

# **Unraveling the molecular genetic aspects of intestinal inflammatory disorders**

**Proefschrift van A.J. Wijmenga-Monsuur, te verdedigen op 3 juli 2007, om 14:30, te Utrecht**

## **Samenvatting**

Coeliakie is een complexe, multifactoriële genetische aandoening die vóórkomt bij ongeveer 1% van de bevolking. De belangrijkste omgevingsfactor is gluten, een groep eiwitten die voorkomen in tarwe, gerst en rogge. De reactie van het immuunsysteem tegen gluten leidt tot een vernietiging van het oppervlak van de dunne darm. Hierdoor zijn patiënten niet in staat voldoende voedingsstoffen op te nemen. Zij vertonen daardoor aan een scala aan symptomen die samenhangen met ondervoeding. Lang werd verondersteld dat de symptomen van coeliakie uitsluitend werden veroorzaakt door schade aan de darmen, maar tegenwoordig is bekend dat ook andere organen worden aangetast. De enige behandeling voor coeliakiepatiënten is een levenslang glutenvrij dieet dat het darmoppervlak de kans geeft te herstellen.

Naast deze omgevingsfactor zijn ook genvarianties betrokken bij de ziekte. Hiertoe horen algemene variaties die voorkomen in de hele bevolking. Coeliakiepatiënten hebben óf een verkeerde combinatie óf teveel van deze varianten, wat bij hen leidt tot ontwikkeling van de ziekte. De HLA-DQA1 en -DQB1 genen vormen samen een eiwit dat door het immuunsysteem gebruikt wordt om binnengedrongen bacteriën of virussen te herkennen en te presenteren aan andere cellen van het immuunsysteem die deze indringers vervolgens opruimen. Deze genen bevatten meerdere variaties, waardoor eiwitten gevormd worden die verschillende bacteriën en virussen kunnen presenteren. Sommige van deze varianten vormen de DQ2.5 en DQ8 eiwitten, welke een speciaal talent hebben: deze zijn in staat gluten te presenteren aan het immuunsysteem. Indien gluten op deze manier gepresenteerd worden zal het immuunsysteem reageren alsof gluten een bedreiging tegen het lichaam vormen. Vrijwel alle coeliakiepatiënten hebben de DQ2.5 of de DQ8 eiwitten en zullen ziek worden indien zij gluten eten. Echter, meer dan 25% van de gehele bevolking bezit ook één van deze varianten, zonder daardoor coeliakie te ontwikkelen. Blijkbaar is het drager zijn van de DQ2.5 of DQ8 variant niet voldoende om ziek te worden. Coeliakiepatiënten zijn waarschijnlijk dragers van andere genvarianten, die samen met DQ2.5 en DQ8 coeliakie veroorzaken. Het zoeken naar sommige van deze genen en varianten was het belangrijkste onderzoeksdoel van dit proefschrift. Het is echter waarschijnlijk dat er nog veel meer varianten gevonden moeten worden.

## **Enzymen in de darmen**

Gluten zijn moeilijk verteerbare eiwitten omdat de meeste enzymen die eiwitten uit voedsel voor vertering knippen in kleinere delen niet in staat zijn om gluten te verwerken. Wij dachten dat coeliakiepatiënten wellicht varianten hebben van de specifieke glutenverterende enzymen die niet efficiënt zijn in de verwerking van gluten. We hebben gezocht naar verschillen tussen patiënten en een gezonde controlegroep voor twee van deze enzymen, pyroglutamyl-peptidase I (PGPEP1) en prolyl endopeptidase (PREP), maar wij vonden geen verschillen in de genen of in de functie van de gevormde eiwitten. Ondanks het feit dat wij geen concreet bewijs hebben kunnen vinden voor de betrokkenheid van deze genen in de gevoeligheid voor coeliakie moeten we hun rol ook niet onderschatten. Een van de enzymen, PREP, wordt ook aangetroffen in sommige bacteriën. Op dit moment wordt onderzocht of de toevoeging van dit enzym aan het dieet van een patiënt ertoe kan bijdragen dat gluten al voordat zij de dunne darm binnenkomen in zulke kleine delen geknipt zijn dat het immuunsysteem er niet langer op reageert.

## **Genen betrokken bij de darmbarrière**

Nadat we gekeken hebben naar de processen in de holte van de dunne darm hebben we ook gezocht naar genen die werkzaam zijn op de celwand die de scheiding vormt tussen het lichaam en de darmholte. Onze zoektocht was niet direct gericht op deze barrière, maar werd hier naartoe getrokken door de resultaten die we vonden. We zochten in het bij coeliakie betrokken gebied op 19p13.1 (de 'linkage' regio genaamd MYO9B, het voormalige CELIAC4) naar een gen betrokken bij coeliakie. Gebruikmakend van een eerste cohort van patiënten en controles vonden we een associatie met het gen myosine IXB (MYO9B), waar we al enig bewijs voor hadden en welke ook direct onder de top van de linkage regio gelocaliseerd was. Met behulp van een tweede cohort konden we deze resultaten repliceren, waarbij een p-waarde van  $2,1 \times 10^{-6}$  gevonden werd voor de gecombineerde cohorten. MYO9B kan ongeveer 25% verklaren van de genetische achtergrond van coeliakie, wat opgeteld kan worden bij de 40% die verklaard wordt de HLA-DQA1 en -DQB1 genen. Er is weinig bekend over de werking van MYO9B, maar, gebaseerd op de literatuur en onze

kennis van coeliakie, stellen wij dat dit gen betrokken is bij de vergroting van de doorlaatbaarheid van de darmwand.

De vondst van dit gen vergrootte onze kennis over coeliakie in meerdere opzichten. MYO9B was het eerste gen dat gevonden werd sinds de ontdekking van de betrokkenheid van de HLA genen bij coeliakie (naast het zwakke bewijs voor het CTLA-4 gen). In het begin was het meeste onderzoek gericht op het zoeken naar genen met een functie die interessant kon zijn vanuit het oogpunt van de ziekte, maar waarbij een kans bestond op het over het hoofd zien van genen met onbekende functies of genen met functies die we nooit in overweging hadden genomen voor coeliakie. MYO9B werd gevonden door gebruikmaking van een genoombrede aanpak die geen rekening hield met functies. De identificatie van MYO9B leidde bij ons tot een breder denkkader en tot onze hypothese dat MYO9B betrokken is bij de vergroting van de doorlaatbaarheid van de darmwand. We zoeken nog steeds naar een bevestiging van dat MYO9B ook betrokken is bij coeliakie in andere populaties. Met onze nieuwe kennis over MYO9B en complexe genetische aandoeningen in het algemeen, besloten we om te bezien of MYO9B ook betrokken was bij andere darmaandoeningen. Dit leidde ertoe dat MYO9B ook werd geïdentificeerd als een factor voor colitis ulcerosa ( $p$ -waarde =  $1.9 \times 10^{-6}$ ; OR = 1.2). Dit werd bevestigd in andere populaties. Hoe MYO9B betrokken is bij de vergroting van de doorlaatbaarheid van de darmwand is onbekend. Mogelijk heeft het invloed op de zonula occludens (tight junction). Op basis hiervan vroegen wij ons af of genen die de zonula occludens vormen of invloed hebben op de werking ervan betrokken zijn bij coeliakie en chronische inflammatoire darmziekten (CID; een verzamelnaam voor de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa). We waren in staat om aan te tonen dat twee van deze genen, een rol spelen in de gevoeligheid voor coeliakie en colitis ulcerosa. Daarmee hebben we nu genen gevonden die betrokken zijn bij lichaamsfuncties die we niet eerder in ogenschouw hadden genomen en waren we in staat om aan te tonen dat er een gedeelde genetische achtergrond bestaat voor coeliakie en colitis ulcerosa.

### **Genen betrokken bij de immuunreactie**

Sommige darmaandoeningen laten een overlap zien tussen linkage regio's en een overlap tussen de betrokken biologische netwerken. Wij besloten deze informatie te gebruiken in onze zoektocht naar de hierbij betrokken genen. Het immuunsysteem speelt een rol bij zowel coeliakie als CID, en deze ziekten delen enkele linkage regio's. We onderzochten het hele 250 kb gebied op chromosoom 5q31, waarvoor al eens een associatie met CID is aangetoond, en we kozen ook een aantal immuungerelateerde genen in de regio op chromosoom 19, maar we vonden geen overtuigende associatie

### **Een nieuwe HLA testmethode**

Als laatste besloten we om de diagnostische testmethodes voor de bekende HLA varianten te verbeteren. Deze genen zitten in een gebied met een groot aantal varianten, wat het moeilijk maakt om te bepalen welke varianten de betrokken persoon bezit en om screening hiervoor mogelijk en betaalbaar te maken (wat behulpzaam kan zijn voor het stellen van de diagnose coeliakie, of om coeliakie uit te sluiten). We wisten dat er andere, eenvoudiger aan te tonen varianten in het gebied lagen en dat sommige van deze varianten altijd samen overerven, bijvoorbeeld met DQ2.5. Wij zochten naar deze varianten en testten of een of meer van deze varianten precies konden voorspellen of een persoon drager was van DQ2.5. Dit hebben we ook gedaan voor DQ2.2, DQ7 en DQ8, welke alle varianten zijn van de HLA-DQA1 en -DQB1 genen en welke alleen of in combinatie gevoeligheid voor coeliakie veroorzaken. Gebruikmakend van deze methode vonden we dat slechts zes 1-basepaarvarianties (*single nucleotide polymorphisms*, SNP's) nodig zijn om de DQ2.2, DQ2.5, DQ7 en DQ8 risicovarianten te voorspellen die voorkomen bij meer dan 95 procent van de coeliakiepatiënten. Voor deze voorspellende benadering vonden we een gevoeligheid  $>0,968$ , een specificiteit  $>0,994$  en een voorspellende waarde  $>0,940$ . Onze methode is eenvoudig en kostenefficiënt en kan daardoor worden gebruikt voor het screenen van familieleden van coeliakiepatiënten of zelfs van hele populaties.

### **Discussie**

De zoektocht naar genen die betrokken zijn bij coeliakie is moeizaam omdat we niet verwachten mutaties te vinden, welke eiwitten veranderen, maar genetische variaties die de werking van eiwitten wijzigen en die ook in de gewone populatie aangetroffen worden. Daarnaast verschillen coeliakiepatiënten van elkaar in het soort varianten waarvan zij drager zijn (genetische heterogeniteit). Het gebruik van gezamenlijke overerving van varianten kan ook helpen bij het opsporen van de varianten zonder dat er voor alle varianten in het genoom getest moet worden. Echter, gezamenlijke overerving kan verhullen welke genvarianten de

ware variant zijn die voor de gevoeligheid verantwoordelijk is. Hierdoor weten we nog steeds niet welke variant van MYO9B de ware is. De varianten die worden gebruikt voor genetische testen verschillen tussen populaties in allelfrequentie, wat leidt tot fout-positieve of fout-negatieve resultaten als de geteste patiëntengroep en de controlegroep niet goed op elkaar afgestemd zijn. De moeilijkheid van het repliceren van de associatie tussen MYO9B en coeliakie is ook door ons beschreven en we beredeneren waarom een combinatie van genetische heterogeniteit, het niet testen van de werkelijke gevoelige variant en het gebruik van te kleine cohorten oorzaak kan zijn van de negatieve uitslagen van de replicatiestudies.

### **Belangrijkste resultaat**

Ons belangrijkste resultaat is het aantonen van betrokkenheid van MYO9B in de genetica van coeliakie en colitis ulcerosa. We toonden ook aan dat twee zonula occludensgenen, MAGI2 en PARD3, betrokken zijn bij coeliakie en colitis ulcerosa. Onze hypothese is dat deze genen de doorlaatbaarheid van de darmwand vergroten. Hierdoor verandert mogelijk de route die gluten het lichaam binnenleidt, wat een andere respons van het immuunsysteem veroorzaakt. Deze nieuwe kennis leidt niet direct tot een nieuwe behandelmethodiek maar zou zeer behulpzaam kunnen zijn bij de zoektocht hiernaar. We hebben laten zien dat verschillende darmaandoeningen een genetische achtergrond delen en dat dit kan leiden tot de identificatie van nieuwe genen betrokken bij deze ziekten. Toekomstig onderzoek is noodzakelijk om de andere bij coeliakie betrokken genen te vinden en om de biologische rol van en de interactie tussen deze genen te achterhalen. Daarom is het van belang de cohorten van patiënten en controles te vergroten en om samen te werken met andere onderzoeksgroepen die beschikken over grote cohorten voor replicatiestudies. Als laatste is het aan te bevelen de informatie die we over individuen in de cohorten hebben uit te breiden zodat stratificatiestudies mogelijk worden en waardoor subgroepen patiënten gevonden kunnen worden met specifieke varianten van de ziekte die niet voorkomen bij andere patiëntgroepen.

Dit onderzoek vond plaats onder leiding van Prof. Dr. C. Wijmenga, binnen de Sectie Complexe Genetica van de Afdeling Biomedische Genetica, Universitair Medisch Centrum Utrecht en binnen de Onderzoeksschool voor ontwikkelingsbiologie. Het project werd financieel gedragen door het NWO (grant 912-02-028), en het Celiac Disease Consortium, een Innovatief Cluster goedgekeurd door het Nederlands Genomics Initiatief en gedeeltelijk gesponsord door de Nederlandse Overheid (grant BSIK03009).