

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

**PhD tézisek**

*Csöngei Veronika*

**Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Genetikai Intézet**

**Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla**



**Pécs**

**2014**

## BEVEZETÉS

A krónikus gyulladós bélbetegségek (inflammatory bowel disease, IBD) két klinikai megjelenési formája a Crohn-betegség (CD) és a colitis ulcerosa (CU). Az IBD kialakulásának hátterében nagy valószínűséggel az immunrendszer, bélflóra és genotípus komplex viszonya, illetve annak zavara áll, patogenezisének pontos okai ugyanakkor még nem ismertek. A földrajzi eloszlás heterogenitása, a familiáris IBD formák, az egypetéjű ikrek magas konkordancia értéke mind a genetikai háttér szerepét hangsúlyozza a betegség kialakulásában. Az eddig azonosított hajlamosító gének egy része Crohn-betegségre, illetve colitis ulcerosára specifikus jelleget mutat, míg mások mindkét klinikai forma kialakulásában kockáztnövelő hatással bír. Az ismert lókuszok közül leggyakrabban a *CARD15*, *ATG16L1* és *IL23R* gének, valamint az IBD5 lókusz áll a kutatások középpontjában. Az elmúlt években elterjedt, az egész genomot térképező tanulmányok (genome wide association study, GWAS) elsősorban a gyakori variánsok azonosításában sikeresek, ám a segítségükkel azonosított lókuszok még így is a betegség genetikai meghatározottságának csupán 25%-áért tehetőek felelőssé, a maradék 75% továbbra is ismeretlen. Éppen ezért valószínűsíthető, hogy a CD fenotípust több száz minor biológiai hatással bíró, a populációban elterjedten megtalálható SNP interakciója alakítja ki és/vagy erős hatású ritka variánsoknak tulajdonítható a megjelenése. Ez idáig csak néhány magas OR értéket mutató variánst sikerült azonosítani, ezzel szemben nagyszámú gyakori, de csekély mértékben hajlamosító SNP vált ismertté. A betegséggel asszociált lókuszok növekvő számával lehetővé vált a gének közti interakció vizsgálata is. A gén-gén interakció (másnéven genetikai episztázis) fogalma nem új keletű, az eredeti megfogalmazás szerint az episztázis az a jelenség, amikor az egyik gén hatása elfedi a másikat. A populációs szinten megfogalmazott definíció a biológiai funkció helyett már inkább statisztikai jelleget ölt, az adott statisztikai modellben a gének additív hatásától való eltérést jelenti. A populációs szinten kimutatható kölcsönhatások azonban csak korlátozott szinten jelzik a háttérben zajló valós biológiai folyamatokat, viszont magyarázhatják a GWA vizsgálatok során talált asszociációk független mintán történő ismétlésének kudarcait. A statisztikai gén-gén interakciót vizsgáló tanulmányok potenciális célpontjai Crohn-betegség esetén elsősorban a *CARD15*, *ATG16L1*, *IL23R* gének valamint az IBD5 lókusz. 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, allélok kombinálódása 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.

### **Caspase activation recruitment domain containing protein 15 (CARD15)**

A veleszületett immunválasz kulcsfontosságú elemei azok a receptorok, melyek mikrobákhoz asszociált molekuláris mintázatokat ismernek fel, ide tartozik többek között a 23 receptort magába foglaló Nod-like receptor család (NLR) is. Ezek közül is kiemelkedik a NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2) fehérje, melynek egyes mutációi egyértelmű összefüggést mutatnak a Crohn-betegség kialakulásával. A NOD2 citoplazmatikus receptor ligandja a Gram+, illetve Gram- baktériumok sejt falát alkotó a muramil-dipeptid (MDP). 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 (NF $\kappa$ B) és a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitel aktiválásán keresztül proinflammatorikus citokinek (többek között TNF $\alpha$ , IL6 és IL1 $\beta$ ) termelését váltja ki. A Crohn-betegség patogenezise szempontjából fontos, hogy a receptor nemcsak fehérvérsejtekben, illetve endotélsejtekben és fibroblasztokban expresszálódik, de intesztinális epitélsejtekben, valamint a vékonybél Paneth-sejtjeiben is megtalálható. A NOD2 fehérjét a *CARD15* gén kódolja, mely a 16q12 kromoszómaregióban található. E 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 CD-vel való kapcsolat. A betegséggel a legszorosabb asszociációt mutató 1007fs frameshift mutáció rövidebb fehérjeterméket eredményez, aminek következtében a receptor rögzítése a plazmamembrán belső felszínéhez nem megfelelő. A *CARD15* variánsok a kaukázusi eredetű európai Crohn-betegek jelentős részében megtalálhatók, igaz az egyes népcsoportokban igen eltérő gyakorisággal fordulnak elő. Egyetlen *CARD15* mutáció hordozása a Crohn-betegség kialakulásának relatív kockázatát 2-4-szeresre, legalább két mutáció együttes jelenléte pedig már akár 15-40-szeresére is emelheti. Ezen variánsok hajlamosító hatása CD-specifikus, CU-ban nem találtak kapcsolatot. 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. A NOD2 működésének zavara nagy valószínűséggel az intesztinális immunhomeosztázis felborulásához vezet, ám ebben a *CARD15* variánsok pontos szerepe nem teljesen tisztázott.

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

### **Autophagy-related 16-like 1 (ATG16L1)**

Az autofágia alapvető, komplex sejtbiológiai folyamat, mely elsősorban a hosszú életidejű fehérjemolekulák, illetve a feleslegessé vált, előregedett sejtalkotók citoplazmából történő eltávolítását végzi. Az autofágia azonban nemcsak az intracelluláris homeosztázis fenntartásához, illetve a sejt túléléséhez nélkülözhetelen, éppúgy fontos szerepet játszik a különböző fejlődési és differenciációs folyamatokban is. 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. A (makro)autofágia folyamatának precíz végrehajtását az ATG (autophagy-related) proteinek összehangolt működése biztosítja, közülük az ATG16L1 fehérje modulátor funkciót lát el. Az ATG16L1 az ATG5 és ATG12 molekulákkal együtt komplexet képez, mely az autofág-rendszer membrán lokalizációjáért felel, illetve további fehérjékkel együtt az autofagoszóma-képzésben játszik kulcsszerepet. Az ATG16L1 proteint kódoló gén a 2q37.1 kromoszómaregióban található; e gén egy mutációját, a T300A szubsztitúciót (rs2241880) elsőként Hampe és munkatársai hozták összefüggésbe a Crohn-betegség kialakulásával 2007-ben; ezt követően a polimorfizmus és a CD-re való hajlam közti kapcsolat számos nemzetközi tanulmányban is szignifikánsnak bizonyult. Ez a variáns magyar betegekben szintén kockázati tényezőt jelent. Az ATG16L1 fehérje elsősorban a vékony- és vastagbél epitélisejtjeiben, fehérvérsejtekben, illetve a lépben expresszálódik. A vékonybélben található Paneth-sejtekben az antimikrobiális peptideket (pl.: defenzint) tartalmazó szekréciós granulumok exocitózisában játszik szerepet, az *ATG16L1* variánsra nézve homozigóta CD-betegek ileumából nyert szövetmintákban a Paneth-sejtek kóros morfológiát mutatnak.

### **Interleukin 23 receptor (IL23R)**

A Crohn-betegekben manifesztálódó szövetkárosodásért az adaptív immunitás túlzott reakciója tehető felelőssé. Régóta ismert az a tény, hogy CD-ben Th1 dominancia alakul ki, amely a gyulladásos folyamatoknak kedvez. A Th1 sejtek mellett a T-limfociták egy másik alpopulációja is fontos szerephez jut a betegség kialakulásában. A CD4<sup>+</sup> és CD25<sup>-</sup> Th17 limfociták legfőbb sajátossága az IL17 proinflammatorikus citokin termelése. A naiv T-sejtek Th17 irányba történő differenciálódását az IL23 és TGFβ citokinek egyidejű expressziója

váltja ki. Az elsősorban aktivált makrofágok, illetve dendritikus sejtek által termelt, p40 és p19 alegységekből felépülő IL23 a Th17 sejtek IL17-expresszióját fokozza. Az IL17A az epitél- és endotélsejteken, fibroblasztokon és a leukocitákon található sejtfelszíni receptorán keresztül további gyulladással mediátorok felszabadításával és a neutrofil granulociták aktiválásával vesz részt az immunválasz szabályozásában. Az immunreguláció érzékeny egyensúlyának megbomlása gyulladással és autoimmun betegségekhez vezet; az IL23/IL17 tengely éppen ezért kulcsfontosságú a krónikus gyulladással folyamatok kialakulásában. Az ileális dendritikus sejtek fokozott IL23 szekréciója indukált, T-sejt mediált colitises egérmodellben, illetve Crohn-betegekben szintén azt bizonyítja, hogy ez a citokin döntő szerepet játszik a betegség patogenezisében. 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 (IL12R $\beta$ 1, 19p13), míg a másik az IL23R-ra specifikus. Az *IL23R* és az *IL12R $\beta$ 2* gének közti szakaszon, illetve magában az *IL23R* génben található polimorfizmusok és a Crohn-betegség között elsőként Duerr és munkatársai 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) 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. A dolgozatban vizsgált rs1004819 és CD közti kapcsolatot Glas, illetve Einarsdottir kutatócsoport is igazolta. Magyar betegekben a – nemzetközi eredményekhez hasonlóan – az R381Q védő faktornak bizonyult, sőt, a gén 3'UTR régiójában található rs10889677 és az intronikus rs2201841 polimorfizmusok hajlamosító szerepét is sikerült bizonyítani.

#### **Citotoxikus T limfocita antigén 4 (CTLA4)**

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. A B7 molekulákat nagyobb affinitással kötő sejtfelszíni CTLA4 molekula a T-sejt aktiváció későbbi szakaszában jelenik meg és gátló jeleket továbbít a T-sejt számára. A CD28 és CTLA4 molekula a tímuszban érő timociták negatív szelekciójának szabályozásában is részt vesz: a CD28 kostimuláció az

autoreaktív CD4<sup>+</sup> T-sejtek klonális delécióját, míg a CTLA4 jelátvitel a timociták túlélését segíti elő. Az aktivált T-sejteken kívül a periférián található FoxP3<sup>+</sup> Treg sejtek jelentős része is expresszál CTLA4-t. A CTLA4 gátlása esetén állatmodellben szervspecifikus autoimmun betegségek, IBD és cukorbetegség idézhető elő. A CTLA4 fehérjét kódoló gén a 2q33.2 kromoszómarégióban található; az *ICOS*, *CTLA4* és *CD28* géncsoport tagja. A génnek több SNP-je is ismert, elsőként a leader peptid 17-es aminosav pozíciójában treonin-alanin szubsztitúcióval járó +49A/G mutációt azonosították. A vizsgált autoimmun betegségek túlnyomó részében a G allél, cöliákiában ugyanakkor az A allél esetén nő a betegség kialakulásának kockázata. A +49A/G mutáció Crohn-betegségben játszott szerepe nem tisztázott. Egy japán tanulmányban a GG genotípus hajlamosító hatását írták le, amely azonban kizárólag fisztulás betegek esetén volt szignifikáns, míg egy másik munkacsoport az A allél, illetve az AA genotípus esetén igazolt asszociációt. Holland, kínai, cseh és magyar betegpopulációt vizsgáló tanulmányok mind negatív eredménnyel zárultak. Számos esetben a +49 A/G mutáció hatását nem önmagában, hanem több más *CTLA4* variánssal együtt vizsgálják, illetve a kromoszómarégióban tapasztalható nagyfokú kapcsoltság miatt az *ICOS* és *CD28* génvariánsokkal alkotott haplotípus hatását mérik.

## **IBD5**

Az 5q31 régióban található nagyjából 250 kb kiterjedésű lókuszt – az ún. IBD5 rizikó haplotípus – és a Crohn-betegség között szignifikáns asszociáció áll fenn. Ebben a régióban számos, az immunológiai folyamatokat szabályozó – és így a betegség szempontjából érdekes – citokint kódoló gén található (pl.: *IL4*, *IL5*, *IL13*). 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. E markerek közül legnépszerűbbek az IGR2096a\_1, IGR2198a\_1 és IGR2230a\_1 polimorfizmusok.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Munkánk célja a nemzetközi, illetve hazai irodalom által leírt főbb hajlamosító lókusztok, így a *CARD15*, *ATG16L1*, *IL23R* gének, valamint az IBD5 lókuszt 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 lókuszt: 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.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **Vizsgált populáció**

Az Orvosi Genetikai Intézet biobankja a Nemzeti Biobank Hálózat tagjaként működik, valamint részét képezi az összeurópai Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI) programnak. Az általunk vizsgált Crohn-betegek mintái - melyek gyűjtése 2003 óta folyamatosan zajlik az Orvosi Genetikai Intézetben - az ország több pontjáról, így érkeztek. Szombathelyről, Zalaegerszegről, Pécsről, Békéscsabáról, Miskolcraól valamint Budapestről érkeztek. A vizsgálatba bevont személyek minden esetben beleegyeztek a genetikai analízisbe, mely etikai bizottsági engedély birtokában (ETT TUKEB), és az 1975-ös Helsinkai deklaráció alapelveinek megfelelően történt. Az *IL23R*, *ATG16L1*, *CARD15* gének és IBD5 lókuszt vizsgálata során 315 Crohn-beteg (151 férfi és 164 nő, átlagéletkor:  $38,7 \pm 0,79$  év) DNS mintáját genotipizáltuk, míg a *CTLA4* gén és IBD5 lókuszt analízisébe 305 Crohn-beteget (146 férfi és 159 nő, átlagéletkor  $38,7 \pm 0,80$  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. A kontroll csoportot random módon választott autoimmun betegségben nem szenvedő, egészséges véradók alkották. Az *IL23R*, *ATG16L1*, *CARD15* gének és IBD5 lókuszt vizsgálata során 314 kontroll személy (170 férfi és 144 nő, átlagéletkor  $40,8 \pm 0,80$  év) genotípusát határoztuk meg; a *CTLA4* gén és IBD5 variánsok analízisébe 310 kontroll személyt (169 férfi, 141 nő, átlagéletkor  $40,8 \pm 0,80$  év) vontunk be.

### **Genotipizálás**

Vizsgálatainkat EDTA-val alvadástgátolt perifériás vérből rutin kisózásos módszerrel izolált DNS mintákon végeztük el. A genotípusok meghatározásához (rs2066844 kivételével) PCR-RFLP vizsgálatot alkalmaztunk. Az amplifikációhoz általunk tervezett, specifikus primereket használtunk. A PCR termék detektálása gélelektroforézissel, 1,5%-os agaróz gélen, etidium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt. A módszerek tervezésénél, a restriktációs endonukleázok kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy valamennyi PCR

termék tartalmazzon egy, az emésztés hatékonyságának ellenőrzésére szolgáló obligát hasítóhelyet is. Az egyes DNS fragmentumok elkülönítése gélelektroforézissel, 3%-os agaróz gélen, etidium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt standard DNS létra mellett. Valamennyi általunk tervezett PCR-RFLP módszer specificitását direkt szekvenálással ellenőriztük, az rs2066844 variáns genotipizálását pedig kizárólag ezzel a technikával végeztük.

### Statisztikai módszerek

A genetikai kapcsoltság vizsgálatához, illetve a Hardy-Weinberg egyensúly teljesülésének ellenőrzéséhez Haploview 4.1 programot használtunk. A statisztikai analízist SPSS 15.0 programcsalád segítségével végeztük. Az egy-lókuszos analízis során az allélfrekvenciák összehasonlítása Pearson  $\chi^2$  próbával történt. Az egyes genetikai eltérések és a betegség közötti asszociáció feltárására korra és nemre korrigált bináris logisztikus regressziót alkalmaztunk. A két-lókuszos analízis során a génvariánsok kombinációinak vizsgálata előtt a genotípusokat annak megfelelően csoportosítottuk, hogy az egy-lókuszos vizsgálat során az adott polimorfizmus domináns vagy recesszív jelleget mutatott-e. A *CARD15* gén esetén létrehoztunk egy új kategóriát is (*CARD15* státusz), amit a következőképpen definiáltuk: a vizsgált személy *CARD15*–, 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  $\chi^2$  próbával végeztük (2x2 kontingencia tábla képzésével). 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), *CTLA4* normál+heterozigóta (GA+AA) 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, ehhez a Benjamini-Hochberg módszert alkalmaztunk (FDR=0,05).<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Az Eredmények c. fejezet adatai és a táblázatok 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 szövegben.



## EREDMÉNYEK

- 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. Megerősítettünk több korábbi hazai eredményt: a *CARD15* R702W és L1007fs, valamint az *ATG16LI* T300A hajlamosít a Crohn-betegség kialakulására a magyar populációban.
- III. Emelt mintaszámmal megerősítettük korábbi saját eredményeinket: az *IL23R* génben található rs2201841 variáns, valamint az IBD5 rizikó haplotípus részét képező IGR2198a\_1 és IGR2096a\_1 markerek a Crohn-betegség rizikófaktorának tekinthetők; míg a *CARD15* gén G908R mutációja, az IBD5 lókuszon 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, mégpedig a következő sorrendben: IGR2096a\_1, IGR2198a\_1, *ATG16LI* T300A, *IL23R* rs1004819, *CARD15* R702W, *CARD15* státusz, *CARD15* L1007fs és *IL23R* rs2201841
- V. A génvariánsok kombinálásánál a következő megállapításokat tettük:
  1. Az *ATG16LI* T300A mutáció homozigóta formában a *CARD15* R702W és L1007fs mutációktól független hajlamosító tényező. A magyar populációban rizikófaktort jelentő *CARD15* mutációk az *ATG16LI* 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 *ATG16LI* T300A homozigóta formában mindkét IBD5 marker esetén független hajlamosító tényező. Mindkét IBD5 variáns az *ATG16LI* genotípustól függetlenül emelte a betegség kialakulásának kockázatát, a kapott OR értékek az egy-lókuszos analízis eredményével megegyező mértékűek. Az *ATG16LI* T300A variáns a vizsgált IBD5 markerek egyikével párosítva magasabb kockázatot jelent a betegség kialakulására, mint önmagában vizsgálva.
  3. A két *IL23R* polimorfizmus és az *ATG16LI* mutáció kombinálása során különbséget találtunk: az *IL23R* rs2201841 CC homozigóta genotípus és az *ATG16LI* T300A

mutáció homozigóta formában egymástól függetlenül növeli a betegség kialakulására való hajlamot, együttes jelenlétük tovább emeli a CD kockázatát. Az *IL23R* rs1004189 mutáció kockázatonövelő hatása az *ATG16LI* T300A normál genotípus jelenlétében nem érvényesül, az *ATG16LI* homozigóta formája sem mutat szignifikáns asszociációt a betegséggel normál rs1004189 háttér mellett. Az *IL23R* rs1004189 és *ATG16LI* 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; az 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 lókuszt hatása sem érvényesül.
6. Az általunk vizsgált magyar Crohn-beteg populációban a *CARD15* gént és az IBD5 lókuszt egymástól független hajlamosító tényezőnek találtuk.
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.

**1. táblázat** Az *IL23R*, *ATG16LI* és *IBD5* genotípus-és allélfrekvenciái betegekbén és kontrollokban

	CD	Kontroll	OR (95% CI)*	P
<i>IL23R</i> (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
<i>IL23R</i> (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
<i>ATG16LI</i> 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
<i>CARD15</i> 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
<i>CARD15</i> 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
<i>CARD15</i> 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
<i>CARD15</i> státusz				
-	220 (69,8%)	262 (83,4%)		
+	95 (30,2%)	52 (16,6%)	2,17 (1,46-3,21)	<0,001
<i>IGR2198a_1</i> (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
<i>IGR2096a_1</i> (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.

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

	CD	Kontroll	OR (95% CI)*	P
<i>CTLA4</i> (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
<i>IGR2230a_1</i> (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
<i>IGR2198a_1</i> (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
<i>IGR2096a_1</i> (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.

**3. táblázat** *IL23R*, *ATG16L1*, *CARD15* és *IBD5* együttes vizsgálata: relatív OR értékek

	<i>IL23R</i> rs1004189		<i>IL23R</i> rs2201841		<i>ATG16L1</i>	
	GG	GA+AA	TT+TC	CC	AA+AG	GG
<i>CARD15</i> R702W						
CC	1	<b>1,56</b> (1,12-2,19)	1	<b>3,04</b> (1,67-5,57)	1	<b>1,57</b> (1,09-2,25)
CT+TT	<b>2,35</b> (1,03-5,34)	<b>3,18</b> (1,45-6,97)	<b>2,25</b> (1,26-4,03)	4,75 (0,53-42,81)	<b>2,20</b> (1,14-4,26)	<b>3,18</b> (1,11-9,08)
<i>CARD15</i> G908R						
GG	1	<b>1,51</b> (1,09-2,09)	1	<b>2,69</b> (1,49-4,86)	1	<b>1,51</b> (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)
<i>CARD15</i> L1007fs						
--	1	<b>1,57</b> (1,12-2,20)	1	<b>2,89</b> (1,57-5,32)	1	<b>1,54</b> (1,07-2,22)
-C+CC	<b>2,85</b> (1,28-6,35)	<b>3,40</b> (1,69-6,82)	<b>2,43</b> (1,42-4,18)	<b>8,52</b> (1,04-69,74)	<b>2,37</b> (1,29-4,34)	<b>4,27</b> (1,54-11,79)
<i>CARD15</i> státusz						
-	1	<b>1,50</b> (1,04-2,16)	1	<b>2,70</b> (1,42-5,15)	1	<b>1,54</b> (1,04-2,27)
+	<b>2,10</b> (1,17-3,76)	<b>3,33</b> (1,96-5,67)	<b>2,12</b> (1,42-3,16)	<b>9,15</b> (2,05-40,74)	<b>2,12</b> (1,35-3,31)	<b>3,82</b> (1,86-7,86)
<i>IGR2198a_1</i>						
GG	1	1,43 (0,80-2,53)	1	<b>4,83</b> (1,52-15,37)	1	1,71 (0,94-3,09)
GC+CC	1,45 (0,84-2,48)	<b>2,44</b> (1,43-4,15)	<b>1,58</b> (1,11-2,24)	<b>3,66</b> (1,81-7,41)	<b>1,60</b> (1,07-2,38)	<b>2,38</b> (1,46-3,87)
<i>IGR2096a_1</i>						
GG	1	1,55 (0,88-2,73)	1	<b>4,03</b> (1,39-11,62)	1	1,63 (0,91-2,92)
GT+TT	1,49 (0,87-2,56)	<b>2,41</b> (1,42-4,09)	<b>1,50</b> (1,06-2,13)	<b>3,71</b> (1,80-7,67)	<b>1,50</b> (1,01-2,24)*	<b>2,32</b> (1,42-3,79)
<i>ATG16L1</i>						
AA+AG	1	1,34 (0,92-1,95)	1	<b>2,67</b> (1,31-5,44)	-	-
GG	1,16 (0,68-1,99)	<b>2,51</b> (1,55-4,08)	<b>1,48</b> (1,03-2,14)	<b>4,68</b> (1,72-12,78)	-	-

**P<0,05**

\*Benjamini-Hochberg korrekció után nem szignifikáns érték

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

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

**P<0,05****5. táblázat** *CTLA4* és IBD5 együttes vizsgálata: relatív OR értékek

	IGR2230a_1		IGR2198a_1		IGR2096a_1	
	GG	GA+AA	GG	GC+CC	GG	GT+TT
<i>CTLA4</i>						
GA+GG	1	1,19 (0,76-1,87) <sup>#</sup>	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)	<b>1,86</b> (1,17-2,94)*	0,85 (0,48-1,51)	<b>1,74</b> (1,11-2,75)*

**P<0,05**

\*Benjamini-Hochberg korrekció után nem szignifikáns érték

**EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

A *CARD15* gén megismerése óta, az egész genomot lefedő kapcsoltsági és asszociációs vizsgálatok, illetve nagyméretű metaanalízisek során számos további lókuszt kapcsolatát is igazolták a Crohn-betegség kialakulásával, így ma már közel 140, a betegség kialakulásának kockázatát befolyásoló lókuszt ismerünk. Az egyes potenciális lókuszt vizsgálatában azonban önmagában nem elégséges, a gének közötti interakcióval – amely a komplex betegségek genetikai architektúrájának alapvető velejárója – 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.

***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 CD

beteg és 368 kontrollt tartalmazó német mintacsoportban. Az *ATG16L1* GG genotípus nemcsak, hogy rizikófaktornak bizonyult a vizsgált *CARD15* mutációk hiányában, hanem a *CARD15* magas kockázatot jelentő összevont csoportjában is nagyobb OR értéket tapasztaltak az *ATG16L1* G allél jelenlétében az alacsony kockázattal bíró genotípusokhoz (vad típusúak valamint heterozigóták) viszonyítva. Prescott tanulmányában - bár az *ATG16L1* a *CARD15* státusztól függetlenül is fokozta a CD kialakulására való hajlamot - a T300A G allél frekvenciája magasabbnak bizonyult a *CARD15* hordozó csoportban a *CARD15* negatív csoporthoz képest, ami a két lókuszt közt gyenge interakció jeleként is felfogható. Egy, az újzélandi CD populációt vizsgáló kutatócsoport mindamelllett, hogy megerősítette az *ATG16L1* GG genotípus *CARD15*-től független hajlamosító szerepét, a két lókuszt additív hatásáról is beszámolt. Gyermek betegek mintáinak vizsgálata során Lacher és munkatársai nem találtak episztatikus interakciót az *ATG16L1* és *CARD15* gének között, a hajlamosító allélok együttes hordozása esetén azonban a betegség kockázata megemelkedett. Több, a két gén közötti statisztikai interakciót vizsgáló tanulmány végződött negatív eredménnyel. Büning és munkatársai német és holland betegpopuláció mellett 147 magyar, Szegeden gyűjtött Crohn-beteg mintáit is elemezték, a T300A és a *CARD15*+ státusz között azonban nem volt nyoma statisztikai interakciónak az egyes vizsgált populációkban, illetve azok egyesítése után sem. Az általunk vizsgált 315, az ország több régiójából származó beteg mintájának feldolgozása során megerősítettük az *ATG16L1* T300A variáns valamint az R702W és L1007fs mutációk egymástól független hajlamosító szerepét. Eredményeink szerint ugyanakkor magyar populációban rizikófaktort jelentő *CARD15* mutációk az *ATG16L1* gén vizsgált variánsával együtt 3-4-szeresére emelik a betegség kialakulásának esélyét. A két gén közötti kapcsolatot a fehérjeszintű vizsgálatok is valószínűsítik. A NOD1 és NOD2 fehérjék mint intracelluláris szenzorok fontos szerepet játszanak az invazív baktériumok által előidézett autofág folyamatokban; a baktériumok bejutási helyén az ATG16L1 fehérjével együtt a sejtmembrán citoszolikus oldalán kolokalizálódnak és közreműködnek az autofagocitózis elindításában. 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. Egy másik kutatócsoport eredményei szerint a NOD1 és NOD2 – a RIP2 molekulától és az NF- $\kappa$ B 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. Homer és munkatársai kísérleteik során szintén funkcionális interakciót tártak fel a két gén között: az autofágia útvonal különböző lépéseinek szelektív gátlásával csökkent NOD2 jelátvitel-aktivációt értek el, az *ATG16L1* iRNS-vel történő gátlása szintén sérült NF $\kappa$ B 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 TNF $\alpha$  szekréción, a NOD2 jelátviteli folyamatokban, az autofágia mértékét és dinamikáját illetően sem. Humán eredetű vastagbél epitélisejtekben ugyanakkor a T300A variáns a NOD2 funkció kiesését idézte elő. Plantinga és munkatársai kimutatták, hogy a T300A variánst hordozó betegekből izolált PBMC-k fokozott mennyiségben termelik az IL1 $\beta$  és IL6 proinflammatorikus citokineket NOD2 liganddal történő stimulálás hatására, ezzel egyidejűleg a NOD2 által mediált autofagoszóma-képződés is lecsökken. A normál fehérje jelenlétében tehát az autofágia irányába, mutáció esetén a RIP2 jelátviteli út felé terelődik az egyensúly, aminek következtében az IL1 $\beta$  mRNS transzkripció szintje végül megemelkedik, ezért a szerzők a NOD2 jelátvitelben az *ATG16L1* modulátor szerepét hangsúlyozzák. A proinflammatorikus citokin fokozott szekrécója magyarázatot adhat a gyulladás kialakulására Crohn-betegekben, másrészt viszont a 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 lókuszt közti statisztikai interakciót vizsgáló nemzetközi tanulmányok mind negatív eredménnyel zárultak: az *ATG16L1* mutáció az IGR2096a\_1 markertől, az *SLC22A4* C1672T és *SLC22A5* G-207C génvariánsoktól, illetve az ezek által alkotott IBD5 haplotípustól függetlenül növeli a Crohn-betegség kialakulásának kockázatát. Az általunk vizsgált betegpopulációban az *ATG16L1* T300A homozigóta formában mindkét IBD5 marker esetén szintén független hajlamosító tényezőnek bizonyult, 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 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. Roberts a T300A és az *IL23R* védő hatású ritka variánsa, az R381Q közötti interakciót vizsgálta új-zélandi betegek és kontrollok mintáin, és a két gén egymástól független hatását erősítette meg. Cotterill kutatócsoportja egy nagy volumenű meta-analízisében szintén ugyanezt a párosítást elemezte, a statisztikai interakció vizsgálata azonban ebben az esetben is negatív eredménnyel zárult. Glas és csoportja szintén nem talált interakciót az *ATG16L1* T300A, valamint a 10 legismertebb *IL23R* variáns – így az R381Q, rs1004189 és rs2201841 – analízise során. Magyar Crohn-betegekben Lakatos és munkatársai bár vizsgálták a T300A és R381Q variánsokat, ám a tanulmány nem terjedt ki a két gén közti statisztikai interakció vizsgálatára. 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 a 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 a T300A normál genotípus jelenlétében egyáltalán nem érvényesült, sőt a 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-lókuszos 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 R381Q variáns az, amelyet a *CARD15* három mutációjával együtt vizsgáltak, szignifikáns interakciót azonban nem találtak köztük. Roberts és munkatársai által feldolgozott új-zélandi mintacsoportban az R381Q variáns ugyan a *CARD15* mutációktól függetlenül fokozta a betegség kialakulásának kockázatát, de ez a hatás csak a vad típusú *CARD15* genotípus mellett volt megfigyelhető.



Mivel az R381Q a legmagasabb OR értéket a *CARD15* magas rizikójú genotípusának jelenlétében adta, ezért a munkacsoport az R381Q és *CARD15* között additív hatást feltételezett. Cummings az *IL23R* nyolc variánsát vizsgálta a *CARD15* génnel párosítva, de nem talált statisztikai interakciót a két gén között. Az *IL23R* rs1004819 variánsa és a *CARD15* gén közti interakciót vizsgáló tanulmány szintén negatív eredménnyel zárult. 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 nagyobbak adódott; míg a legnagyobb OR értéket a pozitív *CARD15* státusz és az rs2201841 együttes vizsgálata során kaptuk. Érdekes módon az rs2201841 és az R702W kombináció esetén nem találtunk szignifikáns asszociációt a betegség megjelenésével a referencia genotípus kombinációhoz viszonyítva.

### ***IL23R* és *IBD5***

Az *IL23R* gén és az *IBD5* lókuszt 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. Okazaki az *IL23R* rs10889677 és az IGR2230\_a1 variánsok között ugyan nem talált szignifikáns interakciót, de erre utaló tendenciát igen. Cummings és munkatársai az *IL23R* gén és az *IBD5* lókuszt közti interakció vizsgálata során az rs11209026 variáns kivételével - amely az *OCTN1/2* TC haplotípustól független védőfaktorak bizonyult - szinte valamennyi vizsgált *IL23R* variáns (többek között az rs1004819 és rs2201841) csak pozitív *IBD5* háttér mellett mutatott szignifikáns asszociációt a betegséggel. 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* lókuszt hatása sem érvényesült.

### ***IBD5* és *CARD15***

Az *IBD5* és *CARD15* gének közti lehetséges interakció felderítésére irányuló kutatások már az ezredforduló táján elindultak. Mirza kutatócsoportja 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* variánsal rendelkeztek. Gazouli eredményei szerint a *CARD15* gén és az *OCTN1/2* TC haplotípus együtt emeli a Crohn-betegség kialakulásának kockázatát, más vizsgálatok viszont nem találtak szignifikáns kapcsolatot sem a TC haplotípus, sem más IBD5 variánsok esetén. Az általunk vizsgált magyar Crohn-beteg populációban a *CARD15* gén és az IBD5 lókuszt független hajlamosító tényezőnek bizonyult. 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. Hradsky ugyan nem talált szignifikáns kapcsolatot a +49 A/G variáns és Crohn-betegség kialakulása között, az általa vizsgált többi *CTLA4* polimorfizmus, illetve az azok által alkotott haplotípus a *CARD15* L1007fs mutáció jelenlétében, valamint adott *IL23R* háttér mellett (R381Q) egyaránt védő hatásúnak bizonyult. Tanulmányában 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-lókuszt 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-lókuszt, és magas kockázattal járó genotípus kombinációk**

Irodalmi adatok szerint *ATG16L1*, *CARD15* és IBD5 lókuszon homozigóta genotípus kombinációja azonban a normál genotípushoz képest mintegy 20,4-szeresére (95% CI: 8.71-47.7) emeli a betegség kialakulásának kockázatát. Weersma az *ATG16L1*, *IL23R*, *CARD15*, IBD5 és *DLG5* lókusztok kombinált analízise során a hajlamosító allélek számának növekedésével a betegség kockázatának emelkedését mutatta ki. Az askenázi zsidó populációban a kontrollcsoporthoz képest a *NOD2*, *IL23R*, *IRGM* és *PTGER4* hajlamosító allélok száma CD-ben magasabbnak. A több lókuszt egyidejű vizsgálatának legfontosabb korlátja a megfelelő mintaszám elérése. Jelen dolgozatban – a magyar viszonylatban magasnak tekinthető, de statisztikai szempontból viszont alacsony mintaszám miatt – ugyan

nem volt lehetőség kettőnél több lókuszt kombinálására, a külföldi eredmények alapján érdemes volna emelt mintaszámmal a magyar populációban is felderíteni a magas kockázatot jelző genotípus kombinációkat.

## PUBLIKÁCIÓK

### Értekezés alapjául szolgáló közlemények (IF: 4,477)

1. **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyarai L, Polgár N, Bene J, Sarlós P, Lakner L, Baricza E, Szabó M, Rappai G, Melegh B. (2011) Interaction between CTLA4 gene and IBD5 locus in Hungarian Crohn's disease patients. *Int J Colorectal Dis* 26: 1119-1125. **IF: 2,385**
2. **Csöngei V**, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyarai L, Faragó B, Bene J, Polgár N, Lakner L, Sarlós P, Varga M, Melegh B. (2010) Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol* 16: 176-183. **IF: 2,092**

### Egyéb közlemények (IF: 51,823)

1. Kovacs T, **Csongei V**, Feller D, Ernszt D, Smuk G, Sarosi V, Jakab L4, Kvell K, Bartis D, Pongracz JE. Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence. *Aging Cell*. Elfogadott közlemény.
2. Sarlos P, Varszegi D, **Csongei V**, Magyarai 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).
3. 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).
4. 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**
5. Varcza 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**
6. 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**
7. 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**
8. Járomi L, **Csöngei V**, Polgár N, Rappai G, Szolnoki Z Maász A, Horvatovich K, Sáfrány E, Sipeky C, Magyarai 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**

9. 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**
10. Polgár N, Járomi L, **Csongei V**, Maász A, Sipeky C, Sáfrány E, Szabó M, Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALT2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 17: 1033-1039 (2010). **IF: 2,510**
11. Mohás M, Kisfali P, Járomi L, Maász A, Fehér E, **Csongei 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**
12. Járomi L, **Csongei V**, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyar 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**
13. 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**
14. 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**
15. Sáfrány E, Pazár B, **Csongei 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**
16. Lakner L, **Csongei V**, Sarlós P, Járomi L, Sáfrány E, Varga M, Orosz P, Magyar 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**
17. Lakner L, **Csongei V**, Magyar 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).
18. Horvatovich K, Orkényi M, Bíró E, Pongrácz K, Kisfali P, Talián G, **Csongei 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).
19. Faragó B, Magyar L, Sáfrány E, **Csongei 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**

20. 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**
21. Sáfrány E, **Csöngéi V**, Járomi L, Maász A, Magyarai L, Sipeky C, Melegh B. [Mitochondrial DNA and its mutations: new advances in a new field]. *Orv Hetil* 148: 971-978 (2007).
22. Maász A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohás M, Markó L, **Csöngéi V**, Faragó B, Járomi L, Magyarai 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**
23. Magyarai L, Bene J, Komlósi K, Talián G, Faragó B, **Csöngéi 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**
24. Engelmann P, Kiss J, **Csöngéi 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**