

**AZ 5Q31 KROMOSZÓMA LOCUS IBD5  
RÉGIÓJÁNAK SZEREPE COLITIS ULCEROSA  
ÉS CROHN-BETEGSÉG KIALAKULÁSÁBAN  
MAGYAR POPULÁCIÓS MINTÁKBAN**

**PhD értekezés tézisei**

**Dr. Lakner Lilla**

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

**Témavezető: Dr. Melegh Béla**

**2010.**

**Pécs**

## Bevezetés

A colitis ulcerosa és a Crohn-betegség a bélrendszer idiopathiás krónikus gyulladással megbetegedése. Míg colitis ulcerosa esetén a gyulladás kizárólag a vastagbelet érinti, Crohn-betegségben a szájtól az anusig a tápcsatorna bármely részére kiterjedhet. Crohn-betegség kialakulásakor leggyakoribb a vékony- és vastagbél együttes érintettsége (40-55%). Az esetek 30-40%-ában csak a vékonybél, míg 15-25%-ban csak a vastagbél érintett. A felső gasztrointesztinális lokalizáció viszonylag ritka.

Mind a colitis ulcerosa, mind a Crohn-betegség multifaktoriális kórképek, melyek kifejlődésében fontos szerepet tulajdonítunk a környezeti tényezőknek, immunológiai és genetikai faktoroknak egyaránt.

A családvizsgálatok azt mutatják, hogy a családi anamnezisben szereplő gyulladással megbetegedések az egyik legkifejezettebb rizikófaktor a betegség kialakulása szempontjából. A Crohn-betegség elsőfokú rokonaiban ugyanezen betegség kialakulása 2,2-16,2%-ban, IBD kialakulása 5,2-22,5%-ban, míg colitis ulcerosa esetén ugyanezen betegség 5,7-15,5%-ban, IBD kialakulása 6,6-15,8%-ban várható.

A gyulladással megbetegedések előidézésében a genetikai tényezők szerepe nagyon fontos, azonban egyik kórkép sem vezethető vissza egyetlen genetikai variánsra. A teljes genomot felölelő vizsgálat („genome wide screening”) és a „linkage map” technika elterjedése az IBD-vel összefüggésbe hozható genom részletek vizsgálatában különösen informatív módszerek bizonyultak.

Az 5q31 kromoszóma IBD5 régiójának szerepét az IBD kialakulásában számos szerző tanulmányozta. Az IBD5 régióban helyezkednek el a karnitin és más organikus kationok kétirányú transzportjért felelős, az organikus kation transzporter (OCTN) 1 és 2 fehérjéket kódoló gének (SLC22A4 és SLC22A5). Az SLC22A4 variáns allél az organikus kation transzportfunkció fokozódásával jár együtt, míg az SLC22A5 allél esetén a gén promoterének hő-sokk fehérjék által kiváltott aktivációja változik meg.

Peltekova és munkatársai az 5q31 régióban írták le a TC haplotípust, melyet az SLC22A4 gén C1672T (rs1050152) és az SLC22A5 gén G-207C (rs2631367) polimorfizmusa határoz meg. A munkacsoport igazolta, hogy ezen haplotípus Crohn-betegség kialakulására hajlamosít. Silverberg és munkatársai egy nagyobb populációt vizsgálva az 5q31 régió egyéb funkcionális variánsainak szerepét tanulmányozták. Genetikai összefüggést találtak az IBD és az IGR2096a\_1 (rs12521868), valamint az IGR2198a\_1 (rs11739135) locusok között.

## **A vizsgálat célkitűzései**

Munkánk célja az IBD5 régió szerepének vizsgálata colitis ulcerosa és Crohn-betegség esetén magyarországi populációban. Az IGR2096a\_1 (rs12521868), IGR2198a\_1 (rs11739135), IGR2230a\_1 (rs17622208) genetikai variánsok, valamint az SLC22A4 (rs1050152), SLC22A5 (rs2631367) genetikai variánsok IBD-re hajlamosító szerepének tanulmányozását tűztük ki célul.

Arra kerestünk választ, hogy vajon a magyar népességben az OCTN1, OCTN2 genetikai variáns, illetve a Peltekova és munkatársai által leírt TC haplotípus-e a meghatározó az idiopathiás gyulladós bélbetegség kialakulásában vagy nagyobb szerepe van a Silverberg és munkatársai által vizsgált egyéb minor alléleknek. Ennek vizsgálata céljából az IGR2096a\_1, az IGR2198a\_1, valamint az IGR2230a\_1 genetikai variánsokat választottuk ki és vizsgáltuk.

## **Betegek és módszerek**

Vizsgálatunkat magyarországi colitis ulcerosás és Crohn-beteg populáción végeztük, mely gyakorlatilag az egész ország lakosságát reprezentálja. A minták gyűjtésének színhelyei Békéscsaba, Budapest, Miskolc, Pécs, Szombathely, Zalaegerszeg voltak. Genetikai adatbankunk az országos genetikai adatbank részét képezi.

Az IGR2096a\_1, IGR2198a\_1, SLC22A4, SLC22A5 vizsgálatához 217 Crohn-beteg (101 férfi, 116 nő, átlagéletkor  $39,5 \pm 1,0$  év), valamint 252 colitis ulcerosás beteg (110 férfi, 142 nő, átlagéletkor:  $46,7 \pm 1,0$  év), míg az IGR2230a\_1 vizsgálatához 200 Crohn-beteg (97 férfi, 103 nő, átlagéletkor  $39,4 \pm 1,1$  év), valamint 246 colitis ulcerosás beteg (108 férfi, 138 nő, átlagéletkor  $44,0 \pm 1,1$  év) mintáját dolgoztuk fel. A Crohn-betegek és colitis ulcerosások típusos klinikai tünetekkel rendelkeztek, a diagnózis minden esetben a klinikai kép, endoscopos és szövettani vizsgálat alapján történt.

Kontrollként 290 klinikailag egészséges egyén (159 férfi, 131 nő, átlagéletkor  $40,0 \pm 0,8$  év), az IGR2230a\_1 vizsgálata esetén 187 egyén (106 férfi, 81 nő, átlagéletkor  $37,7 \pm 0,8$  év) szolgált. A vizsgálat alanyai minden esetben írásban beleegyeztek a genetikai vizsgálatba. A vizsgálat etikai bizottsági engedély birtokában (ETT TUKEB) és az 1964-es Helsinkii deklaráció alapelveinek megfelelően történt.

A betegbevonás helyszínén a megelőzőleg szövettani mintavétellel egybekötött colonoscopia során igazolt colitis ulcerosás, illetve ileo-colonoscopia és vékonybél röntgen vizsgálattal igazolt Crohn-betegtől vérvétel történt EDTA-t tartalmazó csőbe.

A DNS izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük kisózásos módszerrel. Az egyes variánsok analízisének kiindulópontja a polimeráz láncreakció (PCR) útján végzett

DNS amplifikáció volt, amelyet az IGR2096a\_1 rs12521868, IGR2198a\_1 rs11739135 és SLC22A5 rs2631367 mutációk esetén RFLP módszer követett, míg az SLC22A4 rs1050152 variáns meghatározását direkt szekvenálással végeztük ABI 3100 automata szekvenáló készüléken.

PCR reakciók során a következő, általunk tervezett specifikus primer párokat alkalmaztuk:

**IGR2096a\_1 rs12521868 variáns** esetén a forward primer:

5'-CAAGATTTCTGCCATAGCCTCCT-3',

a reverse primer:

5'-GGAGGGTGGTGTAGCCAGAGTAG-3';

**IGR2198a\_1 rs11739135 variáns** esetén a forward primer:

5'-AGACACTGGGACATCATCTGTCTG-3',

a reverse primer:

5'-GGGCAATTCTATGAGGACATTTAGA-3';

**SLC22A5 gén rs2631367 variánsa** esetén a forward primer:

5'-GCCGCTCTGCCTGCCAGC-3',

a reverse primer:

5'-GGTCGCTATCAGGAACACGGAGGA-3';

**SLC22A4 gén rs1050152 variánsa** esetén a forward primer:

5'-AGAGAGTCCTCCTATCTGATTG-3',

a reverse primer:

5'-TCCTAGCTATTCTTCCATGC-3';

**IGR2230a\_1 rs1762208** esetén a forward primer:

5'-CAGAAGAATGCCCTTGATGTG-3',

a reverse primer:

5'-TCAGAAGCTGTCCATCCCAC-3'.

A DNS amplifikáció során a következő termoparamétereket alkalmaztuk: elődenaturáció 95°C-on 2 perc, 35 ismétlődő ciklus, melynek lépései: denaturáció 95°C-on 30 mp, primerkötődés 58°C-on 45 mp (SLC22A4 rs1050152 esetén 54°C-on 30 mp), polimerizáció 72°C-on 45 mp, majd a ciklusok után végső lánchosszabbítás 72°C-on 5 perc.

Az IGR2096a\_1 rs12521868, IGR2198a\_1 rs11739135 és SLC22A5 rs2631367, IGR2230a\_1 rs1762208 mutációk esetén a felsokszorozott DNS-szakaszok emésztése a következő allél-specifikus restrikciós endonukleázokkal történt: *TruII* (IGR2096a\_1), *HinIII* (IGR2198a\_1) és *HpaII* (SLC22A5), *Ddel* (IGR2230a\_1). Minden amplifikátum tartalmazott

egy obligát hasítóhelyet is, mely az emésztés hatékonyságának ellenőrzésére szolgált. Az IGR2096a\_1 normál genotípus (GG) esetén a 269 bp méretű PCR-terméket az endonukleáz két fragmentre, egy 81 és egy 188 bp hosszú szakaszra hasította. A homozigóta genotípus (TT) jelenlétekor 32, 81 és 156 bp hosszúságú szakaszok keletkeztek, míg heterozigóta egyed esetén valamennyi fragment detektálható volt. Az IGR2198a\_1 polimorfizmus vizsgálata során a restriktív endonukleáz a 280 bp nagyságú PCR-terméket 38, 60 és 182 bp-os szakaszokra vágta normál genotípus (GG) esetén. Homozigóta genotípussal (CC) bíró betegekben a hasítás 60 és 202 bp méretű DNS darabokat eredményezett. Heterozigóta genotípus esetén mindegyik fragment látható volt. Az SLC22A5 normál genotípus (GG) jelenlétében az emésztés során 31 bp, 42 bp és 313 bp hosszú fragmentek keletkeztek. Heterozigóta egyedekben 31 bp, 42 bp, 313 bp és 355 bp méretű DNS-szakaszokat detektáltunk, míg homozigótákban csak a 31 és 355 bp nagyságú hasítási termékeket azonosítottuk. Az IGR 2230a\_1 polimorfizmus vizsgálata során G allél esetén 122, 128 és 188 bp hosszúságú szakaszok keletkeztek, míg A allél esetén 128 és 310 bp-os fragmentumokat mértünk.

A hasítási termékek elkülönítése gélelektroforézissel, etídium-bromidos festéssel és UV megvilágítással történt.

A betegség és a vizsgált genetikai variánsok között fennálló összefüggések feltárására  $\chi^2$ -tesztet és regressziós analízist alkalmaztunk SPSS 11.5 programcsalád felhasználásával.

A genetikai kapcsoltság vizsgálatához Haploview 4.1 programot használtunk.

## **Eredmények**

Munkacsoportunk vizsgálta az IBD5 régióban elhelyezkedő OCTN1 és OCTN2 kation transzporterek, valamint a Peltekova és munkatársai által hajlamosító tényezőként leírt TC haplotípus szerepét Crohn-betegség, valamint colitis ulcerosa kialakulásában. Emellett felmerült az IBD5 régióban elhelyezkedő további variánsok hajlamosító szerepe, melyek közül vizsgáltuk az IGR2198a\_1, IGR2096a\_1, valamint az IGR2230a\_1 szerepét.

Az IGR2096a\_1 T allél frekvenciája (47,2%), valamint az IGR2198a\_1 C allél frekvenciája (45,9%) Crohn-betegség esetén szignifikánsan magasabb volt a kontrollokéhoz (38,2%, 37,7%) képest. Ugyancsak gyakoribb volt e két allél colitis ulcerosa (41,8%, 42,0%) esetén, szignifikáns különbséget kimutatni azonban nem tudtunk. Az IGR2230a\_1 A allél frekvenciája mind Crohn-betegség (48,5%), mind colitis ulcerosa (47,1%) esetén magasabbnak bizonyult a kontroll populációhoz (44,6%) képest, szignifikáns eltérés azonban nem volt.

Az SLCA22A4 T allél (Crohn-betegségben 45,4%, colitis ulcerosában 45,4%), valamint az SLCA22A5 C allél gyakoriságát (Crohn-betegségben 49,7%, colitis ulcerosában 47,4%) vizsgálva egyik esetben sem találtunk szignifikáns eltérést a kontrollokéhoz (39,3%, 46,0%) képest.

A vizsgált variánsok közötti páronkénti linkage disequilibrium értékeket vizsgálva a legerősebb korrelációt az SLC22A5 (rs2631367) és IGR2230a\_1 (rs17622208) között észleltük ( $r^2 > 0,8$ ).

Vizsgálataink alapján nem találtunk kapcsolatot az OCTN1, valamint az OCTN2 genetikai variáns viszonylatában sem a colitis ulcerosával, sem a Crohn-betegséggel. Az IBD5 régióban elhelyezkedő minor variánsok vizsgálatakor szignifikáns összefüggést észleltünk a Crohn-betegség és az IGR2096a\_1, az IGR2198a\_1 genetikai variáns között. A colitis ulcerosa kapcsán szignifikáns eltérés nem volt. Az IGR2230a\_1 genetikai variáns esetén szignifikáns összefüggést kimutatni sem a colitis ulcerosa, sem a Crohn-betegség esetén nem tudtunk. Eredményeink Noble és munkatársainak azon felvetésével hozhatók összefüggésbe, mely szerint elsősorban ezen minor alléleknek van szerepük a Crohn-betegség kialakulásában szemben a Peltekova és munkatársai által tanulmányozott TC haplotípussal.

A vizsgált variánsok között megfigyelt linkage disequilibrium értékek meglehetősen magasak, mindenképpen szoros kapcsoltságra utalnak a gének variánsai között. Az IBD5 lókuszt vizsgáló polimorfizmusai közül az SLC22A5 rs2631367 és az IGR2230a\_1 rs17622208 mutatta a legszorosabb kapcsoltságot, ami összhangban van azzal, hogy ezen mutációk között van a legkisebb távolság az 5. kromoszómán. Ez felveti a kérdést, hogy mennyire különálló a vizsgált variánsok szerepe egymástól, illetve, hogy a jövőben nem célszerű-e a magas LD értékű mutációk közül csupán az egyiket kiválasztani a vizsgálatához.

## **Következtetések**

1. Az 5q31 régióban elhelyezkedő IGR2096a\_1 T variáns, melyet Magyarországon először vizsgáltunk, hajlamosító tényező lehet Crohn-betegség kialakulásában, Silverberg, Noble és Latiano eredményeihez hasonlóan.
2. Nem találtunk összefüggést az IGR2096a\_1 T variáns, valamint a colitis ulcerosa között, eredményünk megegyezik a Noble és munkatársai által vizsgált skót, valamint Latiano és munkatársai által tanulmányozott olasz populációkban találtakkal.
3. Ugyancsak elsőként vizsgáltuk Magyarországon az IGR2198a\_1 C variánst, mely Crohn-betegség kialakulásában hajlamosító tényezőnek bizonyult, megerősítve a korábbi nemzetközi eredményeket.
4. Az IGR2198a\_1 a magyar populációban, a skót populációhoz hasonlóan, colitis ulcerosa kialakulására nem hajlamosít.
5. Az IGR2230a\_1 A variáns, melyet Magyarországon szintén elsőként vizsgáltunk, a nemzetközi irodalommal ellentétben Crohn-betegségben nem bizonyult hajlamosító tényezőnek.
6. Noble és munkatársaihoz hasonlóan nem tudtunk összefüggést kimutatni az IGR2230a\_1 A variáns és a colitis ulcerosa kialakulása között.
7. Kapcsoltságot találtunk az SLC22A5 (rs2631367) és IGR2230a\_1 (rs17622208) variánsok között ( $r^2 > 0,8$ ).

## Közlemények

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*

1. **Lakner L.**, Csöngői V., Sarlós P., Járomi L., Sáfrány E., Varga M., Orosz P., Magyarai L., Bene J., Miheller P., Tulassay Zs., 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.*, 2009; 24:503-507. ***Impakt faktor: 1,767***
2. Talián G., **Lakner L.**, Bene J., Komlósi K., Horváth K., Gasztonyi B., Miheller P., Figler M., Mózsik Gy., Tulassay Zs., Melegh B.: Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis patients with different IGR2230a\_1 genotypes. *Int. J. Immunogenet.*, 2009; 36(6):329-335. ***Impakt faktor: 1,160***
3. **Lakner L.**, Csöngői V., Magyarai L., Varga M., Sarlós P., Orosz P., Bári Zs., Takács I., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., Bene J., Tulassay Zs., Döbrönte Z., Melegh B.: Az 5q31 IBD5 régióban található IGR és SLC22A4/SLC22A5 variánsok lehetséges szerepe gyulladássos bélbetegség kialakulásában. *Orv. Hetil.*, 2009; 150:1373-1378.
4. Magyarai L., Bene J., Komlósi K., Talián G., Faragó B., Csöngői V., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., **Lakner L.**, Varga M., Gasztonyi B., Melegh B.: Prevalence of SLC22A4 1672T and SCLC22A5-207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerativ colitis patients. *Pathol. Oncol. Res.*, 2007; 13:53-56. ***Impakt faktor: 1,272***

### *7.2. Egyéb közlemények*

1. Csöngői V., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., Magyarai L., Faragó B., Bene J., Polgár N., **Lakner L.**, Sarlós P., Varga M., Melegh B.: Interaction of major IBD susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J. Gastroenterol.*, 2010;16(2):176-183.

***Impakt faktor: 2,081***

2. Járomi L., Csöngői V., Polgár N., Szolnoki Z., Maász A., Horvatovich K., Faragó B., Sipeky Cs., Sáfrány E., Magyarai 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.*, 2009; [Epub ahead of print]

***Impakt faktor: 2,061***



3. **Lakner L.**, Döbrönte Z.: A 24 órás pH-monitorozás és a nyelőcső-manometria szerepe felső gastrointestinalis panaszokkal jelentkező betegek kivizsgálásában. *Orv. Hetil.*, 2009; 150(43):1978-1982.
4. Sipeky Cs., **Lakner L.**, Szabó M., Takács I, Tamási V., Polgár N., Falus A., Melegh B.: Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2009; 43(3):239-242. ***Impakt faktor: 2,749***
5. Sipeky Cs., Csöngéi V., Járomi L., Sáfrány E., Polgár N., **Lakner L.**, Szabó M., Takács I., Melegh B.: Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKRC1) haplotypes in average Hungarian and in Roma population samples. *Pharmacogenomics*, 2009; 10:1025-1032.  
***Impakt faktor: 3,551***
6. Magyar L., Faragó B., Bene J., Horvatovich K., **Lakner L.**, Varga M., Figler M., Gasztonyi B., Mózsik Gy., Melegh B.: 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.*, 2007; 13:2205-2208.
7. Döbrönte Z., **Lakner L.**, Sarang K.: Posztinfekciós irritábilis bélszindróma. *Orv. Hetil.*, 2006; 147:2077-2080.
8. Sarang K., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Soroncz M., Kovács L.G.: A szérum-ascites albumingradiens szerepe az ascites differenciáldiagnosztikájában. *MOTESZ Magazin*, 2004; (Suppl.3-4):5-7.
9. Czakó L., Takács T., Hegyi P., Prónai L., Tulassay Zs., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Boda K., Lonovics J.: Quality of life assessment after pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Can. J. Gastroenterol.*, 2003; 17:597-603.  
***Impakt faktor: 1,265***
10. Czakó L., Takács T., Lonovics J., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Prónai L., Tulassay Zs.: Az életminőség vizsgálata a krónikus pancreatitis enzimszubsztitúciós kezelése során. *Orv. Hetil.*, 2002; 143:1521-1527.
11. **Lakner L.**, Jáger R., Toldy E., Sarang K., Varga L., Kovács L.G., Döbrönte Z.: A *Helicobacter pylori* infectio seroepidemiológiai vizsgálata Vas megyében. *Magyar Belorv. Arch.*, 1999; 52:467-470.

12. Toldy E., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Kovács L.G.: Helicobacter pylori antitest kimutatása két módszer összehasonlítása kapcsán. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina, 1998; 25:112-113.
13. Döbrönte Z., **Lakner L.**: Comparison of late complications after endoscopic sphincterotomy in patients with gallbladder in situ. In: 22<sup>nd</sup> Congress of the International Society of Internal Medicine, (Ed.: V. Varró, R. de Chatel) Monduzzi Editore, Bologna, 1994; pp: 151-154.

***Összesített impakt faktor: 15,906***

***(ebből az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények: 4,199)***

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Melegh Béla Professor Úrnak, hogy a Pécsi Tudományegyetem Genetikai Intézetének csapatához kapcsolódva ezen munkát elvégezhettem. Köszönöm az intézet összes dolgozójának, közöttük is kiemelkedően közvetlen munkatársaimnak, Csöngéi Veronika, Magyar Lili és Sáfrány Enikő kolléganőknek, hogy munkámban támogattak.

Köszönöm gastroenterológus mesteremnek, Dr. Döbrönte Zoltán Professor Úrnak, hogy szakmámban a számomra szükséges útmutatást megadta nekem. Köszönöm a Vas Megyei Markusovszky Kórház Endoscopy Laboratóriumában dolgozó asszisztensnőknek, Mersich Ibolya vezető asszisztensnek, valamint Takács Beatrix endoscopy szakasszisztensnek, hogy a mintagyűjtésben segítségemre voltak.

Köszönöm az ország számos kórházában és klinikáján dolgozó kollégáknak: Dr. Varga Márta Főorvosnőnek a Réthy Pál Megyei Kórházból, Békéscsabáról, Dr. Miheller Pál adjunktusnak a Semmelweis Orvostudományi Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinikájáról, Dr. Gasztonyi Beáta Főorvosnőnek a Zala Megyei Kórház Belgyógyászati Osztályáról, Dr. Orosz Péter Főorvos Úrnak a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház Belgyógyászati Osztályáról, Dr. Sarlós Patrícia doktornőnek a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar III. Sz. Belgyógyászati Klinikájáról, hogy a minták gyűjtésében segítségemre voltak.

Köszönetemet fejezem ki mindazon kollégámnak a Vas Megyei Markusovszky Kórházban, valamint szerte az ország különböző egészségügyi intézményeiben, akikhez szakmai problémáimmal bármikor segítségért fordulhattam.

Köszönöm családomnak a megértő türelmet, odafigyelést, pótolhatatlan segítséget, mely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

**THE ROLE OF IBD5 LOCUS ON  
CHROMOSOME 5q31 REGION IN THE  
DEVELOPMENT OF CROHN'S DISEASE AND  
ULCERATIVE COLITIS IN HUNGARIAN  
POPULATION SAMPLES**

**PhD thesis**

**Dr. Lilla Lakner**

**University of Pécs, Faculty of Medicine**

**Department of Medical Genetics**

**Supervisor: Bela Melegh MD, PhD, DSc**

**2010.**

**Pécs**

## **Introduction**

The ulcerative colitis and the Crohn's disease are the idiopathic chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. While the ulcerative colitis affects exclusively the colon, the Crohn's disease can spread to any part of the digestive canal from the mouth to the anus. In case of the development of Crohn's disease most commonly both the small intestine as well as the colon are affected jointly (40-50%). In 30-40% of the cases only the small intestine, whereas in 15-25% of the cases only the colon is affected. Upper gastrointestinal localisation is relatively rare.

Both the ulcerative colitis and the Crohn's disease are multifactorial clinical pictures. In their development environmental, immunological as well as genetic factors are considered to play important roles.

Family observations show that the inflammatory bowel disease occurring in family anamnesis is the most explicit risk factor concerning the development of the disease. In close relatives of Crohn's patients the probability of developing the same disease is 2,2-16,2%, developing IBD is 5,2-22,5%. In case of ulcerative colitis the development of the same disease can be expected in 5,7-15,5% of the cases, while the probability of developing IBD is present in 6,6-15,8% of the cases.

Genetic factors play important roles in triggering inflammatory bowel diseases; however none of the clinical pictures can be traced back to one single genetic variant. The wide-spread use of genome wide screening and the linkage map technique have proved to be especially informative methods in the examination of genome sections associated with IBD.

The role of IBD5 region of chromosome 5q31 in the development of IBD has been studied by several authors. The organic cation transporter (OCTN) 1 and 2 genes (SLC22A4 and SLC22A5, encoding OCTN1 and OCTN2, respectively), which are responsible for the two-way transport of carnitine and other organic cations, are located in the IBD5 region. The SLC22A4 variant allele goes with the increase of organic cation transport function, whereas in the case of the SLC22A5 allele the activation of the promoter of the gene triggered by heat-shock proteins changes.

Peltekova and colleagues described the TC haplotype in the 5q31 region, which is determined by the polymorphism of the SLC22A4 gene C1672T (rs1050152) and the SLC22A5 gene G-207C (rs2631367). The team has proved that haplotype confers susceptibility for Crohn's disease. Silverberg and colleagues studied the role of other functional variants in 5q31 region in a relatively large population. They have discovered

genetic association between the IBD and the IGR2096a\_1 (rs12521868), as well as the IGR2198a\_1 (rs11739135) loci.

### **The aims of the research**

The aim of our work was to examine the role of the IBD5 region in the case of ulcerative colitis and Crohn's disease in Hungarian population. We aimed at investigating the role of the IGR2096a\_1 (rs12521868), IGR2198a\_1 (rs11739135), IGR2230a\_1 (rs17622208) genetic variants as well as the SLC22A4 (rs1050152), SLC22A5 (rs2631367) genetic variants in conferring susceptibility to IBD.

We were trying to find an answer to the question, whether in the Hungarian population the OCTN1, OCTN2 genetic variants as well as the TC haplotype described by Peltekova and colleagues had a determinative role in the development of idiopathic inflammatory bowel disease or other minor alleles scrutinized by Silverberg and colleagues. In order to find the answer we chose and examined the IGR2096a\_1, the IGR2198a\_1, and the IGR2230a\_1 genetic variants.

### **Patients and methods**

Our research was based on a Hungarian population of patients suffering from ulcerative colitis and Crohn's disease, which practically represented the population of the whole country. The samples were collected in Békéscsaba, Budapest, Miskolc, Pécs, Szombathely, and Zalaegerszeg. Our genetic database is part of the national genetic database.

In order to scrutinize IGR2096a\_1, IGR2198a\_1, SLC22A4, SLC22A5 the samples of 217 Crohn's patients (101 males, 116 females, mean age  $39,5 \pm 1,0$  years), and 252 patients with ulcerative colitis (110 males, 142 females, mean age  $46,7 \pm 1,0$  years), while for scrutinizing IGR2230a\_1 the samples of 200 Crohn's disease patients (97 males, 103 females, mean age  $39,4 \pm 1,1$  years) and 246 patients with ulcerative colitis (108 males, 138 females, mean age  $44,0 \pm 1,1$  years) were processed. Both the patients with Crohn's disease and those with ulcerative colitis had typical clinical symptoms. The diagnosis in all cases was based on the clinical picture, endoscopic and histological findings.

A total of 290 clinically healthy control subjects (159 males, 131 females, mean age  $40,0 \pm 0,8$  years), in the case of scrutinizing IGR2230a\_1 187 individuals (105 males, 81 females, mean age  $37,7 \pm 0,8$  years) were collected. The subjects of the research gave their written consent with no exception for use of their DNA for genetic study. The study was approved by the National Ethics Committee (ETT TUKEB) and has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.

At the location of the involvement of the patients blood sample was taken and placed into EDTA containing tubes in order to avoid blood clotting. Before taking the blood sample, ulcerative colitis had been diagnosed by using colonoscopy together with histological biopsy, whereas Crohn's disease was diagnosed by using ileo-colonoscopy and intestine X-ray examination.

DNA extraction was performed by using standard desalting method .The starting point of the analysis of the individual variants was the DNA amplification performed via polymerase chain reaction (PCR) which in the case of IGR2096a\_1 rs12521868, IGR2198a\_1 rs11739135 and SLC22A5 rs2631367 mutations was followed by RFLP method, while the determination of SLC22A4 rs1050152 variants was performed by direct sequencing using an ABI 3100 automatic sequencer.

During PCR reactions the following primer pairs were employed which had been designed by our team:

**In the case of *IGR2096a\_1 rs12521868 variant*** the forward primer was:

5'-CAAGATTTCTGCCATAGCCTCCT-3',

the reverse prime was:

5'-GGAGGGTGGTGTAGCCAGAGTAG-3';

**In the case of *IGR2198a\_1 rs11739135 variant*** the forward primer was:

5'-AGACACTGGGACATCATCTGTCTG-3',

the reverse primer was:

5'-GGGCAATTCTATGAGGACATTTAGA-3';

**In the case of *SLC22A5 genes2631367 variant*** the forward primer was:

5'-GCCGCTCTGCCTGCCAGC-3',

the reverse primer:

5'-GGTCGCTATCAGGAACACGGAGGA-3';

**In the case of *SLC22A4 gene rs1050152 variant*** the forward primer was:

5'-AGAGAGTCCTCCTATCTGATTG-3',

the reverse primer:

5'-TCCTAGCTATTCTTCCATGC-3';

**In the case of *IGR2230a\_1 rs1762208 the*** forward primer was:

5'-CAGAAGAATGCCCTTGATGTG-3',

the reverse primer was:

5'-TCAGAAGCTGTCCATCCCAC-3'.

During the DNA amplification the following thermo parameters were employed: predenaturation at 95°C for 2 minutes, 35 recurring cycles with the following steps: denaturation at 95°C for 30 seconds, primer binding at 58°C for 45 seconds (in the case of SLC22A4 rs1050152 at 54°C for 30 seconds), polymerisation at 72°C for 45 seconds, then after the cycles a final chain extension at 72°C for 5 minutes.

In the case of the IGR2096a\_1 rs12521868, IGR2198a\_1 rs11739135 and SLC22A5 rs2631367, IGR2230a\_1 rs1762208 mutations the amplicons were digested by the following allele-specific restriction endonucleases: *TruII* (IGR2096a\_1), *HinIII* (IGR2198a\_1) and *HpaII* (SLC22A5), *Ddel* (IGR2230a\_1).

Every amplicon contained an obligate cleavage site to control the efficacy of the enzyme digestion. For the IGR2096a\_1, normal genotype (GG) resulted in two fragments of the 269 bp sized PCR product with the length of 81 bp and 188 bp.

For the homozygous genotype (TT) fragments with the length of 32, 81 and 156 bp were detected, while for the heterozygous genotype all fragments were seen. During the examination of IGR2198a\_1 polymorphism in the case of normal genotype (GG) the restriction endonuclease cleaved the 280 bp sized PCR product into fragments with the length of 38, 60, and 1832 bp. In patients with homozygous genotype (CC) the cleavage resulted in DNA fragments sized 60 and 202 bp. For the heterozygous genotype all fragments were visible. At the presence of SLC22A5 normal genotype (GG) during the digestion fragments with the length of 31bp, 42 bp and 313 bp were detected. In heterozygous genotype DNA fragments sized 31 bp, 42 bp, 313 bp and 355 bp were detected, while in homozygous genotypes cleavage products sized only 31 bp and 355 bp fragments were identified. During the examination of IGR 2230a\_1 polymorphism in the case of G allele sections with the length of 122, 128, and 188 bp were detected, while in the case of A allele fragments of 128 bp and 310 bp fragments were measured.

The separation of the cleavage products took place with the use of gelelectrophoresis, etidium-bromide staining and UV light.

For the exploration of associations between the disease and the examined genetic variants,  $\chi^2$  test and multivariate regression analysis were carried out with the use of SPSS 11.5 programme. For the examination of genetic linkage Haploview 4.1 programme was employed.



## Results

Our team investigated the role of the OCTN1 and OCTN2 cation transporters located in the IBD5 region and the TC haplotype described as risk factor by Peltekova and colleagues in the development of Crohn's disease and ulcerative colitis. Besides that, the susceptibility nature of other variants located in IBD5 region was also suggested, among which the role of IGR2198a\_1, IGR2096a\_1, and the IGR2230a\_1 were examined.

The frequency of the IGR2096a\_1 T allele (47,2%) and the IGR2198a\_1 C allele (45,9%) were significantly higher in the case of Crohn's disease compared to those in the control group (38,2%, 37,7%). These two alleles were also more common in the case of ulcerative colitis (41,8%, 42,0%), although significant difference could not be detected. The frequency of IGR2230a\_1 A allele in the case of Crohn's disease (48,5%) as well as at ulcerative colitis (47,1%) proved to be higher compared to those in the control population (44,6%), but no significant difference was detected.

The frequency of the SLCA22A4 T allele (in Crohn's disease 45,4%, in ulcerative colitis 45,4%), and the SLCA22A5 C allele ( in Crohn's disease 49,7%, in ulcerative colitis 47,4%) did not show difference compared to those in the control group (39,3%, 46,0%).

While examining the linkage disequilibrium values in pairs among the scrutinized variants the most significant association was noticed between the SLC22A5 (rs2631367) and the IGR2230a\_1 (rs17622208) , which was ( $r^2 > 0,8$ ).

During our research we could not detect any association concerning the OCTN1, and the OCTN2 genetic variants neither in the case of Crohn's disease nor ulcerative colitis. When examining the minor variants located in the IBD5 region, significant association was detected between Crohn's disease and the IGR2096a\_1, the IGR2198a\_1 genetic variants. Concerning ulcerative colitis no significant difference was detected. In the case of the IGR2230a\_1 genetic variant no significant difference was detected neither in the case of Crohn's disease nor ulcerative colitis. Our results can be associated with the suggestions of Noble and colleagues who consider the role of these minor alleles more significant in the development of Crohn's disease than the role of the TC haplotype scrutinized by Peltekova and colleagues.

The detected linkage disequilibrium values among the examined variants are rather high, which certainly suggests a close linkage among the variants of the genes. Among the examined polymorphisms of IBD5 locus, the SLC22A5 rs2631367 and the IGR2230a\_1 rs17622208 showed the closest linkage, which coincides with the fact that the distance is the shortest among these mutations on the 5th chromosome. This suggests that it might be more practical to choose only one of the mutations with high LD value for the examination.

## Conclusions

1. The IGR2096a\_1 T variant located in the IBD5 region, which was examined in Hungary for the first time can be a risk factor in the development of Crohn's disease, similarly to the results of Silverberg, Noble and Latiano.
2. We have not been able to find association between the IGR2096a\_1 T variant and ulcerative colitis, our results show a match to the results found in a Scottish population examined by Noble and colleagues, and an Italian population examined by Latiano and colleagues.
3. We examined the IGR2198a\_1 C variant for the first time in Hungary, which has proved to be a risk factor in the development of Crohn's disease, corresponding with the previous international findings.
4. The IGR2198a\_1 has not been found to confer susceptibility to ulcerative colitis in the Hungarian population similarly to the results in the Scottish population.
5. The IGR2230a\_1 A variant, which was examined in Hungary for the first time by our team, has not proved to be a risk factor in the development of Crohn's disease, showing disassociation to findings published in international publications.
6. Similarly to Nobel and colleagues, we have not been able to find association between the IGR2230a\_1 A variant and the development of ulcerative colitis.
7. We have found linkage between the SLC22A5 (rs2631367) and the IGR2230a\_1 (rs17622208), which is ( $r^2 > 0,8$ ).

## Publications

### *Publications which have served as a base for the thesis*

1. **Lakner L.**, Csöngéi V., Sarlós P., Járomi L., Sáfrány E., Varga M., Orosz P., Magyarai L., Bene J., Miheller P., Tulassay Zs., 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. of Colorectal Dis.*, 2009; 24:503-507. **Impact factor: 1,767**
2. Talián G., **Lakner L.**, Bene J., Komlósi K., Horváth K., Gasztonyi B., Miheller P., Figler M., Mózsik Gy., Tulassay Zs., Melegh B.: Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis patients with different IGR2230a\_1 genotypes. *Int. J. Immunogenet.*, 2009; 36(6):329-335. **Impact factor: 1,160**
3. **Lakner L.**, Csöngéi V., Magyarai L., Varga M., Sarlós P., Orosz P., Bári Zs., Takács I., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., Bene J., Tulassay Zs., Döbrönte Z., Melegh B.: Az 5q31 IBD5 régióban található IGR és SLC22A4/SLC22A5 variánsok lehetséges szerepe gyulladásoos bélbetegség kialakulásában. *Orv. Hetil.*, 2009; 150:1373-1378.
4. Magyarai L., Bene J., Komlósi K., Talián G., Faragó B., Csöngéi V., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., **Lakner L.**, Varga M., Gasztonyi B., Melegh B.: Prevalence of SLC22A4 1672T and SCLC22A5-207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerativ colitis patients. *Pathol. Oncol. Res.*, 2007; 13:53-56. **Impact factor: 1,272**

### *Other publications*

1. Csöngéi V., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., Magyarai L., Faragó B., Bene J., Polgár N., **Lakner L.**, Sarlós P., Varga M., Melegh B.: Interaction of major IBD susceptibility alleles in Crohn's's's disease patients. *World J. Gastroenterol.*, 2010;16(2):176-183. **Impact factor: 2,081**
2. Járomi L., Csöngéi V., Polgár N., Szolnoki Z., Maász A., Horvatovich K., Faragó B., Sipeky Cs., Sáfrány E., Magyarai 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.*, 2009; [Epub ahead of print] **Impact factor: 2,061**

3. **Lakner L.**, Döbrönte Z.: A 24 órás pH-monitorozás és a nyelőcső-manometria szerepe felső gastrointestinalis panaszokkal jelentkező betegek kivizsgálásában. *Orv. Hetil.*, 2009; 150(43):1978-1982.
4. Sipeky Cs., **Lakner L.**, Szabó M., Takács I, Tamási V., Polgár N., Falus A., Melegh B.: Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2009; 43(3):239-242. ***Impact factor: 2,749***
5. Sipeky Cs., Csöngéi V., Járomi L., Sáfrány E., Polgár N., **Lakner L.**, Szabó M., Takács I., Melegh B.: Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKRC1) haplotypes in mean Hungarian and in Roma population samples. *Pharmacogenomics*, 2009; 10:1025-1032. ***Impact factor: 3,551***
6. Magyar L., Faragó B., Bene J., Horvatovich K., **Lakner L.**, Varga M., Figler M., Gasztonyi B., Mózsik Gy., Melegh B.: No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4+49A/G polymorphisms with Crohn's's's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13:2205-2208.
7. Döbrönte Z., **Lakner L.**, Sarang K.: Posztinfekciós irritábilis bélszindróma. *Orv. Hetil.*, 2006; 147:2077-2080.
8. Sarang K., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Soroncz M., Kovács L.G.: A szérum-ascites albumingradiens szerepe az ascites differenciáldiagnosztikájában. *MOTESZ Magazin*, 2004; (Suppl.3-4):5-7.
9. Czakó L., Takács T., Hegyi P., Prónai L., Tulassay Zs., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Boda K., Lonovics J.: Quality of life assessment after pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Can. J. Gastroenterol.*, 2003; 17:597-603. ***Impact factor: 1,265***
10. Czakó L., Takács T., Lonovics J., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Prónai L., Tulassay Zs.: Az életminőség vizsgálata a krónikus pancreatitis enzimszubsztitúciós kezelése során. *Orv. Hetil.*, 2002; 143:1521-1527.
11. **Lakner L.**, Jáger R., Toldy E., Sarang K., Varga L., Kovács L.G., Döbrönte Z.:A *Helicobacter pylori* infectio seroepidemiológiai vizsgálata Vas megyében. *Magyar Belorv. Arch.*, 1999; 52:467-470.

12. Toldy E., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Kovács L.G.: Helicobacter pylori antitest kimutatása két módszer összehasonlítása kapcsán. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina, 1998; 25:112-113.
13. Döbrönte Z., **Lakner L.**: Comparison of late complications after endoscopic sphincterotomy in patients with gallbladder in situ. In: 22<sup>nd</sup> Congress of the International Society of Internal Medicine, (Ed.: V. Varró, R. de Chatel) Monduzzi Editore, Bologna, 1994; pp: 151-154.

***Total impact factor: 15,906***

***(From that the own publications which have served as a base for the thesis: 4,199)***

## **Acknowledgements**

I would like to say thank you to Professor Dr. Béla Melegh for providing me with the opportunity to join the team of the Institute of Medical Genetics at the University of Pécs. I also would like to say thank you to all the staff of the institute especially to my close colleagues Veronika Csöngéi, Lili Magyar and Enikő Sáfrány for their support in my work.

I am grateful to my master in gastroenterology, Professor Dr. Zoltán Döbrönte for providing me with the necessary guidance in my work. I also would like to say thank you to the assistants working in the Endoscopic Laboratory at Markusovszky County Hospital, to Ibolya Mersich head assistant, and Beatrix Takács specialized endoscopic assistant for helping me collect the necessary samples.

I say thank you to all the colleagues working in different hospitals and clinics of the country: to Dr. Márta Varga, head physician at Pál Réthy County Hospital in Békéscsaba, Dr. Pál Miheller assistant professor at the Semmelweis University, 2<sup>nd</sup> Department of Internal Medicine, Dr. Beáta Gasztonyi head physician at the Department of Internal Medicine at Zala County Hospital, Dr. Péter Orosz head physician at the Department of Internal Medicine at Borsod-Abaúj-Zemplén County Hospital, Dr. Patricia Sarlós physician at the University of Pécs, Faculty of Medicine, 3<sup>rd</sup> Department of Internal Medicine for helping me collect the necessary samples.

I also would like to express my gratitude to all of my colleagues at Markusovszky County Hospital as well as in other medical institutes throughout the county who provided me with professional guidance at any time when it was necessary.

I would like to say thank you to my family for their patience, their understanding, for the invaluable help which enabled me to create this study.