötti statisztikai interakciót elemezve nem tudott szignifikáns kapcsolatot kimutatni[120]. Okazaki és munkatársai az *IL23R* rs10889677 és az IGR2230 variánsok között ugyan nem talált szignifikáns interakciót, de erre utaló tendenciát igen[123]. Cummings és munkatársai az *IL23R* gén és az *IBD5* lókusz közti interakció vizsgálata során az rs11209026 variáns kivételével - amely az *OCTN1/2* TC haplotípustól független védőfaktornak bizonyult - szinte valamennyi vizsgált *IL23R* variáns (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841 és rs1343151) csak pozitív *IBD5* háttér mellett mutatott szignifikáns asszociációt a betegséggel[246].

Munkánk során két *IL23R* SNP, az rs2201841 és rs1004819 variánsok valamint az IBD5 haplotípus részét képező két marker, az IGR2198a_1 és IGR2096a_1 közti interakciót vizsgáltuk. Eredményeink szerint, az rs2201841 mutáció az IBD5 háttértől függetlenül emelte

a betegség kialakulásának kockázatát (5-, illetve 4-szeresére). Az rs1004819 ugyanakkor kizárólag valamelyik IBD5 markerrel párosítva mutatott asszociációt a betegséggel, sőt, normál rs1004819 háttér mellett az IBD5 lókusz hatása sem érvényesült.

IBD5 és *CARD15*

Az IBD5 és *CARD15* gének közti lehetséges interakció felderítésére irányuló kutatások már az ezredforduló táján elindultak. Mirza és munkatársai TDT (transmission disequilibrium test), illetve eset-kontroll vizsgálataiban az 5q31 régió és a *CARD15* gén között kooperációt írt le, az IBD5 rizikó haplotípus kizárólag olyan személyekben fordult elő, akik legalább egy *CARD15* variánssal rendelkeztek[116]. Gazouli eredményei szerint a *CARD15* gén és az *OCTN1/2* TC haplotípus együtt emeli a Crohn-betegség kialakulásának kockázatát[332], más vizsgálatok viszont nem találtak szignifikáns kapcsolatot sem a TC haplotípus, sem más IBD5 variánsok (IGR2096a_1 és IGR2198a_1) esetén[117,122,333,359-361].

Az általunk vizsgált magyar Crohn-beteg populációban a *CARD15* gén és az IBD5 lókusz független hajlamosító tényezőnek bizonyult. Az IGR2198a_1 és az IGR2096a_1 variánsok a normál *CARD15* R702W, illetve L1007fs háttér, valamint negatív *CARD15* státusz mellett egyaránt 1,6-szorosára növelték a betegség kockázatát. A vizsgált *CARD15* mutációk mind az IBD5 polimorfizmusok jelenlétében, mind azok hiányában 3,4 körüli OR értéket eredményeztek.

***CTLA4* és IBD5**

Nem ritka, hogy a *CTLA4* +49 A/G variáns hatása autoimmun betegségekben csak más génekkel, elsősorban bizonyos HLA altípusokkal kombinálva érvényesül[301,362,363]. Hradsky és munkatársai[135] ugyan nem találtak szignifikáns kapcsolatot a +49 A/G variáns és Crohn-betegség kialakulása között, az általuk vizsgált többi *CTLA4* polimorfizmus, illetve az azok által alkotott haplotípus (CT60, JO31 és JO27-1) a *CARD15* L1007fs mutáció jelenlétében, valamint adott *IL23R* háttér mellett (R381Q) egyaránt védő hatásúnak bizonyult.

Tanulmányunkban a *CTLA4* +49 A/G mutáció, valamint két, a betegségre hajlamosító IBD5 marker közös hatását vizsgáltuk. Eredményeink szerint a *CTLA4* GA+GG genotípus háttér mellett sem a vizsgált IGR2198a_1 C allél, sem az IGR2096a_1 T allél nem mutatott asszociációt CD-vel. A *CTLA4* +49 AA genotípus jelenlétében ugyanakkor a betegség kialakulásának kockázata szignifikánsan megemelkedett, az OR értékek az egy-lókusz vizsgálathoz képest magasabbnak adódtak. A harmadik, a betegség kialakulása szempontjából neutrális hatású IBD5 marker, az IGR2230a_1 esetén nem találtunk összefüggést egyik

vizsgált kombinációnál sem, bár a *CTLA4* AA / IGR2230a_1 GA+AA kombináció közel szignifikánsnak adódott.

Több-lókusz, és magas kockázattal járó genotípus kombinációk

A több lókusz egyidejű vizsgálatának legfontosabb korlátja a megfelelő mintaszám elérése. Prescott és munkatársai[118] az *ATG16L1*, *CARD15* és IBD5 lókuszok közti statisztikai interakciót vizsgálták, és bár nem kaptak szignifikáns összefüggést, a mindhárom lókuszon homozigóta genotípus kombinációja azonban a normál genotípushoz képest mintegy 20,4-szeresére (95% CI: 8.71-47.7) emelte a betegség kialakulásának kockázatát. Latiano kutatócsoportja nemcsak párban vizsgálta az *IL23R*, *CARD15*, *ATG16L1* és IBD5 génvariánsok hatását, hanem hármasával is, interakciót viszont a tripletek esetén sem sikerült kimutatnia[122]. Weersma és munkatársai az *ATG16L1*, *IL23R*, *CARD15*, IBD5 és *DLG5* lókuszok kombinált analízise során a hajlamosító allélek számának növekedésével a betegség kockázatának emelkedését mutatta ki[128]. Az askenázi zsidó populációban a kontrollcsoporthoz képest a *NOD2*, *IL23R*, *IRGM* és *PTGER4* hajlamosító allélek száma Crohn-betegekben magasabbnak adódott[136]. McGovern és munkatársai az *IL23R*, *IL17A*, *IL17RA*, *IL12RB1* és *IL12RB2* gének additív kockázatemelő hatását mutatták ki, mely a haplotípusok számának növekedésével változott (az 5 kockázati haplotípus hordozása esetén 4,3 volt a relatív kockázat)[130].

Jelen dolgozatban – a magyar viszonylatban magasnak tekinthető, de statisztikai szempontból viszont alacsony mintaszám miatt – ugyan nem volt lehetőség kettőnél több lókusz kombinálására, a külföldi eredmények alapján érdemes volna emelt mintaszámmal a magyar populációban is felderíteni a magas kockázatot jelző genotípus kombinációkat.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Az *IL23R* rs1004819 variánst elsőként vizsgáltuk a magyar Crohn-beteg populációban. Megállapítottuk, hogy a fenti mutáció homozigóta formában növeli a betegség kialakulásának kockázatát.

II. Megerősítettük több korábbi, szintén a hazai populációt vizsgáló tanulmány eredményét: a *CARD15* két variánsa, az R702W és L1007fs, valamint az *ATG16L1* T300A mutációja hajlamosít a Crohn-betegség kialakulására a magyar populációban. Vizsgálatainkat az ország több régiójában (Pécs, Budapest, Szombathely, Zalaegerszeg, Miskolc, Békéscsaba) gyűjtött, magyar vonatkozásban nagyszámú Crohn-beteg minta felhasználásával végeztük.

III. Emelt mintaszámmal megerősítettük saját, korábbi eredményeinket: az *IL23R* génben található rs2201841 variáns, valamint az IBD5 rizikó haplotípus részét képező IGR2198a_1 és IGR2096a_1 markerek rizikófaktornak tekinthetők a Crohn-betegség kialakulásának szempontjából; míg a *CARD15* gén G908R mutációja, az IBD5 lókuszban található IGR2230a_1 polimorfizmus, valamint a *CTLA4* +49A/G variánsa neutrális szereppel bír.

IV. Megállapítottuk, hogy az egyes, a betegséggel asszociációt mutató főbb génvariánsok egymástól függetlenül emelik a CD kialakulásának kockázatát.

V. A génvariánsok kombinálásánál a következő megállapításokat tettük:

1. Az *ATG16L1* T300A mutáció homozigóta formában a *CARD15* R702W és L1007fs mutációktól független hajalmosító tényező. A magyar populációban rizikófaktort jelentő *CARD15* mutációk az *ATG16L1* gén vizsgált variánsával együtt többszörösére emelték a betegség kialakulásának esélyét, a három *CARD15* mutáció összevonásával képzett *CARD15* státusz esetén szintén hasonló hatást tapasztaltunk.
2. Az *ATG16L1* T300A homozigóta formában mindkét IBD5 marker esetén független hajlamosító tényező. Mindkét IBD5 variáns az *ATG16L1* genotípustól függetlenül emelte a betegség kialakulásának kockázatát, a kapott OR értékek az egy-lókusz analízis eredményével megegyező mértékűek. Az *ATG16L1* T300A génvariáns a vizsgált IBD5 markerek egyikével párosítva magasabb kockázatot jelent a betegség kialakulására, mint önmagában vizsgálva.
3. A két *IL23R* polimorfizmus és az *ATG16L1* mutáció kombinálása során különbséget találtunk: az *IL23R* rs2201841 CC homozigóta genotípus és az *ATG16L1* T300A mutáció homozigóta formában egymástól függetlenül növeli a betegség kialakulására

való hajlamot, együttes jelenlétük tovább emeli a CD kockázatát. Az *IL23R* rs1004189 mutáció kockázatnövelő hatása az *ATG16L1* T300A normál genotípus jelenlétében nem érvényesül, az *ATG16L1* T300A homozigóta formája sem mutat szignifikáns asszociációt a betegséggel normál rs1004189 háttér mellett. Az *IL23R* rs1004189 és *ATG16L1* T300A variáns együttes hatása ugyanakkor magasabb rizikót eredményez, mint önmagukban vizsgálva.

4. Mindkét *IL23R* variáns normál *CARD15* genotípus háttér mellett szignifikánsan emeli a betegség kialakulásának kockázatát; a *CARD15* R702W és L1007fs mutációk ilyen irányú hatása a két *IL23R* mutáció hiányában is érvényesül. Az *IL23R* rs2201841 és *CARD15* R702W kombináció esetén nem találtunk szignifikáns asszociációt.
5. Az *IL23R* rs2201841 mutáció az IBD5 háttértől függetlenül emeli a betegség kialakulásának kockázatát. Az rs1004819 ugyanakkor kizárólag valamelyik IBD5 markerrel párosítva mutat asszociációt a betegséggel, sőt, normál rs1004819 háttér mellett az IBD5 lókusz hatása sem érvényesül.
6. Az általunk vizsgált magyar Crohn-beteg populációban a *CARD15* gént és az IBD5 lókuszt egymástól független hajlamosító tényezőnek találtuk. Az IGR2198a_1 és az IGR2096a_1 variánsok a normál *CARD15* R702W, illetve L1007fs háttér, valamint negatív *CARD15* státusz mellett egyaránt növelik a betegség kockázatát. A vizsgált *CARD15* mutációk mind az IBD5 variánsok jelenlétében, mind azok hiányában magas kockázatot jelentenek.
7. A legnagyobb OR értéket a pozitív *CARD15* státusz és az *IL23R* rs2201841 együttes vizsgálata során kaptuk, a második legmagasabb kockázatot az *IL23R* rs2201841 és L1007fs mutációk párosítása eredményezte.
8. Eredményeink szerint a *CTLA4* +49 AA genotípus háttér módosítja a vizsgált IBD5 markerek hajlamosító hatását: a genotípusok kombinálása során az IGR2198a_1 és IGR2096a_1 polimorfizmusok kizárólag ezzel a *CTLA4* genotípussal együtt növelik a betegség megjelenésének kockázatát. A harmadik, a betegség kialakulása szempontjából neutrális hatású IBD5 marker, az IGR2230a_1 esetén nem mutatott összefüggést egyik vizsgált kombinációnál sem.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Melegh Béla Professzor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy csatlakozhassak a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Doktori Iskolájában a Multidiszciplináris Orvostudományok keretén belül zajló „Humán molekuláris genetika" PhD képzéséhez. Szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította és segítette.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Sarlós Patrícia és Dr. Lakner Lilla doktornőknek, akik közreműködtek a minták gyűjtésével és a betegadatok feldolgozásával kapcsolatban.

Köszönöm Dr. Berenténé Dr. Bene Juditnak és Dr. Polgár Noéminek a munkám során nyújtott szakmai támogatást, tudományos segítséget.

Köszönöm továbbá az Orvosi Genetikai Intézet akkori PhD hallgatóinak, így Dr. Magyari Lilinek, Dr. Járomi Lucának, Dr. Horvatovich Katalinnak, Dr. Sáfrány Enikőnek és Dr. Sipeky Csillának a szakmai és emberi segítségét, amit kutatásaim alkalmával kaptam.

Hálával tartozom Papp Edit és Oksai Judit asszisztensnőknek, valamint az Orvosi Genetikai Intézet minden asszisztensének, akik tanulmányaim alatt hozzáértő, lelkiismeretes munkájukkal és szakmai tapasztalatukkal segítettek.

Köszönöm Dr. Pongrácz Judit Professzor Asszonynak azt a megértő türelmet és támogatást, mellyel a dolgozat elkészültét kísérte.

Köszönöm valamennyi, az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben és a Gyógyszerészi Biotechnológia Tanszéken dolgozó kollégámnak és barátomnak a tőlük kapott szeretetet és bátorítást.

8. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Polgár N, Bene J, Sarlós P, Lakner L, Baricza E, Szabó M, Rappai G, Melegh B. Interaction between CTLA4 gene and IBD5 locus in Hungarian Crohn's disease patients. Int J Colorectal Dis 26: 1119-1125 (2011). **IF: 2,385**

2. **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Faragó B, Bene J, Polgár N, Lakner L, Sarlós P, Varga M, Melegh B. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. World J Gastroenterol 16: 176-183 (2010). **IF: 2,092**

9. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Sarlos P, Varszegi D, **Csongei V**, Magyari L, Jaromi L, Nagy L, Melegh B. Susceptibility to ulcerative colitis in Hungarian patients determined by gene-gene interactions. World J Gastroenterol 20: 219-227 (2014).

2. Bartis D, **Csongei V**, Weich A, Kiss E, Barko S, Kovacs T, Avdicevic M, D'Souza VK, Rapp J, Kvell K, Jakab L, Nyitrai M, Molnar TF, Thickett DR, Laszlo T, Pongracz JE. (2013) Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma. PLoS One 8: e57393. **IF: 3,730** (2012).

3. Polgar N, **Csongei V**, Szabo M, Zambo V, Melegh BI, Sumegi K, Nagy G, Tulassay Z, Melegh B. Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease. Int J Immunogenet 39: 247-252 (2012). **IF: 1,290**

4. Varecza Z, Kvell K, Talabér G, Miskei G, **Csongei V**, Bartis D, Anderson G, Jenkinson EJ, Pongracz JE. Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence. Mech Ageing Dev 132: 249-256 (2011). **IF: 3,439**

5. Sipeky C, **Csongei V**, Jaromi L, Safrany E, Maasz A, Takacs I, Beres J, Fodor L, Szabo M, Melegh B. Genetic variability and haplotype profile of MDR1 (ABCB1) in Roma and Hungarian population samples with a review of the literature. Drug Metab Pharmacokinet 26: 206-215 (2011). **IF: 2,321**

6. Safrany E, Szell M, **Csongei V**, Jaromi L, Sipeky C, Szabo T, Kemeny L, Nagy J, Melegh B. Polymorphisms of the IL23R gene are associated with psoriasis but not with immunoglobulin A nephropathy in a Hungarian population. Inflammation 34: 603-608 (2011). **IF: 1,747**

7. Járomi L, **Csöngei V**, Polgár N, Rappai G, Szolnoki Z Maász A, Horvatovich K, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Melegh B. Triglyceride level-influencing functional variants of the ANGPTL3, CILP2, and TRIB1 loci in ischemic stroke. Neuromolecular Med 13: 179-186 (2011). **IF: 5,000**

8. Horvatovich K, Bokor S, Polgar N, Kisfali P, Hadarits F, Jaromi L, **Csongei V**, Repasy J, Molnar D, Melegh B. Functional glucokinase regulator gene variants have inverse effects on triglyceride and glucose levels, and decrease the risk of obesity in children. Diabetes Metab 37: 432-439 (2011). **IF: 2,411**

9. Polgár N, Járomi L, **Csöngei V**, Maász A, Sipeky C, Sáfrány E, Szabó M, Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALTN2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. Eur J Neurol 17: 1033-1039 (2010). **IF: 2,510**

10. Mohás M, Kisfali P, Járomi L, Maász A, Fehér E, **Csöngei V**, Polgár N, Sáfrány E, Cseh J, Sümegi K, Hetyésy K, Wittmann I, Melegh B. GCKR gene functional variants in type 2 diabetes and metabolic syndrome: do the rare variants associate with increased carotid intima-media thickness? Cardiovasc Diabetol 9: 79 (2010). **IF: 2,720**

11. Járomi L, **Csöngei V**, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyari L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. Functional variants of glucokinase regulatory protein and apolipoprotein A5 genes in ischemic stroke. J Mol Neurosci 41: 121-128 (2010). **IF: 2,720**

12. Sipeky C, **Csongei V**, Jaromi L, Safrany E, Polgar N, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Melegh B. Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) haplotypes in healthy Hungarian and Roma population samples. Pharmacogenomics 10 (2009): 1025-1032. **IF: 3,893**

13. Safrany E, Hobor R, Jakab L, Tarr T, **Csongei V**, Jaromi L, Sipeky C, Valasek A, Zeher M, Fust G, Czirjak L, Melegh B. Interleukin-23 receptor gene variants in Hungarian systemic lupus erythematosus patients. InflammRes. 59: 159-64 (2010). **IF: 2,004**

14. Sáfrány E, Pazár B, **Csöngei V**, Járomi L, Polgár N, Sipeky C, Horváth IF, Zeher M, Poór G, Melegh B. Variants of the IL23R gene are associated with ankylosing spondylitis but not with Sjögren syndrome in Hungarian population samples. Scand J Immunol 70: 68-74 (2009). **IF: 2,108**

15. Lakner L, **Csöngei V**, Sarlós P, Járomi L, Sáfrány E, Varga M, Orosz P, Magyari L, Bene J, Miheller P, Tulassay Z, Melegh B. IGR2096a_1 T and IGR2198a_1 C alleles on IBD5 locus of chromosome 5q31 region confer risk for Crohn's disease in Hungarian patients. Int J Colorectal Dis 24: 503-507 (2009). **IF: 2,102**

16. Lakner L, **Csöngei V**, Magyari L, Varga M, Miheller P, Sarlós P, Orosz P, Bári Z, Takács I, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Bene J, Tulassay Z, Döbrönte Z, Melegh B. [Possible role of selected IGR and SLC22A4/SLC22A5 loci in development of inflammatory bowel diseases]. Orv Hetil 150: 1375-1380 (2009).

17. Horvatovich K, Orkényi M, Bíró E, Pongrácz K, Kisfali P, Talián G, **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Harangi F, Sulyok E, Melegh B. [Pseudo-Bartter syndrome in a case of cystic fibrosis caused by C1529G and G3978A compound heterozygosity]. Orv Hetil 149: 325-328 (2008).

18. Faragó B, Magyari L, Sáfrány E, **Csöngei V**, Járomi L, Horvatovich K, Sipeky C, Maász A, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirják L, Melegh B. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 67: 248-250 (2008). **IF: 7,188**

19. Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Horvatovich K, Szolnoki Z, **Csongei V**, Safrany E, Sipeky C, Hadarits F, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. Circ J 72: 1065-1070 (2008). **IF: 2,387**

20. Sáfrány E, **Csöngei V**, Járomi L, Maász A, Magyari L, Sipeky C, Melegh B. [Mitochondrial DNA and its mutations: new advances in a new field]. Orv Hetil 148: 971-978 (2007).

21. Maász A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohás M, Markó L, **Csöngei V**, Faragó B, Járomi L, Magyari L, Sáfrány E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. Pathol Oncol Res 13: 243-247 (2007). **IF: 1,272**

22. Magyari L, Bene J, Komlósi K, Talián G, Faragó B, **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. Pathol Oncol Res 13: 53-56 (2007). **IF: 1,272**

23. Engelmann P, Kiss J, **Csöngei V**, Cooper EL, Németh P Earthworm leukocytes kill HeLa, HEp-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. J Biochem Biophys Methods 61: 215-227 (2004). **IF: 1,302**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **4,477**

Egyéb közlemények összesített impakt faktora: **51,823**

Összesített impakt faktor: **56,300**

10. IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

1. Bartis D, **Csöngei V**, Jakab L, Weich A, Barkó S, Nyitrai M, Molnár FT, Pongrácz JE. (2010) Role of Wnt11 in non-small cell lung cancer. Advances in Medical Biotechnology. Pécs, Hungary, 29 November-01 December 2010. p.16.

2. Bartis D, **Csöngei V**, Barkó S, Jakab L, Balassa T, Miskei G, Berta G, Varecza Z, Kvell K, Nyitrai M, László T, Molnár TF, Pongrácz JE. (2010) Lung tissue engineering for tissue regeneration research. Advances in Medical Biotechnology. Pécs, Hungary, 29 October-01 December 2010. p.30.

3. Janicsek I, Polgar N, **Csongei V**, Szabo M, Zambo V, Melegh B. (2011) Associations of STAT3, JAK2 and CCR6 polymorphisms with ulcerative colitis and Crohn's disease. Eur J Hum Genet. 19 Suppl 2: 262

4. Mohás M, Kisfali P, Járomi L, Maász A, Fehér E, **Csöngei V**, Polgár N, Sáfrány E, Cseh J, Sümegi K, Hetyésy K, Wittmann I, Melegh B. (2010) GCKR gene functional variants in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome: do the rare variants also associate with an increased carotid intima-media thickness in metabolic syndrome? Eur J Hum Genet. 18 Suppl 1: 256.

5. Sipeky C, Sáfrány E, **Csöngei V**, Járomi L, Kisfali P, Maász A, Polgár N, Bene J, Takács I, Szabó M, Melegh B. (2010) Haplotype profile of multidrug resistance 1 (MDR1/ABCB1) gene in the healthy Hungarian and Roma populations. Eur J Hum Genet. 18 Suppl 1: 259.

6. Járomi L, **Csöngei V**, Sáfrány E, Faragó B, Magyari L, Horvatovich K, Maász A, Sipeky C, Szolnoki Z, Melegh B. (2009) Analysis of GCKR and ApoA5 genes in Hungarian patients with ischemic stroke. Eur J Hum Genet. 17 Suppl 2: 390

7. Sáfrány E, Széll M, **Csöngei V**, Járomi L, Maász A, Sipeky C, Melegh B. (2009) Interleukin-23 receptor gene polymorphisms in Hungarian patients with psoriasis. Eur J Hum Genet. 17 Suppl 2: 272.

8. Sipeky C, Sáfrány E, **Csöngei V**, Járomi L, Kisfali P, Maász A, Polgár N, Bene J, Takács I, Szabó M, Melegh B. (2009) Comparison of VKORC1 haplotype profile and CYP2C9 polymorphisms as determinants of coumarin dose in Hungarian and Roma population samples. Eur J Hum Genet. 17 Suppl 2: 280.

9. **Csöngei V**, Magyari L, Sáfrány E, Faragó B, Járomi L, Sipeky C, Takács I, Orosz P, Melegh B. (2008) Interaction of IL23R 3'-UTR and ATG16L1 T300A in Hungarian Crohn's disease patients. Eur J Hum Genet. 16 Suppl 2: 303.

10. Járomi L, **Csöngei V**, Magyari L, Talián G, Sáfrány E, Sipeky C, Lakner L, Melegh B. (2008) Prevalence of IGR2198a_1 and IGR2096a_1 genetic variants in Hungarian patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Eur J Hum Genet. 16 Suppl 2: 304.

11. Lakner L, **Csöngei V**, Magyari L, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Talián G, Döbrönte Z, Melegh B. (2008) Prevalence of IGR2198a 1 and IGR2096a 1 genetic variants in

Hungarian patients with Crohn disease und ulcerative colitis. Zeitschrift Für Gastroenterologie. 46: 501.

12. Lakner L, **Csöngei V**, Sarlós P, Járomi L, Sáfrány E, Varga M, Magyari L, Miheller P, Tulassay Z, Döbrönte Z, Melegh B. (2008) Az 5Q31 régióban elhelyezkedő IBD5 gén IGR2096_1 T és IGR2198A_1 C allélek hajlamosító szerepe Chron-betegség kialakulásában. Magyar Belorvosi Archívum. 61: 79.

13. Magyari L, Talián G, **Csöngei V**, Bene J, Komlósi K, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Melegh B. (2008) Prevalence of IGR2230a_1 genotypes in Hungarian Crohn's disease and ulcerative colitis patients. Eur J Hum Genet. 16 Suppl 2: 303.

14. Sáfrány E, **Csöngei V**, Járomi L, Magyari L, Maász A, Sipeky C, Zeher M, Melegh B. (2008) Interleukin-23 receptor (IL23R) gene polymorphisms in patients with Sjögren syndrome. Eur J Hum Genet. 16 Suppl 2: 349.

15. Sipeky C, **Csöngei V**, Faragó B, Horvatovich K, Járomi L, Kisfali P, Maász A, Magyari L, Sáfrány E, Takács I, Melegh B. (2008) Haplotype profile of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) as determinant of warfarin sensitivity in Roma population. Eur J Hum Genet. 16 Suppl 2: 393.

16. **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Maász A, Magyari L, Horvatovich K, Faragó B, Takács I, Melegh B. (2007) Polimorphisms of the MDR1 gene in a Hungarian Roma population sample. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 260.

17. Horvatovich K, Magyari L, Maász A, Kisfali P, Bokor S, Faragó B, **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Molnár D, Melegh B. (2007) Apolipoprotein A5 T-1131C alleles in pediatric patients with obesity and metabolic syndrome. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 178.

18. Járomi L, Maász A, Szolnoki Z, Kisfali P, Horvatovich K, Magyari L, Sáfrány E, **Csöngei V**, Sipeky C, Melegh B. (2007) Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 235.

19. Kisfali P, Horvatovich K, Mohás M, Maász A, Markó L, **Csöngei V**, Faragó B, Járomi L, Magyari L, Sáfrány E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. (2007) Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 210.

20. Maász A, Horvatovich K, Kisfali P, Mohás M, Markó L, **Csöngei V**, Faragó B, Járomi L, Magyari L, Sáfrány E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. (2007) Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 178.

21. Sipeky C, **Csöngei V**, Faragó B, Horvatovich K, Járomi L, Magyari L, Sáfrány E, Takács I, Melegh B. (2007) Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 282.

22. Magyari L, Faragó B, Sáfrány E, **Csöngei V**, Horvatovich K, Járomi L, Sipeky C, Melegh B. (2007) IL-23 receptor 3'UTR C2370A variant in inflammatory bowel disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 255.

23. Sáfrány E, Faragó B, **Csöngei V**, Magyari L, Maász A, C, Járomi L, Horvatovich K, Radics J, Czirják L, Melegh B. (2007) Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients. Eur J Hum Genet. 15 Suppl 1: 256.

POSZTEREK

24. Feller D, Helyes Z, Rapp J, Kun J, Kovács T, **Csöngei V**, E Pongrácz JE (2013) A Wnt szignálmolekulák expressziójának vizsgálata dohányfüst indukálta in vivo és in vitro kísérleti modellrendszererekben. XVIII Bolyai Konferencia. Budapest, 2013. március 23-24.

25. Kiss E, Bartis D, **Csöngei V**, Kovács T, Avdicevic M, Rapp J, Kvell K, Pongrácz JE. (2013) A Wnt jelátviteli útvonal vizsgálata nem-kissejtes tüdőrákokban. 43 Membrán-transzport konferencia. Sümeg, 2013. május 21-24.

26. Rapp J, **Csöngei V**, Kovács T, Avdicevic M, Kiss E, Rapp J, Kvell K, Pongrácz JE. (2013) In vitro előállított tüdőszövet érhálózatának kialakítása in vivo körülmények között. 43 Membrán-Transzport Konferencia. Sümeg, 2013. Május 21-24.

27. Rapp J, **Csöngei V**, Kovács T, Avdicevic M, Kiss E, Pongrácz JE. (2013) Successful in vivo vascularization of in vitro engineered lung tissues. IMPULSE EFIS-EJI Symposium. Mátraháza, 2013. Augusztus 31-Szeptember 03.

28. Feller D, Helyes Z, Kun J, Kovács T, **Csöngei V**, Rapp J, Avdicevic M, Kiss E, Pongrácz JE. (2012) The expression of the Wnt11 and Wnt5a signal molecules in cigarette smoke-exposed airway inflammation models. 22nd Annual BioCity Simposium. Turku, Finland, 22-23 August 2012.

29. Feller D, Helyes Z, Kun J, Kovács T, **Csöngei V**, Rapp J, Avdicevic M, Kiss E, Pongrácz JE. (2012) The expression of the Wnt11 and Wnt5a signal molecules in cigarette smoke-exposed airway inflammation models. Janos Szentagothai Memorial Conference and Student Competition. Pécs, Hungary, 29-30 October 2012.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Gasche, C. *et al.* A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* **6**, 8-15 (2000).
2. Silverberg, M.S. *et al.* Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* **19 Suppl A**, 5-36 (2005).
3. Rubio, C.A., Orrego, A., Nesi, G. & Finkel, Y. Frequency of epithelioid granulomas in colonoscopic biopsy specimens from paediatric and adult patients with Crohn's colitis. *J Clin Pathol* **60**, 1268-72 (2007).
4. Lakatos, L. *et al.* [Epidemiology of inflammatory bowel diseases in Veszprem county of Western Hungary between 1977 and 2001]. *Orv Hetil* **144**, 1819-27 (2003).
5. Masala, G. *et al.* Divergent patterns of total and cancer mortality in ulcerative colitis and Crohn's disease patients: the Florence IBD study 1978-2001. *Gut* **53**, 1309-13 (2004).
6. Russel, M.G. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med* **11**, 191-196 (2000).
7. Shivananda, S. *et al.* 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**, 690-7 (1996).
8. Loftus, E.V. & Sandborn, W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **31**, 1-20 (2002).
9. Molodecky, N.A. & Kaplan, G.G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **6**, 339-46 (2010).
10. Lakatos, L. *et al.* Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in Western Hungary, 2002-2006. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 2558-65 (2011).
11. Nguyen, G.C. *et al.* Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort. *Am J Gastroenterol* **101**, 1012-23 (2006).
12. Ogunbi, S.O., Ransom, J.A., Sullivan, K., Schoen, B.T. & Gold, B.D. Inflammatory bowel disease in African-American children living in Georgia. *J Pediatr* **133**, 103-7 (1998).
13. Molinie, F. *et al.* Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* **53**, 843-8 (2004).
14. Lakatos, L. *et al.* Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol* **10**, 404-9 (2004).
15. Sincic, B.M. *et al.* Incidence of inflammatory bowel disease in Primorsko-goranska County, Croatia, 2000-2004: A prospective population-based study. in *Scand J Gastroenterol*, Vol. 41 437-44 (Norway, 2006).
16. Zheng, J.J. *et al.* Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. *Chin J Dig Dis* **6**, 175-81 (2005).
17. Desai, H.G. & Gupte, P.A. Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation? *Indian J Gastroenterol* **24**, 23-4 (2005).
18. Bernstein, C.N. & Shanahan, F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* **57**, 1185-91 (2008).

19. Mikhailov, T.A. & Furner, S.E. Breastfeeding and genetic factors in the etiology of inflammatory bowel disease in children. *World J Gastroenterol* **15**, 270-9 (2009).
20. Luther, J., Dave, M., Higgins, P.D. & Kao, J.Y. Association between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis* **16**, 1077-84 (2010).
21. Baron, S. *et al.* Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. in *Gut*, Vol. 54 357-63 (England, 2005).
22. Bernstein, C.N., Rawsthorne, P., Cheang, M. & Blanchard, J.F. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. in *Am J Gastroenterol*, Vol. 101 993-1002 (United States, 2006).
23. Montgomery, S.M., Lambe, M., Wakefield, A.J., Pounder, R.E. & Ekbom, A. Siblings and the risk of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **37**, 1301-8 (2002).
24. Hampe, J., Heymann, K., Krawczak, M. & Schreiber, S. Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int J Colorectal Dis* **18**, 413-7 (2003).
25. Amre, D.K. *et al.* Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* **101**, 1005-11 (2006).
26. Carbonnel, F., Jantchou, P., Monnet, E. & Cosnes, J. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. in *Gastroenterol Clin Biol*, Vol. 33 Suppl 3 S145-57 (2009 Elsevier Masson SAS, France, 2009).
27. Koloski, N.A., Bret, L. & Radford-Smith, G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol* **14**, 165-73 (2008).
28. Klement, E. *et al.* Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study. in *Am J Gastroenterol*, Vol. 103 1775-82 (United States, 2008).
29. Brock, J.H. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* **80**, 1-6 (2002).
30. Neuman, M.G. & Nanau, R.M. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res* **160**, 29-44 (2012).
31. Calkins, B.M. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **34**, 1841-54 (1989).
32. Bernstein, C.N. Why and where to look in the environment with regard to the etiology of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* **30 Suppl 3**, 28-32 (2012).
33. Bernstein, C.N. New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig Dis* **28**, 406-10 (2010).
34. Sartor, R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**, 577-94 (2008).
35. Reiff, C. & Kelly, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int J Med Microbiol* **300**, 25-33 (2010).
36. Shaw, S.Y., Blanchard, J.F. & Bernstein, C.N. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **105**, 2687-92 (2010).
37. De Vroey, B., De Cassan, C., Gower-Rousseau, C. & Colombel, J.F. Editorial: Antibiotics earlier, IBD later? *Am J Gastroenterol* **105**, 2693-6 (2010).
38. Hildebrand, H., Malmborg, P., Askling, J., Ekbom, A. & Montgomery, S.M. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **43**, 961-6 (2008).
39. Card, T., Logan, R.F., Rodrigues, L.C. & Wheeler, J.G. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* **53**, 246-50 (2004).

40. Darfeuille-Michaud, A. *et al.* High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**, 412-21 (2004).
41. Korzenik, J.R. Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. *J Clin Gastroenterol* **39**, S59-65 (2005).
42. Saebo, A., Vik, E., Lange, O.J. & Matuszkiewicz, L. Inflammatory bowel disease associated with Yersinia enterocolitica O:3 infection. *Eur J Intern Med* **16**, 176-182 (2005).
43. Kallinowski, F. *et al.* Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* **45**, 1552-8 (1998).
44. Lamps, L.W. *et al.* Pathogenic Yersinia DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol* **27**, 220-7 (2003).
45. Felder, J.B. *et al.* Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol* **95**, 1949-54 (2000).
46. Cipolla, G. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives. *Pharmacol Res* **46**, 1-6 (2002).
47. Neuman, M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* **149**, 173-86 (2007).
48. Cornish, J.A. *et al.* The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **103**, 2394-400 (2008).
49. Kaplan, G.G. *et al.* The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **103**, 2925-31 (2008).
50. Binder, V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* **16**, 351-5 (1998).
51. Hugot, J.P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599-603 (2001).
52. Binder, V. & Orholm, M. Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth J Med* **48**, 53-6 (1996).
53. Peeters, M. *et al.* Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* **111**, 597-603 (1996).
54. Glocker, E.O. *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* **361**, 2033-45 (2009).
55. Glocker, E.O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N. & Grimbacher, B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann N Y Acad Sci* **1246**, 102-7 (2011).
56. Janssens, A.C. & van Duijn, C.M. Genome-based prediction of common diseases: advances and prospects. *Hum Mol Genet* **17**, R166-73 (2008).
57. Orchard, T.R., Satsangi, J., Van Heel, D. & Jewell, D.P. Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. *Scand J Immunol* **51**, 10-7 (2000).
58. Hampe, J. *et al.* Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**, 1925-8 (2001).
59. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603-606 (2001).
60. Hugot, J.P. *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **379**, 821-3 (1996).
61. Satsangi, J. *et al.* Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* **14**, 199-202 (1996).
62. Cho, J.H. *et al.* Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7502-7 (1998).

63. Hampe, J. *et al.* Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* **65**, 1647-55 (1999).
64. Ma, Y. *et al.* A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 271-8 (1999).
65. Duerr, R.H., Barmada, M.M., Zhang, L., Pfutzer, R. & Weeks, D.E. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* **66**, 1857-62 (2000).
66. Rioux, J.D. *et al.* Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* **66**, 1863-70 (2000).
67. Williams, C.N., Kocher, K., Lander, E.S., Daly, M.J. & Rioux, J.D. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis* **8**, 375-81 (2002).
68. Duerr, R.H. *et al.* Evidence for an inflammatory bowel disease locus on chromosome 3p26: linkage, transmission/disequilibrium and partitioning of linkage. *Hum Mol Genet* **11**, 2599-606 (2002).
69. Paavola-Sakki, P. *et al.* Genome-wide search in Finnish families with inflammatory bowel disease provides evidence for novel susceptibility loci. *Eur J Hum Genet* **11**, 112-20 (2003).
70. Barmada, M.M. *et al.* A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflamm Bowel Dis* **10**, 513-20 (2004).
71. Vermeire, S. *et al.* Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* **53**, 980-6 (2004).
72. van Heel, D.A. *et al.* Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* **13**, 763-70 (2004).
73. Matricon, J., Barnich, N. & Ardid, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself.* **1**, 299-309 (2010).
74. Hugot, J.P. *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **379**, 821-823 (1996).
75. Cavanaugh, J.A. *et al.* Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet* **62**, 291-8 (1998).
76. Zouali, H. *et al.* Genetic refinement and physical mapping of a chromosome 16q candidate region for inflammatory bowel disease. *Eur J Hum Genet* **9**, 731-42 (2001).
77. Duerr, R.H. *et al.* Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. in *Am J Hum Genet*, Vol. 63 95-100 (United States, 1998).
78. Rioux, J.D. *et al.* Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* **29**, 223-8 (2001).
79. van Heel, D.A. *et al.* The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with CARD15 and IBD5 disease-associated variants. *Hum Mol Genet* **12**, 2569-75 (2003).
80. Cho, J.H. *et al.* Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. in *Hum Mol Genet*, Vol. 9 1425-32 (England, 2000).
81. Annese, V. *et al.* Linkage of ulcerative colitis to the pericentromeric region of chromosome 16 in Italian inflammatory bowel disease families is independent of the presence of common CARD15 mutations. *J Med Genet* **40**, 837-41 (2003).
82. Hampe, J. *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat.Genet.* **39**, 207-211 (2007).

83. Paavola, P. *et al.* Genetic analysis in Finnish families with inflammatory bowel disease supports linkage to chromosome 3p21. *Eur J Hum Genet* **9**, 328-34 (2001).
84. Dideberg, V. *et al.* An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. in *Hum Mol Genet*, Vol. 16 3008-16 (England, 2007).
85. Rioux, J.D. *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat.Genet.* **39**, 596-604 (2007).
86. Fisher, S.A. *et al.* Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* **40**, 710-2 (2008).
87. Barrett, J.C. *et al.* Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat.Genet.* **40**, 955-962 (2008).
88. Yamazaki, K. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. in *Hum Mol Genet*, Vol. 14 3499-506 (England, 2005).
89. Libioulle, C. *et al.* 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 (2007).
90. Franke, A. *et al.* Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS One* **2**, e691 (2007).
91. Parkes, M. *et al.* Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat.Genet.* **39**, 830-832 (2007).
92. Franke, A. *et al.* Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* **40**, 1319-23 (2008).
93. Fowler, E.V. *et al.* TNFalpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. *J Med Genet* **42**, 523-8 (2005).
94. Kugathasan, S. *et al.* Loci on 20q13 and 21q22 are associated with pediatric-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* **40**, 1211-5 (2008).
95. Silverberg, M.S. *et al.* Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* **41**, 216-20 (2009).
96. Shugart, Y.Y. *et al.* An SNP linkage scan identifies significant Crohn's disease loci on chromosomes 13q13.3 and, in Jewish families, on 1p35.2 and 3q29. *Genes Immun.* **9**, 161-167 (2008).
97. Duerr, R.H. *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314**, 1461-1463 (2006).
98. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661-678 (2007).
99. Raelson, J.V. *et al.* Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 14747-14752 (2007).
100. Imielinski, M. *et al.* Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat.Genet.* **41**, 1335-1340 (2009).
101. McGovern, D.P. *et al.* Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. in *Nat Genet*, Vol. 42 332-7 (United States, 2010).
102. Franke, A. *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat.Genet.* **42**, 1118-1125 (2010).
103. Cho, J.H. & Brant, S.R. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**, 1704-1712 (2011).

104. Goldstein, D.B. Common genetic variation and human traits. *N Engl J Med* **360**, 1696-8 (2009).
105. McCarthy, M.I. *et al.* Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* **9**, 356-69 (2008).
106. Bateson, W. *Mendel's Principles of Heredity*, (Cambridge University Press, Cambridge, 1909).
107. Fisher, R.A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans R Soc Edin* **52**, 399-433 (1918).
108. Phillips, P.C. Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat.Rev.Genet.* **9**, 855-867 (2008).
109. Cordell, H.J. *et al.* Statistical modeling of interlocus interactions in a complex disease: rejection of the multiplicative model of epistasis in type 1 diabetes. *Genetics* **158**, 357-67 (2001).
110. Waddington, C.H. Canalization of Development and Inheritance of Acquired Characters. *Nature* **150**, 563-565 (1942).
111. Nelson, M.R., Kardia, S.L., Ferrell, R.E. & Sing, C.F. A combinatorial partitioning method to identify multilocus genotypic partitions that predict quantitative trait variation. *Genome Res* **11**, 458-70 (2001).
112. Moore, J.H., Lamb, J.M., Brown, N.J. & Vaughan, D.E. A comparison of combinatorial partitioning and linear regression for the detection of epistatic effects of the ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms on plasma PAI-1 levels. in *Clin Genet*, Vol. 62 74-9 (Denmark, 2002).
113. Hoh, J. *et al.* Selecting SNPs in two-stage analysis of disease association data: a model-free approach. *Ann Hum Genet* **64**, 413-7 (2000).
114. Hoh, J. & Ott, J. A train of thoughts on gene mapping. in *Theor Popul Biol*, Vol. 60 149-53 (United States, 2001).
115. Ritchie, M.D. *et al.* Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* **69**, 138-47 (2001).
116. Mirza, M.M. *et al.* Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. *Am J Hum Genet* **72**, 1018-22 (2003).
117. Latiano, A. *et al.* Contribution of IBD5 locus to clinical features of IBD patients. *Am.J.Gastroenterol.* **101**, 318-325 (2006).
118. Prescott, N.J. *et al.* A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* **132**, 1665-1671 (2007).
119. Roberts, R.L. *et al.* IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.* **102**, 2754-2761 (2007).
120. Glas, J. *et al.* rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS.ONE.* **2**, e819 (2007).
121. Glas, J. *et al.* The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am.J.Gastroenterol.* **103**, 682-691 (2008).
122. Latiano, A. *et al.* Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy. *World J.Gastroenterol.* **14**, 4643-4651 (2008).

123. Okazaki, T. *et al.* Contributions of IBD5, IL23R, ATG16L1, and NOD2 to Crohn's disease risk in a population-based case-control study: evidence of gene-gene interactions. *Inflamm.Bowel.Dis.* **14**, 1528-1541 (2008).
124. Kanaan, Z. *et al.* Crohn's disease in Caucasians and African Americans, as defined by clinical predictors and single nucleotide polymorphisms. *J Natl Med Assoc* **104**, 420-7 (2012).
125. Petermann, I. *et al.* Interactions among genes influencing bacterial recognition increase IBD risk in a population-based New Zealand cohort. *Hum.Immunol.* **70**, 440-446 (2009).
126. Török, H.P. *et al.* Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **104**, 1723-33 (2009).
127. Abad, C. *et al.* Association of Toll-like receptor 10 and susceptibility to Crohn's disease independent of NOD2. *Genes Immun* **12**, 635-42 (2011).
128. Weersma, R.K. *et al.* Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort. *Gut* **58**, 388-395 (2009).
129. D'Addabbo, A. *et al.* Association of genetic profiles to Crohn's disease by linear combinations of single nucleotide polymorphisms. *Artif Intell Med* **46**, 131-8 (2009).
130. McGovern, D.P. *et al.* Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat.Genet.* **42**, 332-337 (2010).
131. Marrakchi, R. *et al.* Interleukin 10 promoter region polymorphisms in inflammatory bowel disease in Tunisian population. *Inflamm Res* **58**, 155-60 (2009).
132. Polgar, N. *et al.* Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease. *Int J Immunogenet* **39**, 247-52 (2012).
133. Glas, J. *et al.* Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset. *PLoS One* **5**, e10373 (2010).
134. Morgan, A.R., Han, D.Y., Lam, W.J., Fraser, A.G. & Ferguson, L.R. Association analysis of 3p21 with Crohn's disease in a New Zealand population. *Hum Immunol* **71**, 602-9 (2010).
135. Hradsky, O. *et al.* The CTLA4 variants may interact with the I. *BMC.Med.Genet.* **11**, 91 (2010).
136. Peter, I. *et al.* Evaluation of 22 genetic variants with Crohn's disease risk in the Ashkenazi Jewish population: a case-control study. *BMC Med Genet* **12**, 63 (2011).
137. Ogura, Y. *et al.* Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**, 4812-8 (2001).
138. Tanabe, T. *et al.* Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* **23**, 1587-97 (2004).
139. Coulombe, F. *et al.* Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J Exp Med* **206**, 1709-16 (2009).
140. Hsu, Y.M. *et al.* The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* **8**, 198-205 (2007).
141. McCarthy, J.V., Ni, J. & Dixit, V.M. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* **273**, 16968-75 (1998).
142. Navas, T.A., Baldwin, D.T. & Stewart, T.A. RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **274**, 33684-90 (1999).
143. Lécine, P. *et al.* The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane. *J Biol Chem* **282**, 15197-207 (2007).

144. Barnich, N., Aguirre, J.E., Reinecker, H.C., Xavier, R. & Podolsky, D.K. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor-{kappa}B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* **170**, 21-6 (2005).
145. Abreu, M.T. *et al.* Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123**, 679-88 (2002).
146. Ahmad, T. *et al.* The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**, 854-66 (2002).
147. Cuthbert, A.P. *et al.* The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 867-74 (2002).
148. Hampe, J. *et al.* Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* **359**, 1661-5 (2002).
149. Vermeire, S. *et al.* CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* **71**, 74-83 (2002).
150. Bairead, E. *et al.* Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogenous Irish population. *Eur J Hum Genet* **11**, 237-44 (2003).
151. Fernandez, L. *et al.* IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* **10**, 715-22 (2004).
152. Giachino, D. *et al.* Analysis of the CARD15 variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *Eur J Hum Genet* **12**, 206-12 (2004).
153. Heresbach, D. *et al.* NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype- phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **16**, 55-62 (2004).
154. Newman, B. *et al.* CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **99**, 306-15 (2004).
155. Annese, V. *et al.* Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease--an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol* **100**, 84-92 (2005).
156. Arnott, I.D. *et al.* NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* **5**, 417-25 (2004).
157. Economou, M., Trikalinos, T.A., Loizou, K.T., Tsianos, E.V. & Ioannidis, J.P. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* **99**, 2393-404 (2004).
158. Vermeire, S. & Rutgeerts, P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes Immun.* **6**, 637-645 (2005).
159. Oostenbrug, L.E. *et al.* CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis* **38**, 834-45 (2006).
160. Henckaerts, L. & Vermeire, S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **13**, 235-41 (2007).
161. Lesage, S. *et al.* CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* **70**, 845-57 (2002).
162. Brant, S.R. *et al.* Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm.Bowel.Dis.* **9**, 281-289 (2003).
163. Lakatos, P.L. *et al.* Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J.Gastroenterol.* **11**, 1489-1495 (2005).

164. Ferraris, A. *et al.* Relationship between CARD15, SLC22A4/5, and DLG5 polymorphisms and early-onset inflammatory bowel diseases: an Italian multicentric study. *Inflamm.Bowel.Dis.* **12**, 355-361 (2006).
165. Medici, V. *et al.* Extreme heterogeneity in CARD15 and DLG5 Crohn disease-associated polymorphisms between German and Norwegian populations. *Eur J Hum Genet* **14**, 459-68 (2006).
166. Torkvist, L. *et al.* Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to Crohn's disease in Sweden. *Scand J Gastroenterol* **41**, 700-5 (2006).
167. Ernst, A. *et al.* Mutations in CARD15 and smoking confer susceptibility to Crohn's disease in the Danish population. *Scand J Gastroenterol* **42**, 1445-51 (2007).
168. Bene, J. *et al.* Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J.Gastroenterol.* **12**, 5550-5553 (2006).
169. Inoue, N. *et al.* Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123**, 86-91 (2002).
170. Yamazaki, K., Takazoe, M., Tanaka, T., Kazumori, T. & Nakamura, Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* **47**, 469-72 (2002).
171. Leong, R.W. *et al.* NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* **17**, 1465-70 (2003).
172. Gao, M. *et al.* [NOD2/CARD15 gene polymorphisms and susceptibility to Crohn's disease in Chinese Han population]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **44**, 210-2 (2005).
173. Croucher, P.J. *et al.* Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* **11**, 6-16 (2003).
174. Lee, G.H., Kim, C.G., Kim, J.S., Jung, H.C. & Song, I.S. [Frequency analysis of NOD2 gene mutations in Korean patients with Crohn's disease]. *Korean J Gastroenterol* **45**, 162-8 (2005).
175. Rosenstiel, P. *et al.* TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**, 1001-9 (2003).
176. Berrebi, D. *et al.* Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* **52**, 840-6 (2003).
177. Kosovac, K. *et al.* Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* **16**, 1311-21 (2010).
178. Bonen, D.K. *et al.* Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* **124**, 140-146 (2003).
179. Chamaillard, M., Girardin, S.E., Viala, J. & Philpott, D.J. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* **5**, 581-92 (2003).
180. Girardin, S.E. *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**, 8869-72 (2003).
181. Inohara, N. *et al.* Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**, 5509-12 (2003).
182. Abraham, C. & Cho, J.H. Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 641-50 (2006).
183. Netea, M.G. *et al.* NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* **34**, 2052-9 (2004).

184. Netea, M.G. *et al.* NOD2 3020insC mutation and the pathogenesis of Crohn's disease: impaired IL-1beta production points to a loss-of-function phenotype. *Neth J Med* **63**, 305-8 (2005).
185. Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J. & Strober, W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**, 800-8 (2004).
186. Kobayashi, K.S. *et al.* Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**, 731-4 (2005).
187. Maeda, S. *et al.* Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **307**, 734-8 (2005).
188. Lala, S. *et al.* Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* **125**, 47-57 (2003).
189. Ogura, Y. *et al.* Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* **52**, 1591-7 (2003).
190. Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K. & Girardin, S.E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* **14**, 9-23 (2014).
191. van Heel, D.A. *et al.* Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* **365**, 1794-6 (2005).
192. van Heel, D.A. *et al.* Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* **54**, 1553-7 (2005).
193. Tada, H., Aiba, S., Shibata, K., Ohteki, T. & Takada, H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* **73**, 7967-76 (2005).
194. Fritz, J.H. *et al.* Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* **35**, 2459-70 (2005).
195. Yang, S. *et al.* Synergistic effect of muramyldipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun* **69**, 2045-53 (2001).
196. Wolfert, M.A., Murray, T.F., Boons, G.J. & Moore, J.N. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem* **277**, 39179-86 (2002).
197. Netea, M.G. *et al.* IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1beta and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16309-14 (2005).
198. Uehara, A. *et al.* Muramyldipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol* **7**, 53-61 (2005).
199. Miceli-Richard, C. *et al.* CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* **29**, 19-20 (2001).
200. Tukel, T. *et al.* Crohn disease: frequency and nature of CARD15 mutations in Ashkenazi and Sephardi/Oriental Jewish families. *Am J Hum Genet* **74**, 623-36 (2004).
201. King, K. *et al.* Mutation, selection, and evolution of the Crohn disease susceptibility gene CARD15. *Hum Mutat* **27**, 44-54 (2006).
202. van Heel, D.A., Hunt, K.A., Ghosh, S., Herve, M. & Playford, R.J. Normal responses to specific NOD1-activating peptidoglycan agonists in the presence of the NOD2 frameshift and other mutations in Crohn's disease. *Eur J Immunol* **36**, 1629-35 (2006).

203. Sugimura, K. *et al.* A novel NOD2/CARD15 haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* **72**, 509-18 (2003).
204. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42 (2008).
205. Schmid, D. & Munz, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**, 11-21 (2007).
206. Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. & Ohsumi, Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5.Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* **277**, 18619-25 (2002).
207. Mizushima, N. *et al.* Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116**, 1679-88 (2003).
208. Zheng, H. *et al.* Cloning and analysis of human Apg16L. *DNA Seq.* **15**, 303-305 (2004).
209. Buning, C. *et al.* A study in three European IBD cohorts confirms that the ATG16L1 c.898A>G (p.Thr300Ala) variant is a susceptibility factor for Crohn's disease. *J Crohns Colitis* **1**, 70-6 (2007).
210. Cummings, J.R. *et al.* Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm.Bowel.Dis.* **13**, 941-946 (2007).
211. Cotterill, L. *et al.* Replication and meta-analysis of 13,000 cases defines the risk for interleukin-23 receptor and autophagy-related 16-like 1 variants in Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* **24**, 297-302 (2010).
212. Lakatos, P.L. *et al.* ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig.Liver Dis.* **40**, 867-873 (2008).
213. Zhang, H.F. *et al.* ATG16L1 T300A polymorphism and Crohn's disease susceptibility: evidence from 13,022 cases and 17,532 controls. *Hum Genet* **125**, 627-31 (2009).
214. Cadwell, K. *et al.* A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456**, 259-63 (2008).
215. Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J.D., Daly, M.J. & Xavier, R.J. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS.ONE.* **3**, e3391 (2008).
216. Cadwell, K., Patel, K.K., Komatsu, M., Virgin, H.W.t. & Stappenbeck, T.S. A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy* **5**, 250-2 (2009).
217. Cadwell, K. *et al.* Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* **141**, 1135-45 (2010).
218. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323-35 (2011).
219. Zenewicz, L.A., Antov, A. & Flavell, R.A. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* **15**, 199-207 (2009).
220. Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* **8**, 337-48 (2008).
221. Nurieva, R. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**, 480-3 (2007).
222. Zhou, L. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* **8**, 967-74 (2007).
223. Williams, I.R. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1072**, 52-61 (2006).

224. Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat.Immunol.* **8**, 345-350 (2007).
225. Kim, J.M. & Rudensky, A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev* **212**, 86-98 (2006).
226. Izcue, A. *et al.* Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* **28**, 559-70 (2008).
227. Weaver, C.T. & Murphy, K.M. The central role of the Th17 lineage in regulating the inflammatory/autoimmune axis. *Semin Immunol* **19**, 351-2 (2007).
228. Kastelein, R.A., Hunter, C.A. & Cua, D.J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* **25**, 221-42 (2007).
229. Valatas, V., Vakas, M. & Kolios, G. The value of experimental models of colitis in predicting efficacy of biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **305**, G763-85 (2013).
230. Oppmann, B. *et al.* 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 (2000).
231. Yao, Z. *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* **155**, 5483-6 (1995).
232. Neurath, M.F. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat.Med.* **13**, 26-28 (2007).
233. Parkes, M., Cortes, A., van Heel, D.A. & Brown, M.A. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nat Rev Genet* **14**, 661-73 (2013).
234. Yen, D. *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**, 1310-6 (2006).
235. Becker, C. *et al.* Cutting edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* **177**, 2760-4 (2006).
236. Hue, S. *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* **203**, 2473-2483 (2006).
237. Fuss, I.J. *et al.* Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* **12**, 9-15 (2006).
238. Guan, Q. *et al.* Targeting IL-12/IL-23 by employing a p40 peptide-based vaccine ameliorates TNBS-induced acute and chronic murine colitis. *Mol Med* **17**, 646-56 (2011).
239. Elson, C.O. *et al.* Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* **132**, 2359-70 (2007).
240. Parham, C. *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* **168**, 5699-708 (2002).
241. Yu, R.Y. & Gallagher, G. A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells. *J Immunol* **185**, 7302-8 (2010).
242. Zhang, X.Y. *et al.* Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells. *Immunogenetics* **57**, 934-43 (2006).
243. Kan, S.H., Mancini, G. & Gallagher, G. Identification and characterization of multiple splice forms of the human interleukin-23 receptor alpha chain in mitogen-activated leukocytes. *Genes Immun* **9**, 631-9 (2008).

244. Borgiani, P. *et al.* Interleukin-23R Arg381Gln is associated with susceptibility to Crohn's disease but not with phenotype in an Italian population. *Gastroenterology* **133**, 1049-51; author reply 1051-2 (2007).
245. Büning, C. *et al.* Heterozygosity for IL23R p.Arg381Gln confers a protective effect not only against Crohn's disease but also ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* **26**, 1025-33 (2007).
246. Cummings, J.R. *et al.* Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm.Bowel.Dis.* **13**, 1063-1068 (2007).
247. Oliver, J., Rueda, B., Lopez-Nevot, M.A., Gomez-Garcia, M. & Martin, J. Replication of an association between IL23R gene polymorphism with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**, 977-81, 981 e1-2 (2007).
248. Tremelling, M. *et al.* IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **132**, 1657-1664 (2007).
249. Weersma, R.K. *et al.* ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. *Am.J.Gastroenterol.* **103**, 621-627 (2008).
250. Einarsdottir, E. *et al.* IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC.Med.Genet.* **10**, 8 (2009).
251. Yamazaki, K. *et al.* Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet* **52**, 575-83 (2007).
252. Faragó, B. *et al.* Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **67**, 248-50 (2008).
253. Burton, P.R. *et al.* Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat.Genet.* **39**, 1329-1337 (2007).
254. Wang, K. *et al.* Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease. *Am J Hum Genet* **84**, 399-405 (2009).
255. Linsley, P.S. & Ledbetter, J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* **11**, 191-212 (1993).
256. Boise, L.H. *et al.* CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**, 87-98 (1995).
257. Magistrelli, G. *et al.* A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol* **29**, 3596-602 (1999).
258. Krummel, M.F. & Allison, J.P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J.Exp.Med.* **183**, 2533-2540 (1996).
259. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10113-8 (2008).
260. Qureshi, O.S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600-3 (2011).
261. Bour-Jordan, H. & Bluestone, J.A. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* **229**, 41-66 (2009).
262. Punt, J.A., Osborne, B.A., Takahama, Y., Sharrow, S.O. & Singer, A. Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* **179**, 709-13 (1994).
263. Punt, J.A., Havran, W., Abe, R., Sarin, A. & Singer, A. T cell receptor (TCR)-induced death of immature CD4+CD8+ thymocytes by two distinct mechanisms differing in

their requirement for CD28 costimulation: implications for negative selection in the thymus. *J Exp Med* **186**, 1911-22 (1997).
264. Buhlmann, J.E., Elkin, S.K. & Sharpe, A.H. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J Immunol* **170**, 5421-8 (2003).
265. Takahashi, S. *et al.* In vivo overexpression of CTLA-4 suppresses lymphoproliferative diseases and thymic negative selection. *Eur J Immunol* **35**, 399-407 (2005).
266. Cilio, C.M., Daws, M.R., Malashicheva, A., Sentman, C.L. & Holmberg, D. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 is induced in the thymus upon in vivo activation and its blockade prevents anti-CD3-mediated depletion of thymocytes. *J Exp Med* **188**, 1239-46 (1998).
267. Wagner, D.H., Jr. *et al.* Rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced cell death mediated by CD28/CTLA-4 costimulatory interactions with B7-1/B7-2. *J Exp Med* **184**, 1631-8 (1996).
268. Verhagen, J. *et al.* CTLA-4 controls the thymic development of both conventional and regulatory T cells through modulation of the TCR repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E221-30 (2013).
269. Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F. & Berneman, Z.N. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* **2007**, 89195 (2007).
270. Chamouard, P. *et al.* Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naive Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **54**, 2084-93 (2009).
271. Maul, J. *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **128**, 1868-78 (2005).
272. Saruta, M. *et al.* Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol* **125**, 281-90 (2007).
273. Chatenoud, L. & Bach, J.F. Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? *J Clin Invest* **116**, 2325-7 (2006).
274. Gabrysova, L. *et al.* Integrated T-cell receptor and costimulatory signals determine TGF-beta-dependent differentiation and maintenance of Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* **41**, 1242-8 (2011).
275. Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Rosemblatt, M. & Noelle, R.J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* **204**, 1765-74 (2007).
276. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* **12**, 431-40 (2000).
277. Tang, Q. *et al.* Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **171**, 3348-52 (2003).
278. Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. & Singer, A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* **6**, 152-62 (2005).
279. Barnes, M.J. *et al.* CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunol* **6**, 324-34 (2013).
280. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**, 303-10 (2000).
281. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **192**, 295-302 (2000).
282. Wing, K. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* **11**, 7-13 (2010).

283. Dejean, A.S. *et al.* Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol* **10**, 504-13 (2009).
284. Linsley, P.S., Ledbetter, J., Peach, R. & Bajorath, J. CD28/CTLA-4 receptor structure, binding stoichiometry and aggregation during T-cell activation. *Res Immunol* **146**, 130-40 (1995).
285. Dariavach, P., Mattei, M.G., Golstein, P. & Lefranc, M.P. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* **18**, 1901-5 (1988).
286. Nistico, L. *et al.* The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum.Mol.Genet.* **5**, 1075-1080 (1996).
287. Abe, T. *et al.* CTLA4 gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese type 1 diabetes. *Diabetes Res.Clin.Pract.* **46**, 169-175 (1999).
288. Cinek, O. *et al.* The CTLA4 +49 A/G dimorphism is not associated with type 1 diabetes in Czech children. *Eur.J.Immunogenet.* **29**, 219-222 (2002).
289. Donner, H. *et al.* CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 143-146 (1997).
290. Lee, Y.J. *et al.* Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **52**, 153-157 (2000).
291. Osei-Hyiaman, D. *et al.* Association of a novel point mutation (C159G) of the CTLA4 gene with type 1 diabetes in West Africans but not in Chinese. *Diabetes* **50**, 2169-2171 (2001).
292. Zalloua, P.A. *et al.* Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. *Hum.Immunol.* **65**, 719-724 (2004).
293. Lemos, M.C. *et al.* The CTLA4 +49 A/G polymorphism is not associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Int.J.Immunogenet.* **36**, 193-195 (2009).
294. Borhani, H.A., Ghahramani, S., Azarpira, N., Pourjafar, M. & Nikseresht, A.R. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 exon 1 A/G polymorphism in Iranian patients with multiple sclerosis. *Eur.J.Neurol.* **15**, 862-864 (2008).
295. Heggarty, S. *et al.* CTLA4 gene polymorphisms and multiple sclerosis in Northern Ireland. *J.Neuroimmunol.* **187**, 187-191 (2007).
296. Yousefipour, G., Erfani, N., Momtahan, M., Moghaddasi, H. & Ghaderi, A. CTLA4 exon 1 and promoter polymorphisms in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol.Scand.* **120**, 424-429 (2009).
297. Bilinska, M. *et al.* Progression of multiple sclerosis is associated with exon 1 CTLA-4 gene polymorphism. *Acta Neurol.Scand.* **110**, 67-71 (2004).
298. Heward, J.M. *et al.* The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 2398-2401 (1999).
299. Kinjo, Y. *et al.* Remission of Graves' hyperthyroidism and A/G polymorphism at position 49 in exon 1 of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 gene. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 2593-2596 (2002).
300. Kouki, T., Gardine, C.A., Yanagawa, T. & DeGroot, L.J. Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Graves' disease. *J.Endocrinol.Invest* **25**, 208-213 (2002).

301. Donner, H. *et al.* Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 4130-4132 (1997).
302. Gonzalez-Escribano, M.F. *et al.* CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **53**, 296-300 (1999).
303. Lee, C.S. *et al.* Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese. *Clin.Rheumatol.* **22**, 221-224 (2003).
304. Djilali-Saiah, I. *et al.* CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut* **43**, 187-189 (1998).
305. Naluai, A.T. *et al.* The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens* **56**, 350-355 (2000).
306. King, A.L. *et al.* Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA4 gene region. *Eur.J.Immunogenet.* **30**, 427-432 (2003).
307. Martin-Pagola, A. *et al.* No association of CTLA4 gene with celiac disease in the Basque population. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **37**, 142-145 (2003).
308. Popat, S. *et al.* Analysis of the CTLA4 gene in Swedish coeliac disease patients. *Scand.J.Gastroenterol.* **37**, 28-31 (2002).
309. Popat, S. *et al.* Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of coeliac disease. *Ann.Hum.Genet.* **66**, 125-137 (2002).
310. Mora, B. *et al.* CTLA-4 +49 A/G dimorphism in Italian patients with celiac disease. *Hum.Immunol.* **64**, 297-301 (2003).
311. Machida, H. *et al.* Association of polymorphic alleles of CTLA4 with inflammatory bowel disease in the Japanese. *World J.Gastroenterol.* **11**, 4188-4193 (2005).
312. Ben Alaya, W. *et al.* Association between CTLA-4 gene promoter (49 A/G) in exon 1 polymorphisms and inflammatory bowel disease in the Tunisian population. *Saudi.J.Gastroenterol.* **15**, 29-34 (2009).
313. Xia, B. *et al.* CTLA4 gene polymorphisms in Dutch and Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Scand.J.Gastroenterol.* **37**, 1296-1300 (2002).
314. Hou, W. *et al.* CTLA-4 gene polymorphisms in Chinese patients with ulcerative colitis. *Inflamm.Bowel.Dis.* **11**, 653-656 (2005).
315. Hradsky, O. *et al.* The CTLA4 variants may interact with the IL23R- and NOD2-conferred risk in development of Crohn's disease. *BMC Med Genet* **11**, 91 (2010).
316. Magyari, L. *et al.* No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J.Gastroenterol.* **13**, 2205-2208 (2007).
317. Kouki, T. *et al.* CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J.Immunol.* **165**, 6606-6611 (2000).
318. Maurer, M. *et al.* A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* **54**, 1-8 (2002).
319. Rueda, B. *et al.* CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol* **66**, 321-5 (2005).
320. Chen, Z. *et al.* Association of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene (rs60872763) polymorphism with Crohn's disease and high levels of serum sCTLA-4 in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* **26**, 924-30 (2011).
321. Suppiah, V. *et al.* The CTLA4+49A/G and CT60 polymorphisms and chronic inflammatory arthropathies in Northern Ireland. *Exp.Mol.Pathol.* **80**, 141-146 (2006).

322. Downie-Doyle, S., Bayat, N., Rischmueller, M. & Lester, S. Influence of CTLA4 haplotypes on susceptibility and some extraglandular manifestations in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **54**, 2434-2440 (2006).
323. Gudjonsdottir, A.H. *et al.* Association between genotypes and phenotypes in coeliac disease. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **49**, 165-169 (2009).
324. Hunt, K.A. *et al.* A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur.J.Hum.Genet.* **13**, 440-444 (2005).
325. Amundsen, S.S. *et al.* Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens* **64**, 593-599 (2004).
326. Giallourakis, C. *et al.* IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet* **73**, 205-11 (2003).
327. Armuzzi, A. *et al.* Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut* **52**, 1133-9 (2003).
328. Negoro, K. *et al.* Analysis of the IBD5 locus and potential gene-gene interactions in Crohn's disease. *Gut* **52**, 541-546 (2003).
329. Torkvist, L. *et al.* Contribution of the IBD5 locus to Crohn's disease in the Swedish population. *Scand.J.Gastroenterol.* **42**, 200-206 (2007).
330. Chua, K.H. *et al.* Association between inflammatory bowel disease gene 5 (IBD5) and interleukin-23 receptor (IL23R) genetic polymorphisms in Malaysian patients with Crohn's disease. *J Dig Dis* **13**, 459-65 (2012).
331. Peltekova, V.D. *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat.Genet.* **36**, 471-475 (2004).
332. Gazouli, M., Mantzaris, G., Archimandritis, A.J., Nasioulas, G. & Anagnou, N.P. Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease. *World J.Gastroenterol.* **11**, 7525-7530 (2005).
333. Noble, C.L. *et al.* The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology* **129**, 1854-1864 (2005).
334. Torok, H.P. *et al.* Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* **54**, 1421-1427 (2005).
335. Fisher, S.A. *et al.* Direct or indirect association in a complex disease: the role of SLC22A4 and SLC22A5 functional variants in Crohn disease. *Hum.Mutat.* **27**, 778-785 (2006).
336. Leung, E. *et al.* Polymorphisms in the organic cation transporter genes SLC22A4 and SLC22A5 and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Immunol.Cell Biol.* **84**, 233-236 (2006).
337. Martinez, A. *et al.* Association of the organic cation transporter OCTN genes with Crohn's disease in the Spanish population. *Eur.J.Hum.Genet.* **14**, 222-226 (2006).
338. Onnie, C. *et al.* Sequence variation, linkage disequilibrium and association with Crohn's disease on chromosome 5q31. *Genes Immun* **7**, 359-65 (2006).
339. Tosa, M. *et al.* Lack of association between IBD5 and Crohn's disease in Japanese patients demonstrates population-specific differences in inflammatory bowel disease. *Scand.J.Gastroenterol.* **41**, 48-53 (2006).
340. Yamazaki, K. *et al.* Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J.Hum.Genet.* **49**, 664-668 (2004).
341. Vermeire, S. *et al.* Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology* **129**, 1845-1853 (2005).

342. Noble, C.L. *et al.* DLG5 variants do not influence susceptibility to inflammatory bowel disease in the Scottish population. *Gut* **54**, 1416-1420 (2005).
343. Russell, R.K. *et al.* Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease. *Gut* **55**, 1114-1123 (2006).
344. Waller, S. *et al.* Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut* **55**, 809-814 (2006).
345. Silverberg, M.S. *et al.* Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease. *Eur.J.Hum.Genet.* **15**, 328-335 (2007).
346. Jostins, L. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* **491**, 119-24 (2012).
347. Moore, J.H. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum.Hered.* **56**, 73-82 (2003).
348. Magyari, L. *et al.* Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. *Pathol Oncol Res* **13**, 53-6 (2007).
349. Lakner, L. *et al.* IGR2096a_1 T and IGR2198a_1 C alleles on IBD5 locus of chromosome 5q31 region confer risk for Crohn's disease in Hungarian patients. *Int J Colorectal Dis* **24**, 503-7 (2009).
350. Talián, G. *et al.* Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis patients with different IGR2230a_1 genotypes. *Int J Immunogenet* **36**, 329-35 (2009).
351. Talian, G. *et al.* Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis patients with different IGR2230a_1 genotypes. *Int.J.Immunogenet.* **36**, 329-335 (2009).
352. Lacher, M. *et al.* Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children. *Acta Paediatr* **98**, 1835-40 (2009).
353. Buning, C. *et al.* DLG5 variants in inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.* **101**, 786-792 (2006).
354. Cooney, R. *et al.* NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* **16**, 90-7 (2010).
355. Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Girardin, S. & Philpott, D.J. Nod proteins link bacterial sensing and autophagy. *Autophagy* **6**, 409-11 (2010).
356. Homer, C.R., Richmond, A.L., Rebert, N.A., Achkar, J.P. & McDonald, C. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* **139**, 1630-41, 1641 e1-2 (2010).
357. Plantinga, T.S. *et al.* Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut* **60**, 1229-35 (2011).
358. Leshinsky-Silver, E. *et al.* Evaluation of the interleukin-23 receptor gene coding variant R381Q in pediatric and adult Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **45**, 405-8 (2007).
359. Palmieri, O. *et al.* Variants of OCTN1-2 cation transporter genes are associated with both Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **23**, 497-506 (2006).
360. Babusukumar, U., Wang, T., McGuire, E., Broeckel, U. & Kugathasan, S. Contribution of OCTN variants within the IBD5 locus to pediatric onset Crohn's disease. *Am.J.Gastroenterol.* **101**, 1354-1361 (2006).
361. Cucchiara, S. *et al.* Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World J.Gastroenterol.* **13**, 1221-1229 (2007).

362. Seidl, C. *et al.* CTLA4 codon 17 dimorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **51**, 62-66 (1998).
363. Jung, M.H. *et al.* Association of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms and HLA class II alleles with the development of type 1 diabetes in Korean children and adolescents. *J.Korean Med.Sci.* **24**, 1004-1009 (2009).