

# **NUEVOS MARCADORES GENÉTICOS DE PREDISPOSICIÓN A LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

Memoria presentada por el licenciado en Biología F<sup>o</sup> Javier Oliver Martos  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.  
Programa de doctorado: Genética y Evolución.

**DIRECTOR:**  
**DR. JAVIER MARTIN IBAÑEZ**  
**INVESTIGADOR CIENTIFICO**  
**INSTITUTO DE PARASITOLOGIA Y BIOMEDICINA "LOPEZ-NEYRA", CSIC.**  
**GRANADA.**

**A todos aquellos que considero mi familia.**



1.RESUMEN.....	1
2.INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 Enfermedad inflamatoria intestinal: Definición y clasificaciones.....	8
2.2 Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	12
2.3 Características clínicas de la enfermedad inflamatoria intestinal.....	14
2.3.1 Colitis ulcerosa.....	14
2.3.2 Enfermedad de Crohn.....	14
2.3.3 manifestaciones digestivas.....	15
2.3.4 manifestaciones extradigestivas.....	16
2.4 Etiología y Fisiopatología de la Enfermedad inflamatoria intestinal.....	17
2.4.1 Etiología.....	17
2.4.2 Fisiopatología.....	19
2.4.2.1Factores ambientales.....	19
2.4.2.2 Factores inmunológicos.....	21
2.5 Factores genéticos de la Enfermedad inflamatoria intestinal.....	27
2.5.1. Epidemiología genética de la EII.....	27
2.5.2. Tipos de estudios en genética humana aplicados a la EII.....	30
2.5.2.1. Estudios de ligamiento.....	31
2.5.2.2. Estudios de asociación.....	33
2.5.4 Selección de genes candidatos investigados en esta tesis.....	35

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	37
4. DISCUSIÓN.....	40
4.1. <i>NFKB1</i> .....	41
4.2. <i>PTPN22</i> .....	44
4.3. <i>FOXP3</i> .....	48
4.4. <i>NOS2A</i> Y <i>NOS3</i> .....	52
4.5. <i>MIF</i> .....	55
4.6. <i>IL23R</i> .....	58
4.7. <i>MYO9B</i> .....	62
5. Conclusiones.....	65
6. Perspectivas.....	67
7. Anexo I: Material y Métodos.....	72
8 Anexo II: Publicaciones.....	81
9. Referencias.....	115

## **1. RESUMEN**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), es una patología que engloba otras dos enfermedades principales, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). En la actualidad se enmarca dentro de las denominadas enfermedades genéticas comunes complejas. La complejidad viene determinada por la intrincada relación entre factores ambientales y genéticos que desembocan en una inapropiada respuesta del sistema inmunológico, responsable del daño ocasionado en los tejidos y órganos afectados.

Por el momento los factores ambientales implicados son poco conocidos, salvo el tabaco que tiene efectos contrapuestos, siendo beneficioso en la colitis ulcerosa y perjudicial en la enfermedad de Crohn. El resto, tales como dieta, polución, estrés, entre otros aún no están bien determinados.

Con respecto a los factores microbianos, no se ha podido encontrar un agente causal responsable de la enfermedad a pesar de los numerosos candidatos propuestos, *Micobacterium avium Paratuberculosis* (MAP), Paramixovirus, *Escherichia coli*, etc...

Por último los factores genéticos han sido la fuente de conocimiento que más luz ha aportado en los últimos años a la patogenia de la enfermedad, abriendo incluso el camino hacia nuevas vías fisiopatológicas hasta el momento no relacionadas con la enfermedad inflamatoria intestinal, como es el caso del reciente descubrimiento de la importancia de la autofagia.

La historia de la genética moderna en la enfermedad inflamatoria intestinal comienza en el año 2001 cuando se descubrió la implicación del gen nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (*NOD2/CARD15*) en la enfermedad de Crohn, hecho que supuso la primera evidencia contrastada de cómo una serie de variantes genéticas estaban asociadas a la enfermedad. En este momento ya se han

descrito los mecanismos moleculares subyacentes a la asociación de *NOD2/CARD15* con la enfermedad de Crohn. *NOD2/CARD15* es un receptor de patógenos intracelular relacionado con la destrucción de bacterias de la luz intestinal por parte de los monocitos. Las tres variantes localizadas en el gen *NOD2/CARD15* impiden que se realice una respuesta inmunológica apropiada que termina por destruir los tejidos propios.

Los polimorfismos del gen *NOD2/CARD15* no son suficientes para explicar el componente genético de la enfermedad de Crohn. Hasta el momento se han localizado 9 regiones cromosómicas candidatas y dentro de ellas se han localizado algunos polimorfismos de genes también implicados en la enfermedad de Crohn, aunque nuevamente contribuyen de forma modesta al desarrollo de la enfermedad y se sigue sin explicar el riesgo genético que posee un individuo a padecer la enfermedad inflamatoria intestinal. Ni tan siquiera se ha podido determinar el modo de herencia de la enfermedad. Por lo tanto se hace necesaria una mayor profundización en la arquitectura genética de esta patología que ayude a elucidar los mecanismos moleculares de la enfermedad inflamatoria intestinal que contribuyan a la mejora en el diagnóstico y sean candidatos para nuevas dianas terapéuticas.

Bajo estas premisas, el objetivo de este trabajo ha sido contribuir a la búsqueda de nuevos marcadores genéticos asociados a la susceptibilidad/protección de la enfermedad inflamatoria intestinal. Para realizar dicho objetivo se ha seguido una estrategia basada en la realización estudios de asociación caso control de genes candidatos seleccionados según su implicación funcional en la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal.

Dentro de la gran panoplia de moléculas relacionadas con la inflamación se seleccionaron los genes *NFKB1* (factor de transcripción nuclear kappa B1) por ser uno de los principales factores de transcripción que regulan genes proinflamatorios y



*FOXP3* (forkhead box P3) clave para el desarrollo y actividad funcional de linfocitos T reguladores. El gen *PTPN22* (protein tyrosine phosphatase N22) es una fosfatasa específica de linfocitos implicada en la señalización a través del receptor de las células T (TCR) y asociada a numerosas patologías autoinmunes. Los genes *NOS2A* y *NOS3* que codifican para las óxido nítrico sintasas inducible y endotelial respectivamente fueron seleccionadas por el papel que juega el óxido nítrico (ON) en la patología, ya que contribuye al estrés oxidativo y por los elevados niveles de ON observados en los pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal. El gen del factor inhibidor de la migración de macrófagos (*MIF*) se seleccionó debido a su capacidad pleiotrópica, al ser una citoquina proinflamatoria con actividad neuroinmunomoduladora y a su implicación en modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal. Para el estudio de la vía de la IL-23 se seleccionó el gen *IL23R* recientemente identificado como un gen asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal en otras poblaciones, poniendo así de manifiesto la importancia de las células proinflamatorias Th17. Por último se seleccionó el gen de la miosina 9b (*MYO9B*) relacionado con la integridad de la barrera epitelial, siendo este el primer mecanismo de defensa del organismo frente a patógenos y asociado previamente a la enfermedad celíaca, otra enfermedad en la que la integridad de la barrera está también alterada.

Para realizar los análisis se ha recopilado una larga cohorte de pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal provenientes del Hospital Virgen de las Nieves de Granada y eventualmente una segunda y tercera cohorte del Hospital Puerta del Mar (Cádiz) y Hospital Clínico San Carlos (Madrid). Los individuos control fueron obtenidos de los bancos de sangre de las ciudades indicadas. Tras la extracción de ADN de las muestras se diseñaron diferentes estrategias de tipaje para los polimorfismos estudiados, desde PCR-RFLP hasta PCR a tiempo real. Tras el recuento de los tipajes en pacientes y controles se procedió al análisis estadístico de los mismos, principalmente

mediante la prueba  $\chi^2$  de Pearson. Para evaluar el riesgo genético se utilizó la razón de productos cruzados *odds ratio* (OR). En los casos en los que fue necesario construir haplotipos, éstos fueron realizados mediante los Softwares Unphased y Haploview.

Nuestros resultados implican que el gen *MIF* está relacionado con la susceptibilidad genética a la enfermedad inflamatoria intestinal, tanto para la enfermedad de Crohn como para la colitis ulcerosa. El alelo *MIF* -173\*C confiere riesgo genético a padecer la enfermedad, incrementándose si el alelo se presenta en homocigosis. También se observó que hasta siete de las ocho variantes del gen *IL23R* confieren protección genética a la enfermedad inflamatoria intestinal de forma independiente. Esto indica la importancia de los distintos mecanismos de regulación y expresión de este receptor. El polimorfismo más fuertemente asociado es el rs1478026 que provoca un cambio de aminoácido arginina por glutámico pudiendo afectar a la conformación y función de la proteína de forma aguda. Por último los polimorfismos de la *MYO9B* resultaron asociados de forma exclusiva a la colitis ulcerosa apoyando así la hipótesis de que ambas enfermedades comparten un origen genético común pero que existen otros genes que las diferencian.

El resto de variantes genéticas analizadas reveló que los genes candidatos *NOS2A*, *NOS3*, *NFKB1*, *PTPN22* y *FOXP3* no parecen desempeñar un papel relevante en la predisposición genética a la enfermedad inflamatoria intestinal.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, junto con los datos aportados por el resto de la comunidad científica, contribuyen al avance del conocimiento de los factores genéticos que hay tras el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal, aunque queda mucho camino por recorrer para poder conocer con exactitud cuántos genes y en que proporción están implicados en la patología.

El futuro de la genética aplicada a las enfermedades comunes pasa por los esfuerzos en la recolección de un mayor número de muestras, para así aumentar el

poder estadístico de los estudios y por ende la fiabilidad de los resultados. De esta forma se pueden identificar variantes cuyas frecuencias alélicas estén por debajo del 5%, hecho hasta ahora difícil de observar en los estudios presentes. Junto con el aumento del tamaño muestral el desarrollo de plataformas de genotipado a gran escala, que permiten el rastreo simultáneo de un gran número de marcadores de todo el genoma, abren nuevos caminos para la identificación de los factores genéticos responsables de las enfermedades autoinmunes complejas como la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta nueva aproximación utilizando rastreos mediante SNPs del genoma total (GWAs), ya está dando sus primeros frutos, recientemente se han determinado nuevos genes (*IL23R* y *ATG16L1*) implicados de forma sólida en la enfermedad inflamatoria intestinal.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## **2.1 Enfermedad inflamatoria intestinal: Definición y clasificaciones.**

### **Definición.**

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) hace referencia a aquellos procesos inflamatorios crónicos e idiopáticos que afectan al tracto gastrointestinal, cuyas dos formas principales son la Colitis Ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC). Cuando la afectación es exclusivamente colónica no es posible distinguir entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, en esta situación se aplica el término de Colitis Indeterminada (CI) [1].

1. Colitis Ulcerosa (CU): La colitis ulcerosa se puede definir como un proceso inflamatorio ulcerativo agudo, subagudo o crónico de la mucosa recto-colónica que se extiende de manera proximal y continua desde recto hasta ciego, en diferente grado.

2. La enfermedad de Crohn (EC): se puede definir como un proceso inflamatorio crónico que puede afectar a cualquier región del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano. La lesión inflamatoria es característicamente transmural, asimétrica y discontinua. La enfermedad se caracteriza por un curso clínico prolongado y variable, por la diversidad de las manifestaciones clínicas, por las complicaciones perianales y sistémicas[2].

3. Colitis indeterminada (CI): El término colitis indeterminada es acuñado cuando se muestra solapamiento entre los signos característicos de la colitis ulcerosa y de la enfermedad de Crohn y en los cuales no es posible realizar un diagnóstico histológico diferencial. La mayoría de los casos diagnosticados de colitis indeterminada son temporales resultando finalmente en colitis ulcerosa [3].

## **Clasificaciones de la enfermedad inflamatoria intestinal**

### Enfermedad de Crohn

La primera clasificación que se propuso para la enfermedad de Crohn estaba basada únicamente en la localización de las lesiones [4]. Actualmente se acepta para la clasificación de la enfermedad de Crohn la denominada clasificación de Viena[5], donde las definiciones se confinan según la edad de diagnóstico (A), la localización (L) y el comportamiento (B) de la enfermedad.

Así, los pacientes se denominan A1 si han sido diagnosticados antes de los 40 años y A2 si lo han sido después de los 40. En cuanto a la localización, se denominan L1 aquellos afectados en el íleo terminal, L2 a la afectación colónica, L3 a la ileocolónica y L4 a aquellos con afectación en el tramo alto del tubo digestivo, independientemente de que estén presentes en otras localizaciones. Según el comportamiento se denomina B1 a la enfermedad inflamatoria no penetrante, B2 a la de carácter estenosante y B3 al fenotipo penetrante. En cuanto a la evolución se ha visto que el comportamiento de la enfermedad de Crohn es dinámico y cambia durante el transcurso de la enfermedad. También se clasifica al paciente por la presencia de la enfermedad perianal según haya o no abscesos, úlceras o fístulas perianales.

Recientemente se ha revisado esta clasificación proponiéndose modificaciones de la misma, en la denominada “clasificación revisada de Montreal”[6]. Las diferencias substanciales con la clasificación de Viena están en el grupo A1, donde se ha separado a los pacientes con inicio antes de los 16 años, se ha añadido el modificador de tracto digestivo superior (L4) a las demás localizaciones y no se ha incluido la forma perianal en las penetrantes, sino que se ha considerado un modificador aplicable a cualquiera de los subtipos. Se emplea el término fistulizante, aunque el original es penetrante. El patrón de comportamiento inflamatorio se considera transitorio, porque evoluciona frecuentemente a los patrones B2 o B3 o mixtos. La enfermedad perianal debe

clasificarse independiente de B3 y la L4 es una variación en la manifestación del fenotipo, que se añadiría sobre L1, L2 o L3.

**TABLA 1.** Clasificación de Montreal para la Enfermedad de Crohn.

<b>EDAD AL DIAGNÓSTICO (A)</b>		
A1	16 años o menos	
A2	17-40 años	
A3	mayor 40 años	
<b>LOCALIZACIÓN (L)</b>		
L1	Íleon terminal	L1+L4 (íleon terminal + tracto digestivo alto)
L2	Colon	L2+L4 (Colon + tracto digestivo alto)
L3	Ileocolónica	L3+L4 (ileocolónica + tracto digestivo alto)
L4	Tracto digestivo alto	
<b>PATRON CLÍNICO (B)</b>		
B1	No-estenosante, no fistulizante. Inflamatorio	B1p (inflamatorio con afectación perianal asociada)
B2	Estenosante	B2p (estenosante con afectación perianal asociada)
B3	Fistulizante	B3p (fistulizante con afectación perianal asociada)

## Colitis Ulcerosa

En la colitis ulcerosa no se había elaborado hasta ahora una clasificación unificada. Esta enfermedad se clasifica habitualmente según su extensión. Actualmente se aceptan tres grupos, que determinan el empleo de diferentes estrategias terapéuticas y que presentan diferentes tasas de riesgo de cáncer colorectal [6]. La clasificación de Montreal propone una división de los pacientes según extensión y gravedad.

**TABLA 2.** Clasificación de Montreal para la Colitis Ulcerosa

### **Extensión (E)**

**E1) Proctitis ulcerosa:** afección limitada al recto (el límite superior de la inflamación no supera la unión rectosigmoidea)

**E2) Colitis izquierda (o colitis distal):** afección limitada al colon izquierdo (el límite superior de la inflamación no supera el ángulo esplénico)

**E3) Colitis extensa (pancolitis):** afección que se extiende más allá del ángulo esplénico.

### **Gravedad (S)**

**S0) Colitis en remisión (Colitis silente):** no hay síntomas de la enfermedad.

**S1) Colitis leve:** cuatro o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia ni aumento de la VSG

**S2) Colitis moderada:** criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves

**S3) Colitis grave:** seis o más deposiciones diarias con sangre, fiebre, leucocitosis, taquicardia, anemia y aumento de la VSG, a menudo con signos de afección (“toxicidad”) sistémica grave.



## **2.2 Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal**

La incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal varían considerablemente dependiendo de la localización geográfica. Los datos aportados por varios estudios realizados en la población europea, presentan unos rangos de prevalencia de entre 8.3 y 214 casos por 100.000 habitantes para la enfermedad de Crohn y de 21.4 a 243 casos para la colitis ulcerosa [7], siendo estos rangos similares a los mostrados en Norteamérica [8].

Las tasas de incidencia de la enfermedad inflamatoria intestinal han sufrido un notable incremento en los países desarrollados, estabilizándose desde los años 80, entre 10-15 casos/105/año, de lo que se deriva la alta incidencia en los países del norte de Europa en relación a los países meridionales. Esta diferencia se ha denominado gradiente Norte-Sur. En aquellas zonas del Sur de Europa donde se han realizado estudios epidemiológicos recientes, estas diferencias son cada vez más discretas, pudiendo presuponer que en un futuro próximo las tasas de todos los países desarrollados sean similares.

Con respecto a los movimientos migratorios, la enfermedad aparece con mayor frecuencia en habitantes de zonas de baja incidencia cuando migran a zonas de alta incidencia [9].

Los estudios realizados en España encuentran una incidencia cercana a 7 casos cada 100.000 habitantes, de los cuales casi el 60% son colitis y el 40% enfermedad de Crohn. La prevalencia referida a 1997 para la enfermedad inflamatoria intestinal es de 205,21, siendo de 109,96 para la colitis ulcerosa, 87,45 para la enfermedad de Crohn y 7,79 para la colitis indeterminada [10].

Con respecto a la edad de debut de la enfermedad inflamatoria intestinal se puede hablar de una distribución bimodal, con un máximo absoluto de frecuencia entre los 15 y los 30 años y un máximo relativo después de los 60 años [11].

La mayoría de los estudios muestran un ligero predominio femenino en la enfermedad de Crohn, generalmente en el rango de un 50-60%. En contraposición, la colitis ulcerosa es discretamente más frecuente en el sexo masculino.[8, 12].

Otro aspecto que ha sido ampliamente estudiado es la relevancia del origen étnico en la enfermedad inflamatoria intestinal. La importancia del origen étnico en el riesgo a padecer enfermedad inflamatoria intestinal radica en que es más prevalente en judíos que en cualquier otro grupo étnico, dándose además en la enfermedad de Crohn un fenómeno de anticipación genética (anticipación en la edad de inicio de la enfermedad en generaciones sucesivas). Este hecho ha sido descrito en los Judíos Ashkenazi de Norte América, no aplicable al resto de poblaciones estudiadas [13, 14]. La colitis ulcerosa es de tres a cinco veces más prevalente en la población judía, existiendo diferencias entre los judíos residentes en Israel y los de otras regiones [15, 16]. Los estudios realizados encontraron que el riesgo de enfermedad inflamatoria intestinal en población judía inmigrante estaba aumentado 3-4 veces en relación con la población nativa [13, 14, 17]. Estos datos que se han mantenido a lo largo del tiempo ponen de manifiesto la importancia de las diferencias étnicas, por lo tanto una evidencia a favor del componente genético de esta enfermedad.

Sin embargo, el cambio en las tasas de prevalencia tras las migraciones y las elevadas incidencias mostradas en los países desarrollados, sugieren que los hábitos de vida y los factores ambientales inciden de manera incipiente tanto en la incidencia como en la prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal [15, 16, 18].

## **2.3 Características clínicas de la enfermedad inflamatoria intestinal.**

### **2.3.1 Colitis ulcerosa.**

La colitis ulcerosa se caracteriza presentar alteraciones histológicas confinadas predominantemente a nivel de la mucosa. Sin embargo existen diferencias histológicas en los cuadros de colitis ulcerosa activa y pasiva. En la colitis ulcerosa activa, la mucosa muestra un infiltrado difuso de linfocitos y células plasmáticas junto con capilares congestivos. Los neutrófilos polimorfonucleares están también presentes en el epitelio y luz de las criptas, dando lugar a criptitis y abscesos crípticos, rotura de la mucosa que posteriormente se ulcera. Las criptas que no se rompen muestran una depleción de células caliciformes, distorsión y ramificación. La infiltración por eosinófilos puede ser marcada en algunos casos. Cuando la enfermedad está inactiva la infiltración por células inflamatorias disminuye, se resuelven los abscesos crípticos y se recupera la población de células caliciformes. Sin embargo, la arquitectura de las criptas permanece distorsionada[2].

### **2.3.2 Enfermedad de Crohn**

El hallazgo más característico, pero no patognomónico de la enfermedad de Crohn es la presencia de granulomas que están presentes entre el 50-70% de los casos. El segundo hallazgo microscópico en importancia en la enfermedad de Crohn es la presencia de fistulas, éstas son profundas grietas que se extienden desde una superficie ulcerada hasta la submucosa y a menudo llegan hasta la muscular e incluso a la serosa.

El infiltrado inflamatorio en la enfermedad de Crohn es típicamente transmural. La submucosa está engrosada y fibrótica, observándose a este nivel agregados de linfocitos diseminados que también se extienden a la capa muscular y superficie serosa. Además de estos hallazgos característicos existe un infiltrado inflamatorio crónico inespecífico. Las criptas no se encuentran distorsionadas y aunque hay

depleción de células caliciformes en su epitelio, esta no es tan marcada como en la colitis ulcerosa [2].

### **2.3.3 Manifestaciones digestivas:**

#### Diarrea:

Sin duda, la diarrea es la manifestación clínica más frecuente de la enfermedad inflamatoria intestinal. La presencia de productos patológicos en las heces, especialmente de sangre, es un dato valioso para diferenciar la colitis ulcerosa de la enfermedad de Crohn.

#### Dolor abdominal:

Como la diarrea, el dolor abdominal es un síntoma frecuente y relativamente inespecífico de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Su frecuencia es mucho mayor en la enfermedad de Crohn que en la colitis ulcerosa. De hecho, la enfermedad de Crohn en su forma clásica de ileítis aguda cursa con un cuadro de dolor abdominal en la fosa ilíaca derecha indistinguible de la apendicitis aguda. En pacientes con colitis activa el dolor abdominal también está presente. Suele ser más sordo y se localiza generalmente en hipogastrio o en cualquiera de las fosas ilíacas.

#### Fiebre

La fiebre es generalmente una manifestación secundaria al proceso inflamatorio y suele ser de bajo grado. La presencia de picos febriles altos, traduce en la mayoría de los casos en una complicación séptica o una perforación.

#### Perdida de peso

Es más frecuente en los pacientes de Crohn y por lo común es del 10 al 20% del peso. Es secundaria a la anorexia, la diarrea y la sitofobia.

#### Enfermedad perianal: fístulas

La patología anorrectal es bastante común en la enfermedad de Crohn. La incidencia varía enormemente y según las series publicadas oscila entre en 20 y 80 %

[19]. Las lesiones más comunes son fístulas anales, úlceras, abscesos y la estenosis del canal anal.

La evolución de la enfermedad va a estar determinada por la presencia de estos trayectos fistulosos producidos como consecuencia de la profundización de la inflamación transmural, llegando a formar trayectos enterentéricos, entrovésicales y enterocutáneos.

#### **2.3.4 Manifestaciones extradiigestivas.**

Además de la sintomatología intestinal, la enfermedad inflamatoria intestinal suele presentarse con manifestaciones extraintestinales en diversos órganos. Se ha observado que están presentes hasta en un 25-35% de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Son ligeramente más frecuentes en pacientes con enfermedad de Crohn. La siguiente tabla resume las principales manifestaciones extradiigestivas asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal.

**TABLA 3.** Manifestaciones extradiigestivas en la enfermedad inflamatoria intestinal

<b>Localización</b>	<b>Enfermedad</b>
OSTEOMUSCULARES	ARTRITIS PERIFERICA
	SACROILEITIS
	ESPONDILITIS ANQUILOSANTE
PIEL	ERITEMA NUDOSO
	PIODERMA GANGRENOSO
	LESIONES ORALES
HEPATOBIAR	CEP
	GRANULOMATOSIS
	COLELITIASIS
OJO	ESTEATOSIS
	IRITIS / UVEITIS
ENF. TROMBOEMBOLICA	EPIESCLERITIS
AMILOIDOSIS	

## 2.4 Etiología y Fisiopatología de la Enfermedad inflamatoria intestinal

### 2.4.1 Etiología

Existen diferentes teorías sobre el origen de la enfermedad inflamatoria intestinal [20]. Inicialmente se asumió que se trataba de una patología infecciosa. La similitud de los primeros casos descritos con la infección intestinal por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), llevo a sugerirlo como agente causal. Desde ese momento se han propuesto otros microorganismos: *Diplostreptococcus*, *Bacterioides*, *Pseudomonas maltophilia*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Chlamidia*, *Listeria*, pero ninguno de ellos ha llegado a cumplir los postulados de Koch. También se han propuesto elementos víricos, como coxackievirus A y B, Reovirus, Polivirus, Norwall, Influezavirus B, Herpesvirus y Paramixovirus [21]. De todos los candidatos propuestos hasta la fecha sólo hay evidencias convincentes a favor de *Micobacterium avium paratuberculosis*, el cual se ha encontrado que el 70% de los pacientes portadores de mutaciones en *NOD2/CARD15* presentan evidencias de infección por MAP [22, 23].

En la década de los 50, se planteó la teoría psicósomática, llegándose a describir un patrón de personalidad infantil y dependiente que predispondría al desarrollo de la enfermedad [24].

Posteriormente se han planteado hipótesis relacionadas con la dieta [25], en especial con alergias alimentarias [26-28]. Bajo estos planteamientos subyace una inmunodeficiencia causada por alteraciones en la función de los neutrófilos [21].

Gracias al estudio de los procesos inmunológicos involucrados en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal, concretamente en las alteraciones que afectan a la inmunidad celular, se ha establecido que la pérdida de la tolerancia inmunológica es clave para el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. En individuos sanos existe tolerancia a antígenos entéricos autólogos, la cual se pierde durante la inflamación desencadenada por antígenos específicos [29].

La etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal requiere que haya interacción de los mecanismos de respuesta inmune innata con los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa [1].

Las hipótesis más aceptadas en los últimos años es la del origen autoinmune de la enfermedad inflamatoria intestinal, junto con la hipótesis de la hiperrespuesta a la microbiota intestinal que se produciría por una sobreexposición (por alteraciones en la permeabilidad de la mucosa intestinal) de un sistema inmune normal a una flora comensal también normal [30].

El elemento sintetizador de las hipótesis anteriores, sería un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, el cual permitiría un mayor paso de antígenos y por tanto una mayor exposición a los mismos [21, 31-33]. En los modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal se ha confirmado que los agentes microbianos son condición *sine qua non* en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal [35]. Prueba de esto es el hecho de que animales “libres de gérmenes”, no desarrollan la enfermedad. Sin embargo, si adquieren estos microorganismos a posteriori desarrollan la patología de la misma forma que si hubieran crecido en un ambiente normal no estéril.

Las teorías hasta ahora planteadas no son excluyentes en un contexto de pérdida de tolerancia facilitada por la infección por MAP, que alteraría la regulación del sistema inmune, pudiendo llegar a un estado de autoinmunidad [20].

En resumen, hasta la fecha no es posible determinar un agente causal único de la enfermedad inflamatoria intestinal. La flora microbiana y los agentes víricos facilitan el establecimiento de la enfermedad, funcionando como factores promotores de la misma [29]. Estos agentes microbianos son necesarios, pero no suficientes para causar la enfermedad, puesto que precisan de condiciones favorables para ejercer su efecto: un hospedador genéticamente proclive y un entorno ambiental propicio.

## **2.4.2 Fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal**

Bajo el amparo del último modelo aceptado, el que postula que factores ambientales inciden sobre individuos con predisposición genética para disparar una respuesta inmune descontrolada que origina el desarrollo de la enfermedad, vamos a revisar los principales jugadores que desencadenan la enfermedad inflamatoria intestinal.

### **2.4.2.1 Factores ambientales**

La mayor incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal está en Norte América y Europa y la menor incidencia es observada en América del Sur, África y Asia (a excepción de Sudáfrica y Australia) [34]. Habiéndose demostrado en los estudios epidemiológicos que es más frecuente en zonas urbanas comparado con zonas rurales, se pone de manifiesto la importancia de los factores ambientales como la industrialización, higiene y atención médica.

La dieta, especialmente el consumo de hidratos de carbono [35], ácidos grasos polinsaturados [36] y mediadores del ácido araquidónico [37] han sido puestos en tela de juicio, aunque las conclusiones son el leve impacto de dichos elementos sobre el origen y desarrollo de la enfermedad. Sin embargo hasta la fecha los meta-análisis que analizan la importancia de la leche materna y la enfermedad inflamatoria intestinal, sugieren que ésta tiene un efecto protector [38].

La hipótesis de la higiene, que sugiere que los cambios socioeconómicos afectan al sistema inmunológico ya que se vive menos expuesto a antígenos ambientales [39-41], determinaría un inadecuado desarrollo del sistema inmunológico y una inapropiada respuesta del mismo. Aunque no deja de ser una teoría más que aceptada queda por comprobarse experimentalmente y ver la contribución real de dicho factor ambiental sobre el componente total de la enfermedad.



Recientemente se ha relacionado el sistema nervioso con la enfermedad, viéndose ésta relacionada con los procesos de estrés [42].

Posiblemente el factor ambiental mejor estudiado sea el tabaco, éste está asociado con una menor frecuencia de exacerbación de la colitis ulcerosa; por el contrario se ha determinado que es un factor de riesgo para la enfermedad de Crohn, en la que se ha visto asociado a un agravamiento de la enfermedad y a la formación de fístulas. Dejar de fumar hace que se mejore el pronóstico en la enfermedad de Crohn, sin embargo aumenta el riesgo a padecer colitis ulcerosa [43].

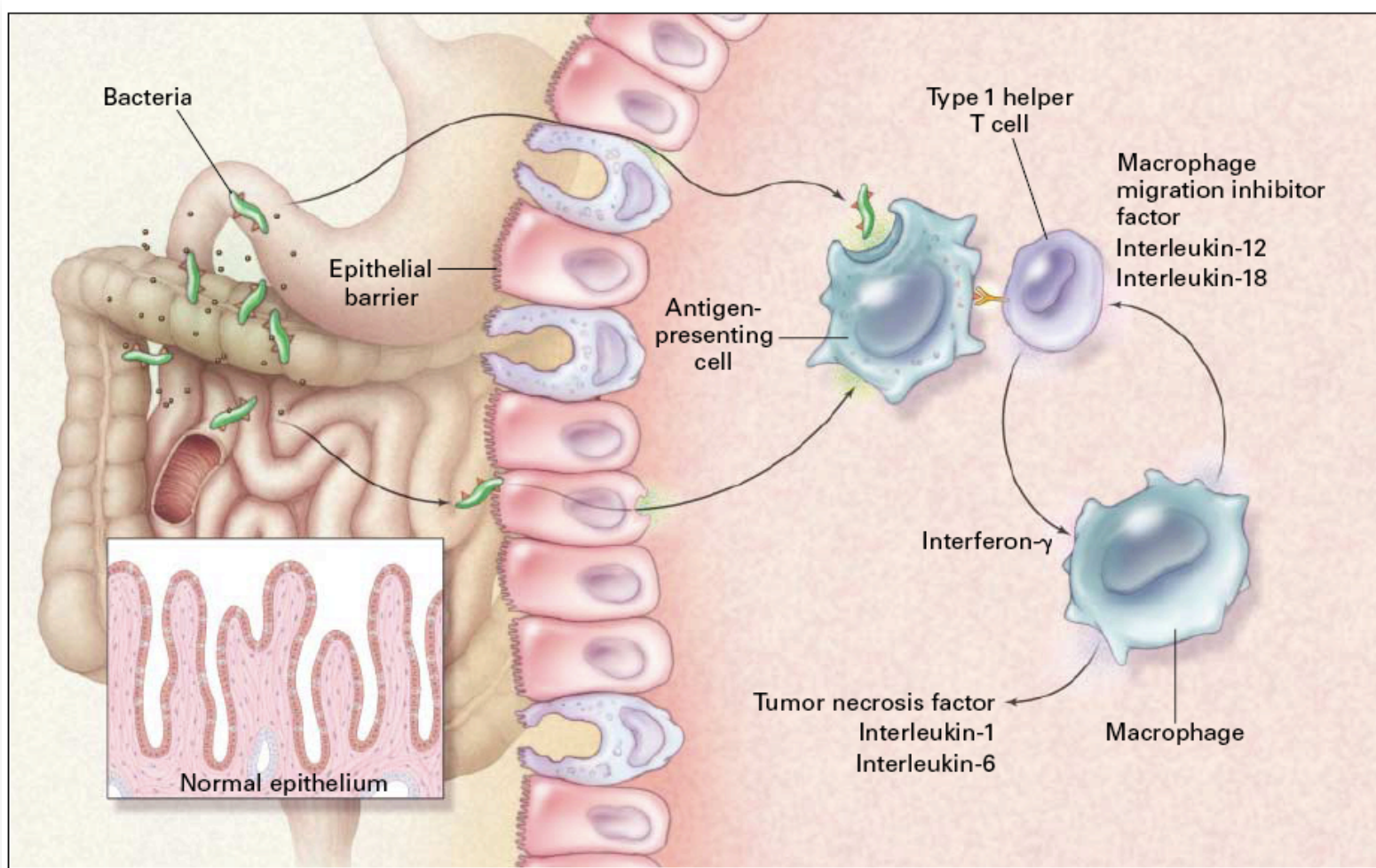
Los agentes microbianos, como anteriormente se ha comentado, han estado siempre presentes entre en los factores etiológicos. En la actualidad, ya descartado un único agente causal [44], nuevos estudios muestran posibles asociaciones entre las vacunas de la rubéola y sarampión con la enfermedad [45], aunque aún no han sido confirmados en otros estudios caso control [46].

Por último los estudios epidemiológicos sugieren que la apendicectomía actúa como elemento protector en la colitis ulcerosa [47, 48] y como agente de riesgo en la enfermedad de Crohn [49, 50].

### 2.4.2.2. Factores inmunológicos

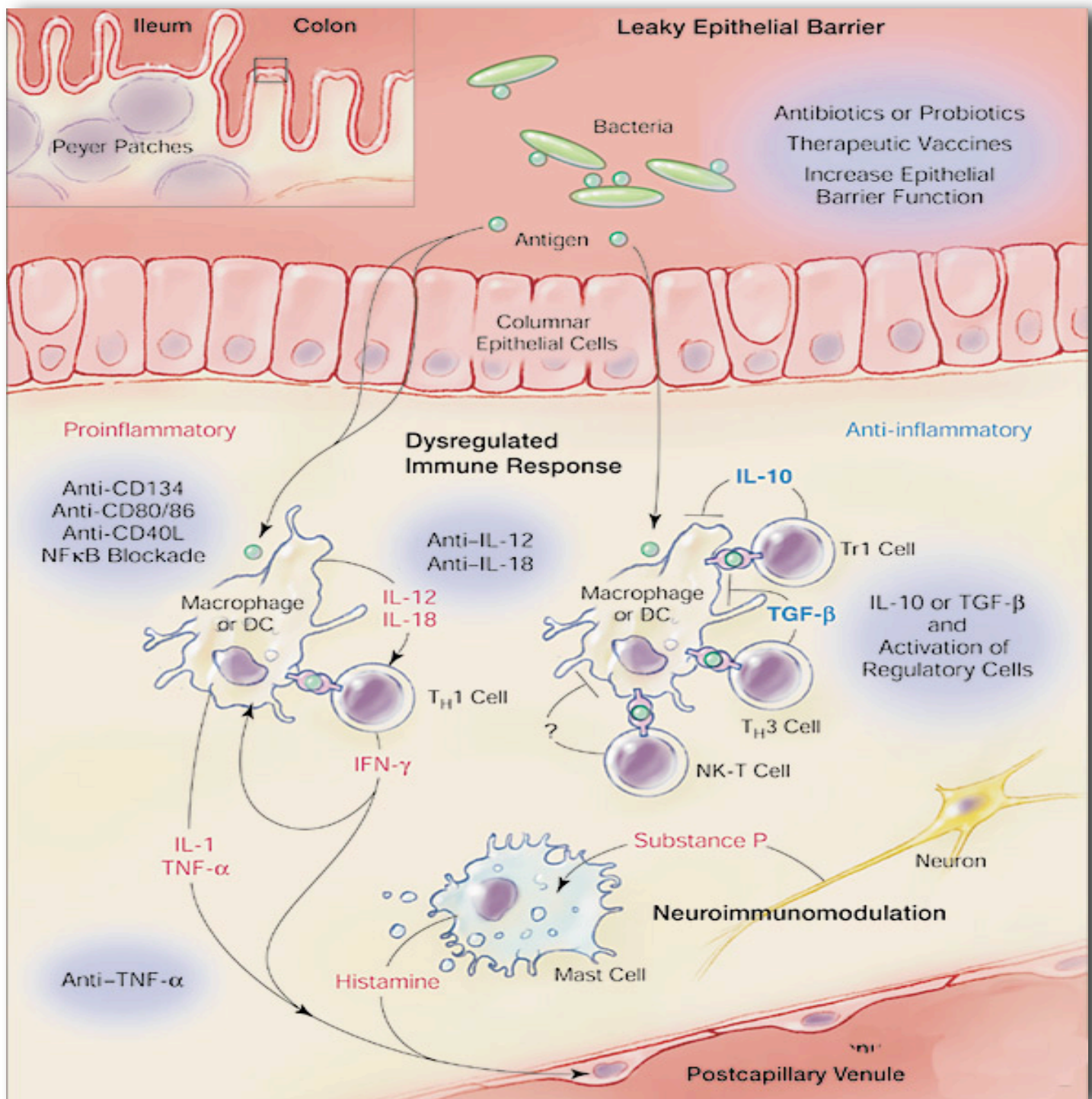
En individuos sanos, la mucosa intestinal se encuentra en un estado de inflamación controlada o fisiológica [2]. El mantenimiento de la homeostasis de la mucosa se consigue mediante una capacidad contenida de respuesta a antígenos de la dieta y microflora residente, mientras se retiene la capacidad para una respuesta inmune efectiva contra patógenos. Errores en la interpretación o regulación en el reconocimiento antigénico o de su capacidad de respuesta rompen la homeostasis de la mucosa y predisponen al individuo a un proceso inflamatorio incontrolado o patológico.

**IMAGEN 1.** Estado fisiológico de la mucosa intestinal normal (adaptado [2])



El hecho de que la enfermedad inflamatoria intestinal se presente clínicamente de forma heterogénea (localización, gravedad, respuesta al tratamiento), se cree que sería el resultado de diferentes alteraciones en las vías inmunoregulatoras, lo que a su vez sería el reflejo de la variabilidad genética y de la influencia medioambiental [51].

**IMAGEN 2.** Mucosa intestinal EII. (adaptado [2])



Así pues, la enfermedad inflamatoria intestinal sería consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos, medioambientales y microbianos, que provocarían una inflamación mantenida en la mucosa intestinal, favorecida por la alteración de la barrera mucosa y por defectos en el sistema inmunológico [52].

A continuación vamos a describir cómo y porqué podrían los antígenos microbianos inducir una respuesta inflamatoria inapropiada.

#### Eventos iniciales:

1- Barrera epitelial: La barrera epitelial de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tiene menor resistencia, lo que incrementa la permeabilidad [53]. Por el momento se han propuesto diferentes hipótesis para explicar este fenómeno, desde la mediación de las células T que contribuyen a la pérdida de las uniones íntimas célula-célula hasta la disfunción neuro-entérica[53-57].

2- Inmunidad innata: Se ha descrito un funcionamiento anormal de los mecanismos inmunes innatos a nivel de la barrera, observándose una distribución anómala de los patrones de expresión de los toll-like receptors (TLR) (receptores de patógenos que reconocen patrones moleculares comunes de microorganismos) y encontrándose TLR4 altamente sobre-expresado en ambas enfermedades [58]. Se ha descrito una sobre-regulación de NOD2 en las células epiteliales [59, 60]. Estos hechos pueden comprometer la capacidad del hospedador para eliminar los patógenos invasores, favoreciendo así la cronificación de la inflamación.

3. Inmunidad adaptativa: Se ha demostrado que el sistema de reconocimiento y procesamiento de antígenos, por parte de las células presentadoras de antígenos, no actúa de forma correcta en pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal. Gracias a estudios en modelos murinos e in vitro se ha sugerido que las células dendríticas reconocen a bacterias comensales e inducen una respuesta Th1 y posiblemente Th17,

respuesta proinflamatoria típica ante patógenos [61]. Esta anormal regulación puede estar mediada por la sobre-expresión de TLR4 en células dendríticas [62].

4. Papel de las células epiteliales: Una presentación antigénica atípica provoca una potente activación de las células T. Las células epiteliales, normalmente no presentadoras de antígenos, adquieren un fenotipo activado que aumenta la expresión moléculas de histocompatibilidad en presencia de citoquinas inflamatorias, tales como en IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  [63]. De hecho, se han encontrado evidencias de que las células epiteliales de pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal expresan moléculas coestimuladoras alternativas que las convierten en células presentadoras de antígenos funcionales [64]. Además tienen la capacidad de activar directamente a células T CD4, gracias a la expresión de lectinas y otros carbohidratos [65-67].

5. Alteraciones de la tolerancia central: Debido a un fallo a nivel central (timo) y en la tolerancia periférica, existe una disfunción en las células T auto-reactivas. Estas células T activadas no sufren apoptosis [67], favoreciendo así la cronicidad de la inflamación.

6. Balance entre células T reguladoras (T reg) y efectoras: Se altera la homeostasis de células T reguladoras y efectoras. Cuando la enfermedad está activa, las células T efectoras (Th1 y Th2), predominan sobre la población de T reguladoras y como consecuencia, las células Th0 se diferencian preferentemente a Th1 y Th17 en la enfermedad de Crohn [68]. El fenotipo Th1 en la enfermedad de Crohn está mediado por el factor de transcripción T-bet [69] y por IL-23 [70] lo que desemboca en la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que estimula a los macrófagos a la producción de IL-1, TNF- $\alpha$  y IL-6 [70-72]. En la colitis ulcerosa, se ha encontrado un elevado número de células NK activadas que producen IL-13 e IL-5 [73], que ayudaría a perpetuar la inflamación.

Recientemente se ha determinado el importante papel que desempeña TGF- $\beta$  en el mantenimiento del balance entre las células pro-inflamatorias Th17 y las  $24$

reguladoras, ya que la pérdida de dicho balance es crítico en el desarrollo de la inflamación crónica intestinal [74].

7. Autofagia: Tras una infección por patógenos, la autofagia podría representar el primer intento de restauración de la homeostasis. Cuando esta capacidad es superada es cuando la apoptosis puede llevarse a cabo. Aunque aún se desconocen los mecanismos moleculares, hasta la fecha se han encontrado variantes genéticas en dos genes relacionados con la autofagia que aumentan el riesgo a padecer enfermedad de Crohn, proponiéndose que fallos en el autofagosoma, que hace que éste sea menos efectivo, puedan estar afectando al desarrollo de la enfermedad [75].

8. Estrés psicosocial: El estrés puede estar actuando como disparador o aumentando la cascada inflamatoria, gracias a la interacción neuroinmunológica. En ausencia de estrés el sistema nervioso a través del nervio vago, puede tener atenuada la respuesta inflamatoria [76]. Por otro lado se ha demostrado que los pacientes de colitis ulcerosa sometidos a estrés, tienen una hiperactivación del sistema nervioso simpático que propicia un incremento en la permeabilidad paracelular a nivel del colon, un aumento de la degranulación por parte de las células M, una sobreproducción de IFN- $\gamma$  y un patrón de expresión alterado de proteínas relacionadas con las uniones íntimas célula-célula [77, 78].

### Eventos finales

1. Migración celular: Se produce una migración de células inflamatorias desde el tejido vascular a la mucosa intestinal, gracias al reconocimiento antigénico, por parte de células profesionales y no profesionales de la presentación antigénica, acompañado de la liberación de quimiotácticos como IL-8, MIP1 y RANTES, entre otros. Al mismo tiempo las citoquinas proinflamatorias secretadas por macrófagos activados contribuyen a la adhesión leucocitaria y la extravasación al tejido [79, 80].

2. Mediadores inflamatorios: La acumulación del metabolitos y mediadores inflamatorios, como el óxido nítrico, radicales libres de oxígeno, prostaglandinas, leucotrienos, histaminas y proteasas terminan por generar el daño en la mucosa, a su vez promoviendo el crecimiento de fibroblastos y secreción de colágeno[81-84].

## **2.5. Factores genéticos de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal**

### **2.5.1. Epidemiología genética**

De los factores hasta ahora descritos, implicados en la etiopatogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal, el componente genético es el que ha generado un conocimiento de forma más rápida [85]. Gracias a los estudios epidemiológicos se ha determinado el importante papel de los factores genéticos. Las evidencias están basadas en los estudios de diferencias étnicas en la prevalencia, agregación familiar, estudios en gemelos y asociación con síndromes genéticos reconocidos [86].

Los estudios interesados en esclarecer las bases genéticas de las enfermedades complejas intentan responder a una pregunta capital: ¿dónde están localizados los genes o qué variantes genéticas están involucrados en la predisposición a padecer la enfermedad?. Debido a que esta pregunta es el interés principal del presente tesis doctoral, se ha decidido abordarla en un capítulo independiente para poder explicar con un mayor detalle los cimientos sobre los que se construye el conocimiento aportado en este trabajo de tesis doctoral. A continuación vamos a diseccionar cada uno de este tipo de estudios y lo que se ha determinado gracias a ellos.

#### Estudios étnicos

Se ha descrito una prevalencia significativamente menor de enfermedad inflamatoria intestinal en las poblaciones hispanas, afroamericanas y asiáticas [17]. Entre los grupos étnicos con una mayor prevalencia, los judíos Ashkenazis tienen mayor riesgo a desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal comparado con los judíos no caucásicos, con una incidencia 2-4 veces superior y una prevalencia 2-9 veces mayor, independientemente del área geográfica, lo que podría sugerir que los factores genéticos desempeñan un papel importante en el riesgo de desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal en la población judía.



## Estudios Familiares

En los estudios poblacionales aproximadamente entre un 5-10% de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal presentan una historia familiar positiva. Indicando que el mayor factor de riesgo para desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal es el hecho de tener un familiar afectado con la enfermedad. Se ha descrito que hasta un 75% de las familias con afectación múltiple son concordantes para el tipo de enfermedad mientras que el 25% son mixtas (un miembro con enfermedad de Crohn y otro con colitis ulcerosa) [86].

Curiosamente en la población pediátrica han sido descritos porcentajes de agregación familiar de hasta un 30%, lo que sugiere una mayor importancia de los factores familiares en los casos de debut temprano de la enfermedad [87].

## Estudios con gemelos

La tasa de concordancia para la enfermedad de Crohn es del 42 al 58% en gemelos monocigóticos, mientras que entre gemelos dicigóticos no difiere significativamente a las observadas entre otros hermanos. En la colitis ulcerosa la tasa de concordancia se ha establecido entre un 6-17% para gemelos monocigóticos y un 0,5% para gemelos monocigóticos, lo que indica una penetrancia reducida para el genotipo de enfermedad inflamatoria intestinal, posiblemente debido a los factores no genéticos implicados en la enfermedad [86].

La mayor concordancia entre gemelos monocigóticos en la enfermedad de Crohn sugiere un papel más determinista de los factores genéticos que en la colitis ulcerosa. Esto implica que hay un menor componente genético en la colitis ulcerosa, la cual esté probablemente más relacionada con variaciones estocásticas, como las que ocurren en el desarrollo de las células T y B del sistema inmunológico [88].

## Síndromes genéticos asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal está claramente asociada a cuatro síndromes genéticos bien definidos y caracterizados, como son: el síndrome de Turner [89, 90], el síndrome Hermansky-Pudlak [91], la glucogenosis tipo Ib [92] y el síndrome de Wiskott-Aldrich [86]. Así mismo la enfermedad inflamatoria intestinal, se encuentra asociada a otras enfermedades de origen autoimune, principalmente la espondilitis anquilosante, colangiectasia primaria o la esclerosis múltiple, entre otras [93].

Todas las evidencias no permiten establecer un modelo genético concreto que pueda explicar el modo de herencia de la enfermedad inflamatoria intestinal, habiéndose propuesto desde los modelos mendelianos para explicar la posible herencia de algunos subtipos de la enfermedad, hasta un modelo de heterogeneidad genética, sin haberse descartado modelos multifactoriales/poligénicos y modelos multilocus (oligogénicos) [94].

Si nos aproximamos al posible modelo de herencia, los modelos de umbral de susceptibilidad son los que mejor explican la transmisión de la enfermedad. En ellos se asume que la variable “susceptibilidad para desarrollar la enfermedad” se distribuye de forma continua en la población, de tal manera que sólo aquellos individuos que sobrepasan un determinado umbral de susceptibilidad manifiestan el trastorno. Según estos modelos, los familiares de individuos afectados tendrían por término medio una susceptibilidad mayor para padecer la enfermedad que la de la población general.

Dentro de esta idea de umbral de susceptibilidad, un modelo poligénico-multifactorial (acción aditiva y combinada de multitud de genes, cada uno con una contribución modesta, y factores ambientales) es el más aceptado para la enfermedad inflamatoria intestinal [95].

Por otro lado se espera que no exista una variante genética necesaria y suficiente para que se desarrolle la enfermedad. Además, ocurre que factores de

susceptibilidad en diferentes genes pueden dar lugar a una misma enfermedad en diferentes individuos, lo que se conoce como heterogeneidad genética [86].

### **2.5.2. Tipos de estudios en genética humana aplicados a la EII.**

La era moderna de la genética de la enfermedad inflamatoria intestinal, comienza en el año 2001 con el descubrimiento de mutaciones en el gen *NOD2/CARD15* (IBD1), siendo éste el primer gen de susceptibilidad en enfermedad de Crohn descubierto [96]. Se encuentra fuera de la región HLA. *NOD2* es una proteína citosólica, que reconoce el muranil dipéptido bacteriano, componente principal de la pared bacteriana. Las variaciones genéticas descubiertas en *NOD2* afectan a la capacidad de reconocimiento de dicho componente bacteriano y a la posterior activación del factor de transcripción NF-κB. Este descubrimiento abrió una nueva vía de investigación, aquella que relaciona las alteraciones genéticas con disfunciones del sistema inmunológico en la enfermedad inflamatoria intestinal, y puso de manifiesto la importancia de la respuesta inmune innata [97].

Desde ese momento se han descrito diversos genes implicados en la etiología de la enfermedad, tales como *DLG5*, *SLC22A4* y *SLC22A5* (IBD5), *ATG16L1*, *IL23R*, *IRGM*, *PTPN2*, *MDR1*, *MIF*, entre otros [98].

Esta nueva hornada de información, acerca de la genética de la enfermedad inflamatoria intestinal, ha puesto de manifiesto el creciente número de genes implicados, cada uno de ellos contribuyendo en una pequeña proporción al riesgo genético de padecer enfermedad inflamatoria intestinal, aceptándose que la influencia de la genética es primordial para el desarrollo de la enfermedad y para el fenotipo clínico mostrado por cada individuo.

Dos estrategias principales se han seguido en las últimas décadas para la búsqueda de genes involucrados en el origen de la enfermedad inflamatoria intestinal: los estudios de ligamiento y los estudios de asociación de genes candidatos [99].

### 2.5.2.1 Estudios de ligamiento

En los análisis de ligamiento normalmente son utilizadas genealogías en las que la enfermedad se presenta en distintos familiares y en las que se observa un patrón de herencia mendeliano. En estas familias se estudia la segregación de un determinado marcador genético cuya ubicación conocemos ya en el genoma y se observa si hay independencia entre la transmisión de la enfermedad y los diferentes alelos de dicho marcador. En el caso de que la enfermedad y un determinado alelo se transmitan conjuntamente podríamos postular la existencia de un gen para la enfermedad situado cerca del polimorfismo utilizado como marcador. La transmisión a la descendencia del marcador y del gen de susceptibilidad se habría producido conjuntamente, debido a su proximidad, más a menudo de lo que se esperaría por azar.

Cuando dichos análisis abarcan todo el genoma humano, se denominan “rastros sistemáticos del genoma”. Los marcadores genéticos utilizados son principalmente los microsatélites, consistentes en repeticiones de una secuencia corta de ADN (entre 2 y 8 pares de bases). La principal característica de los microsatélites es su alto grado de polimorfismo, representado en un elevado número de alelos. En consecuencia existen un elevado número de individuos heterocigotos para un determinado microsatélite lo que permite determinar fácilmente su patrón de herencia [99]. Actualmente también se están analizando SNPs (single nucleotide polymorphism) para este tipo de estudios, denominándose estudios completos de genoma, aunque la cobertura es cercana al 60% del genoma humano. Gracias a esta nueva estrategia se han determinado ya diferentes loci implicados, en el último año, como es el caso de los genes *IL23R* y *ATG1611*. [100, 101].

En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, se han realizado varios rastros sistemáticos del genoma llevados a cabo en poblaciones de diferente origen

étnico (tabla 4) [102-113], así como diferentes meta-análisis englobando los resultados

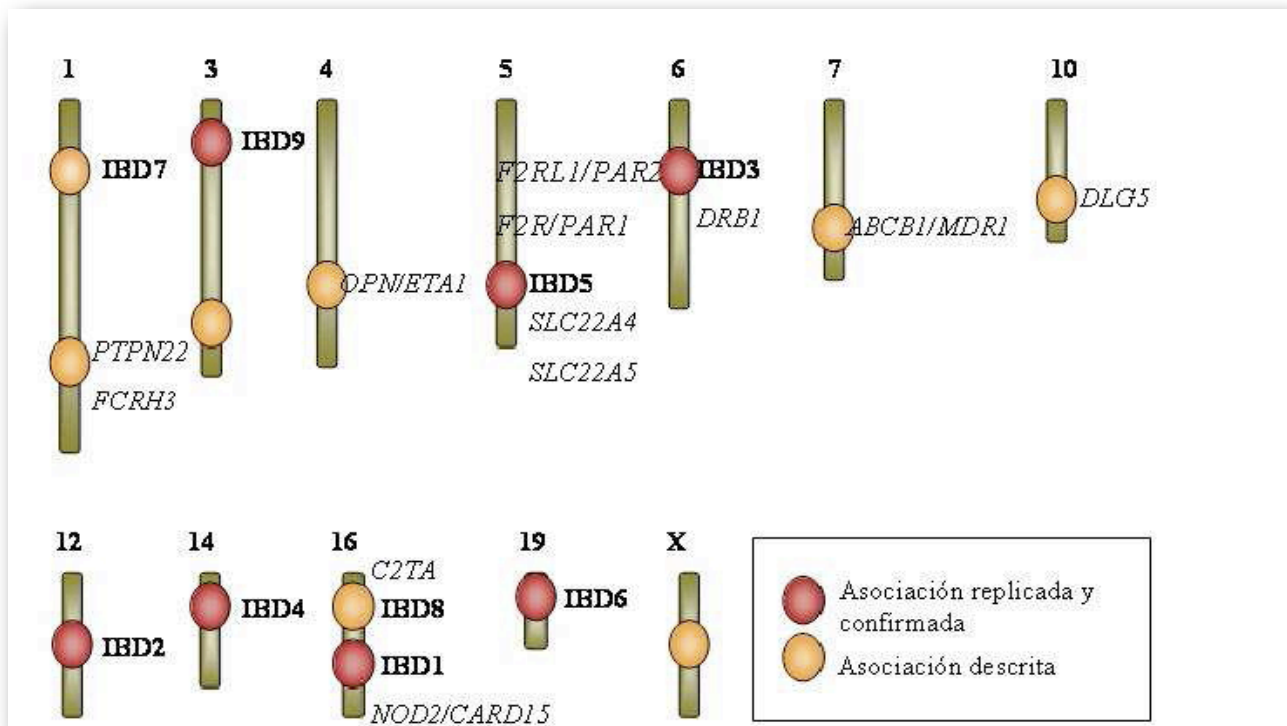
<b>AUTOR</b>	<b>AÑO PUBLICACIÓN</b>	<b>EC/CU/MIXTO</b>	<b>REGIÓN CROMOSÓMICA</b>
Hugot	1996	EC	16cen
Satsangi	1996	MIXTO	12,7q22,3p21
Cho	1998	MIXTO	16cen,1p,3q,4q
Hampe	1999	MIXTO	16cen,10q,1q,6p,12,X,22,4q
ma	1999	EC	14q11,17q21,5q33
Duerret	2000	MIXTO	14q11,17q21,5q33
Rioux et	2000	MIXTO	19p13,5q31,3p,6p
Williams	2002	MIXTO	16cen,11p,6p21
Paavola-Sakki	2003	MIXTO	11p12,2p11,12p13,12q23,19q13
Vermeire	2004	MIXTO	14q11,Xq,1q,6q,20p,4q,10q
Barmada	2004	MIXTO	12,6p,6q,8q,15q,22,2q
Duerret	2006	MIXTO	1p13

de varias de estas poblaciones [114].

El dato más concluyente y reproducible que se ha obtenido en estos estudios es la asociación con la región cromosómica 16p12. También se han encontrado regiones en otros cromosomas asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal: 12, 6, 14, 5, 1 y 3.

Algunas de estas regiones se han asociado también con susceptibilidad a otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR), la diabetes tipo 1 (DT1), lupus eritematoso sistémico (LES) o la enfermedad celiaca (EC) apoyando la hipótesis

**Tabla 4:**Resultados de los Rastros sistemáticos del genoma en EII



de que deben existir ciertos factores genéticos comunes de predisposición a diferentes enfermedades autoinmunes, y que por tanto serían factores predisponentes de autoinmunidad [115, 116].

Las regiones candidatas propuestas en este tipo de análisis se clasifican con la nomenclatura IBDn, por el momento se han identificado hasta nueve regiones cromosómicas diferentes relacionadas con la enfermedad inflamatoria intestinal, proponiéndose para cada una de ellas diversos genes candidatos (figura 4).

### 2.5.3.2 Estudios de asociación

La estrategia más comúnmente utilizada en la búsqueda de posibles genes asociados con las enfermedades complejas es la realización de estudios de asociación de genes candidatos.

En los estudios de asociación se compara la frecuencia de un posible alelo de riesgo de un gen candidato en personas afectadas por la enfermedad, con la frecuencia en individuos sanos del mismo grupo étnico o poblacional. Esta comparación puede poner de manifiesto la existencia de una "asociación" de riesgo

protección entre un alelo, o haplotipo, y la enfermedad, en caso de encontrar una frecuencia significativamente elevada del alelo en el grupo de enfermos con respecto al control [117].

Los estudios de asociación tienen la ventaja de poder detectar asociaciones débiles. Sin embargo, hay que considerar que con los estudios caso-control pueden aparecer resultados debidos a la presencia de falsos positivos. Para evitar estos errores hay que considerar un tamaño muestral adecuado y garantizar la homogeneidad de las poblaciones analizadas. Es imprescindible que el grupo de los controles sea semejante al de los pacientes en términos de origen étnico, exposición a factores ambientales, edad y sexo [117].

El elemento fundamental en los estudios de asociación es la elección de los genes candidatos a estudiar. Básicamente se pueden seguir dos estrategias:

Funcional: consiste en seleccionar genes con una implicación clara en los mecanismos patológicos relevantes para el desarrollo de la enfermedad.

Posicional: basada en la selección de genes que se localizan en regiones cromosómicas que se han asociado previamente con susceptibilidad a enfermedad en estudios de ligamiento.

Por otra parte, una vez seleccionado el gen candidato a estudiar, los marcadores de elección suelen ser las denominadas “variantes funcionales”, es decir, aquellas que pueden afectar la funcionalidad del gen, como las localizadas en regiones reguladoras (sitios de unión de factores de transcripción o de procesamiento del ARN) que pueden alterar la expresión del gen, o las que alteran la estructura de la proteína.

Este tipo de estudios ha contribuido en gran medida a la caracterización del papel de los genes fuera del sistema HLA en la enfermedad inflamatoria intestinal. Mediante esta aproximación se han estudiado numerosos genes cuya función está relacionada con los mecanismos patogénicos e inmunológicos de la enfermedad

inflamatoria intestinal. Entre los genes estudiados se encuentran *NCF4*, *PHOX2B*, *PTPN2*, *TNFSF15*, *TLR4*, *FAM29B*, *MDR1*, *IRGM*, *MIF*, *MYO9B* [98].

Debido a la gran versatilidad y potencia mostrada por los estudios caso control ésta suele ser la estrategia de elección de gran parte de los investigadores. Además es una herramienta de estudio relativamente fácil de implementar, puesto que la metodología de trabajo y los requisitos técnicos son bastante asequibles para los investigadores.

#### **2.5.4. Selección de genes candidatos investigados en esta Tesis.**

Si sumamos el riesgo relativo ejercido por todas las variaciones genéticas hasta el momento descritas y se comparan con el riesgo relativo entre parejas de hermanos, ( $\lambda_s$ ), para población caucásica europea (15-35), solamente pueden ser explicados un 30% de los casos de recurrencia entre hermanos. Debido a esto se requiere una mayor profundización y avance en la identificación de los genes implicados en esta patología, puesto que por el momento se ha identificado sólo una pequeña proporción de los numerosos genes que se espera estén involucrados en la predisposición genética a la enfermedad inflamatoria intestinal. La finalidad de esta tesis ha sido colaborar en el esclarecimiento de los genes implicados en la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal, siguiendo una estrategia de genes candidatos realizada mediante estudios caso control.

Siguiendo los criterios de selección anteriormente descritos, se podrían considerar como buenos genes candidatos para la enfermedad inflamatoria intestinal, aquellos relacionados con la regulación de la respuesta inmune, aquellos implicados en la respuesta innata o mediadores proinflamatorios que tienen como consecuencia la activación de la inmunidad adaptativa. En este contexto, se seleccionaron los genes para analizar su posible contribución a la enfermedad inflamatoria intestinal:



- I. *NFKB1*
- II. *PTPN22*
- III. *FOXP3*
- IV. *NOS2A* y *NOS3*
- V. *MIF*
- VI. *IL-23R*
- VII. *MYO9B*

Los motivos de selección de cada uno de ellos será explicado en detalle en el apartado de discusión correspondiente

### **3.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

En los últimos años la contribución científica al esclarecimiento de los mecanismos que conducen al desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal ha sido sumamente notorio. Estos estudios han implicado y explicado nuevas “piezas” hasta ahora desconocidas que están ayudando a resolver el complejo “puzzle” que conduce al inicio y desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. A pesar del gran esfuerzo científico quedan muchas interrogantes por contestar, como el papel de la flora bacteriana, los mecanismos de regulación de la respuesta inflamatoria, o, a nivel genético, cuantos genes y en que medida están actuando en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, el riesgo genético atribuido a la enfermedad inflamatoria intestinal no puede ser actualmente explicado con los genes descubiertos hasta la fecha, por lo tanto es necesario seguir investigando en mayor los factores genéticos relacionados con la enfermedad. El conocimiento generado por los estudios genéticos contribuye además a la identificación y esclarecimiento de vías fisiopatológicas implicadas, podría ser de utilidad para la implantación de métodos de diagnóstico a nivel molecular, conduciría en última instancia al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Además son la base de la futura medicina personalizada para cada paciente gracias a los estudios farmacogenéticos.

Así pues el estudio de nuevos genes candidatos implicados en la predisposición genética a la enfermedad inflamatoria intestinal, se presenta como un campo de investigación apasionante y necesario para un mejor conocimiento de los complejos mecanismos que intervienen en esta patología.

Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo ha sido la identificación de nuevos genes relacionados con la susceptibilidad/protección a la enfermedad inflamatoria intestinal. Para ello se ha seguido una estrategia basada en estudios de asociación de genes candidatos funcionales y posicionales que se llevó mediante estudios caso control.

Los objetivos concretos planteados fueron los siguientes:

1. Determinar la posible asociación del polimorfismo -94ins/delATTG del gen *NFKB1* en la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal.
2. Estudiar el polimorfismo funcional tipo microsatélite (GT)<sub>n</sub> localizado en la región promotora del gen *FOXP3* y su relación con la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal.
3. Comprobar el papel en la genética de la enfermedad inflamatoria intestinal del polimorfismo funcional -1858 C/T del gen *PTPN22*, el cual se ha asociado con predisposición a autoinmunidad.
4. Determinar la posible influencia de las variantes tipo microsatélite (TAAA)<sub>n</sub> y (CCTTT)<sub>n</sub> del gen *NOS2A* y los SNPs -786 T/C y +894 G/T del gen *NOS3* en la predisposición genética a la enfermedad de Crohn.
5. Investigar la implicación de los polimorfismos de la región promotora -173 G/C y el microsatélite (CATT)<sub>n</sub> del gen *MIF* y su relación con la susceptibilidad genética a la enfermedad inflamatoria intestinal.
6. Establecer si los polimorfismos del gen *IL23R* juegan un papel relevante en la susceptibilidad/severidad de la enfermedad de Crohn.
7. Estudiar en relación a la genética de la enfermedad inflamatoria intestinal los polimorfismos del gen *MYO9B*.

## **4. DISCUSIÓN**

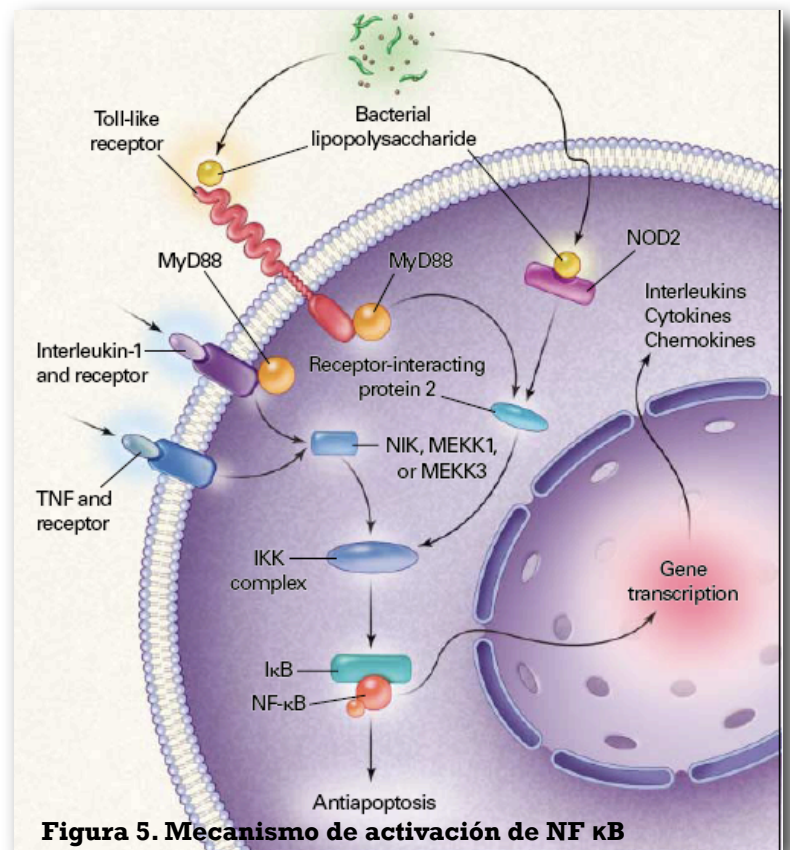
## Genes Estudiados relacionados con la respuesta inflamatoria en la EII

### Nuclear Factor Kappa-B, Subunit 1; *NFKB1*

<b>NOMBRE GEN</b>	<i>NFKB1</i>
<b>LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA</b>	4q24
<b>FUNCIÓN</b>	Factor de Transcripción
<b>NOMBRE PROTEÍNA</b>	NFkb subunidad p50
<b>POLIMORFISMOS ANALIZADOS</b>	rs28362491 (-94 ins/del ATTG)
<b>VARIANTE</b>	inserción/delección

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B, es uno de los factores de transcripción más destacados en la regulación de la respuesta inmune innata y adquirida. Está formado por heterodímeros codificados por los genes *RELA* (p65), *NFKB1* (p50;p105), *NFKB2* (p52;p100), *c-REL* y *REL*, los cuales componen la familia NF- $\kappa$ B/REL [118]. La forma activada de NF- $\kappa$ B está constituida por un heterodímero de p65 unido a p50-52 cuya localización es citoplasmática y suele estar asociado con el complejo proteico que lo inhibe (I $\kappa$ Bs). La activación de NF- $\kappa$ B ocurre rápidamente en respuesta a estímulos muy diversos como la unión de patógenos a receptores de superficie (vía receptores tipo Toll), la inducción por citoquinas (TNF- $\alpha$  e IL-1) o tras la activación del receptor de células T (TCR). En todos los casos se produce la fosforilación, ubiquitinación y degradación de las proteínas I $\kappa$ B, que posibilitan la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo. Una vez en el núcleo, NF- $\kappa$ B inicia la transcripción de numerosos genes implicados en procesos inflamatorios, como citoquinas (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ ), quimioquinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas o el gen *NOS2A* [119] (figura 5). Son numerosas las enfermedades autoinmunes en las que NF- $\kappa$ B se encuentra activado, como la artritis reumatoide (AR), la enfermedad celíaca (E.cel) o la esclerosis múltiple (EM) [119]. En la enfermedad inflamatoria intestinal también se ha

identificado una activación persistente de NF- $\kappa$ B con elevados niveles de las subunidades que lo constituyen (p50/p65) y una alta actividad de unión al ADN [120]. Por tanto este factor de transcripción podría ser un importante modulador de la respuesta inflamatoria en la enfermedad inflamatoria intestinal, tanto a nivel molecular como genético.



**Figura 5. Mecanismo de activación de NF  $\kappa$ B**

En la región promotora del gen *NFKB1* se ha descrito recientemente una inserción/delección (-94ins/delATTG), situada entre dos elementos reguladores (sitio de unión AP-1 y sitio de unión  $\kappa$ B), asociada con la susceptibilidad a colitis ulcerosa [121] en la población de EEUU. La presencia de la delección de 4 pb parece causar la pérdida de capacidad de unión a proteínas nucleares y en consecuencia daría lugar a una menor actividad del promotor [121].

Los resultados obtenidos en nuestro extenso estudio caso-control demostraron por primera vez que el polimorfismo -94ins/delATTG no estaba asociado a la susceptibilidad genética a la enfermedad inflamatoria intestinal en nuestra población. Es especialmente destacable el resultado obtenido en colitis ulcerosa, ya que contradice los hechos descritos en el primer estudio [121]. Dicha controversia pone de manifiesto la importancia de los estudios replicativos en genética humana. Las posibles causas que explican para explicar las diferencias entre los distintos estudios las podemos encontrar en la propia estructura genética de la población, hábitos de vida,

mezclas poblacionales o posibles problemas metodológicos derivados de un bajo poder estadístico al sesgar el tamaño muestral.

Hasta la fecha se han realizado varios estudios en diferentes poblaciones, mostrando que ni en la población británica ni en la germana [122], al igual que en nuestra población, no se reproducen los datos obtenidos por Karban et al [121] en el primer análisis. Por el contrario un estudio realizado por un grupo holandés [123] sí muestran asociación con la colitis ulcerosa. Las diferencias encontradas entre estos estudios se podrían explicar por la presencia de otras variantes en desequilibrio de ligamiento parcial con el polimorfismo -94ins/del ATTG que pudieran ser las variantes causales responsables de la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal. Por otro lado variaciones en un haplotipo ancestral modificado según la historia de cada población podría explicar estas diferencias. En tercer lugar, podría ser debido a la propia heterogeneidad de la enfermedad, pudiendo estar realmente asociado a un subtipo concreto más frecuente en unas poblaciones que en otras. Finalmente, un reciente meta-análisis realizado con todos los datos de los estudios indica, de acuerdo con nuestros resultados que realmente no existe asociación del polimorfismo -94ins/delATTG con la colitis ulcerosa [124].



## **Protein Tyrosine Phosphatase, nonreceptor-type,22 *PTPN22***

<b>NOMBRE GEN</b>	<i>PTPN22</i>
<b>LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA</b>	1p13.2
<b>FUNCIÓN</b>	Fosfatasa de tirosinas
<b>NOMBRE PROTEÍNA</b>	LYP
<b>POLIMORFISMOS ANALIZADOS</b>	rs2476601 ( 1858 C/T, R620W)
<b>VARIANTE</b>	SNPs

La fosforilación de proteínas sobre residuos de tirosina es uno de los mecanismos principales de modulación de la transducción de señales. Esta es una reacción reversible en la que intervienen dos tipos de enzimas, las PTKs (protein tyrosine kinase) que fosforilan los residuos de tirosina, y las PTPs (protein tyrosine phosphatase) que catalizan la reacción de desfosforilación. Gracias a este mecanismo se regulan numerosos procesos fisiológicos relacionados con la diferenciación celular, morfología, movilidad celular, diferenciación y muerte celular, entre otros [125].

En la literatura encontramos evidencias de que las células del sistema inmunológico expresan altos niveles de fosforilación de tirosinas, los cambios agudos en este sistema pueden afectar a distintos procesos linfocitarios como la activación mediada por la interacción ligando-receptor o la respuesta ante distintos estímulos [126]. Las células T expresan un amplio rango de PTPs, entre ellas, recientemente se ha descrito una fosfatasa específica de linfocitos *PTPN22* o *lyp*, que ha suscitado un gran interés. *Lyp* es una proteína intracelular implicada en la señalización a través del TCR ya que se une físicamente, mediante un motivo rico en prolina (P1), al dominio SH3 de la quinasa *Csk*, e inhibe la transducción de señales atenuando la activación de las células T [127].

En el gen *PTPN22* se ha descrito una mutación no sinónima que afecta al motivo P1 de la enzima, consistente en un cambio de arginina por triptofano (1858 C/T, R620W). Esta variante se ha convertido en la asociación genética más reproducible, tras el HLA, en enfermedades autoinmunes tales como DT1, AR, LES y enfermedad de Graves (GD) en poblaciones caucásicas [128-134]. De hecho su implicación en enfermedades autoinmunes tanto sistémicas como órgano-específicas ha hecho que se proponga el polimorfismo 1558 C/T del gen *PTPN22* como un marcador genético común de autoinmunidad [135]. Varios estudios funcionales han aseverado que el alelo de riesgo 620W parece estar implicado en la actividad de la enzima *PTPN22* de dos formas diferentes. Se postuló en un principio que al alterar la capacidad de unión de Lyp con Csk se podría generar una hiperactivación de la respuesta T patogénica, dando lugar a procesos autoinmunes [136]. En contraposición, datos

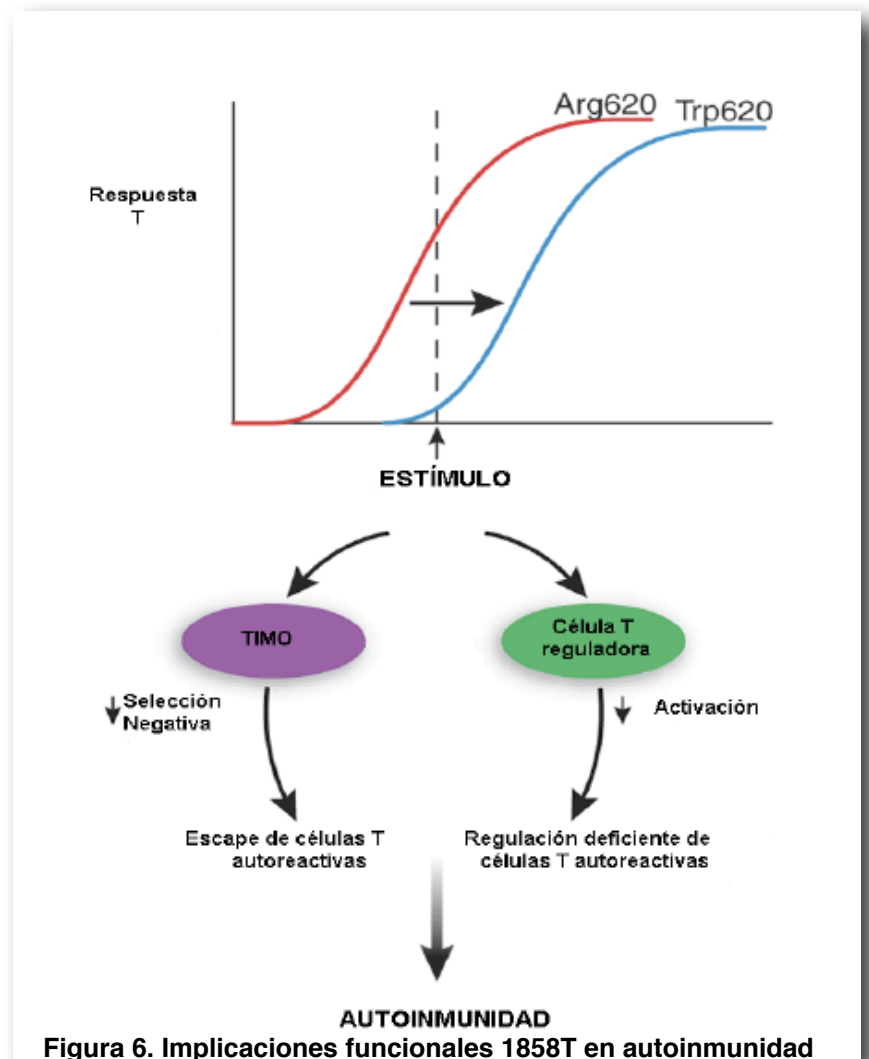


Figura 6. Implicaciones funcionales 1858T en autoinmunidad

recientes han aportado una nueva visión de la funcionalidad de la mutación, al demostrarse que puede causar un aumento en la actividad fosfatasa, inhibiendo potentemente la señalización mediante Csk [137]. Aún no está claro cómo este aumento en la capacidad enzimática de *PTPN22* podría redundar en la aparición de

enfermedades autoinmunes, pero se baraja la posibilidad de que pueda afectar a la selección tímica y a la actividad de las células T reguladoras [137](figura 6).

Nuestro trabajo es el primer estudio genético de asociación entre el polimorfismo 1858 C/T del gen *PTPN22* y la enfermedad inflamatoria intestinal[138] [154]. Se realizó en dos cohortes de pacientes independientes, una procedente del sur de España (Granada y Cádiz) y la otra de Madrid.

Los resultados obtenidos no mostraron asociación estadísticamente significativa del polimorfismo 1858 C/T con la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal. La tendencia observada en nuestra población se ha confirmado en otros estudios en cohortes diferentes, así como en diversos meta-análisis realizados con todos los datos publicados hasta el momento [139-141]. Al igual que para la enfermedad inflamatoria intestinal, la variante genética 1858 C/T del gen *PTPN22* no se ha encontrada asociada a otras enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, enfermedad celíaca o la espondilitis anquilosante (EA) [132, 142, 143]. Estas diferencias entre diferentes enfermedades autoinmunes han determinado que el papel de *PTPN22* está al parecer relacionado con enfermedades en las que la producción de autoanticuerpos es importante [144].

Aunque está ampliamente demostrado y aceptado que existe un origen genético común de las enfermedades autoinmunes, también deben existir, obviamente variantes genéticas específicas de cada enfermedad y por ende polimorfismos que afecten sólo a un subconjunto de las enfermedades autoinmunes, como es el caso aquí expuesto. Por otro lado la proteína *PTPN22* podría presentar una actividad reguladora en activación de las células T distinta según el tipo de enfermedad autoinmune. Otra explicación más parsimoniosa, podría incluir un papel importante de otras PTPs, como se ha sugerido recientemente con variantes del gen *PTPN2*, encontrado en relación con la Diabetes tipo 1 [145] y la Enfermedad de Crohn [146].

El descubrimiento de *PTPN22* y el gran número de miembros de la familia PTP en el sistema inmunológico, deja abierta una nueva vía de investigación para el estudio de otras variantes genéticas y su posible asociación con la enfermedad inflamatoria intestinal.

### **Forkhead Box P3; *FOXP3***

<b>NOMBRE GEN</b>	<i>FOXP3</i>
<b>LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA</b>	Xp11.23
<b>FUNCIÓN</b>	Factor de Transcripción
<b>NOMBRE PROTEÍNA</b>	forkhead box P3 (Scurfin)
<b>POLIMORFISMOS ANALIZADOS</b>	(GT) <sub>n</sub> intrón 0
<b>VARIANTE</b>	STR (microsatelite)

Las células T (T reg) reguladoras son un elemento clave en la regulación del proceso inflamatorio. Como se ha descrito previamente, la disminución en el número o en la actividad supresora de las células T reg puede provocar la aparición de enfermedades autoinmunes así como la alteración de otros procesos inmunológicos, como la inmunidad tumoral, la alergia o el rechazo de transplantes[147-149].

Por definición las células T reg constituyen una subpoblación de linfocitos de T CD4+ producidos por el sistema inmune. Se caracterizan por la expresión constitutiva de la molécula de superficie CD25 y por la expresión específica del factor de transcripción FOXP3, el cual es clave para su desarrollo y su actividad funcional (figura 7).

En el sistema inmune intestinal no se conoce con exactitud el papel de las células T reg, aunque los datos obtenidos sugieren que pueden estar controlando la respuesta inflamatoria inducida tanto por la respuesta inmune innata como por la respuesta inmune adquirida, mediante mecanismos dependientes de la secreción de IL-10 y de TGF- $\beta$  [150].

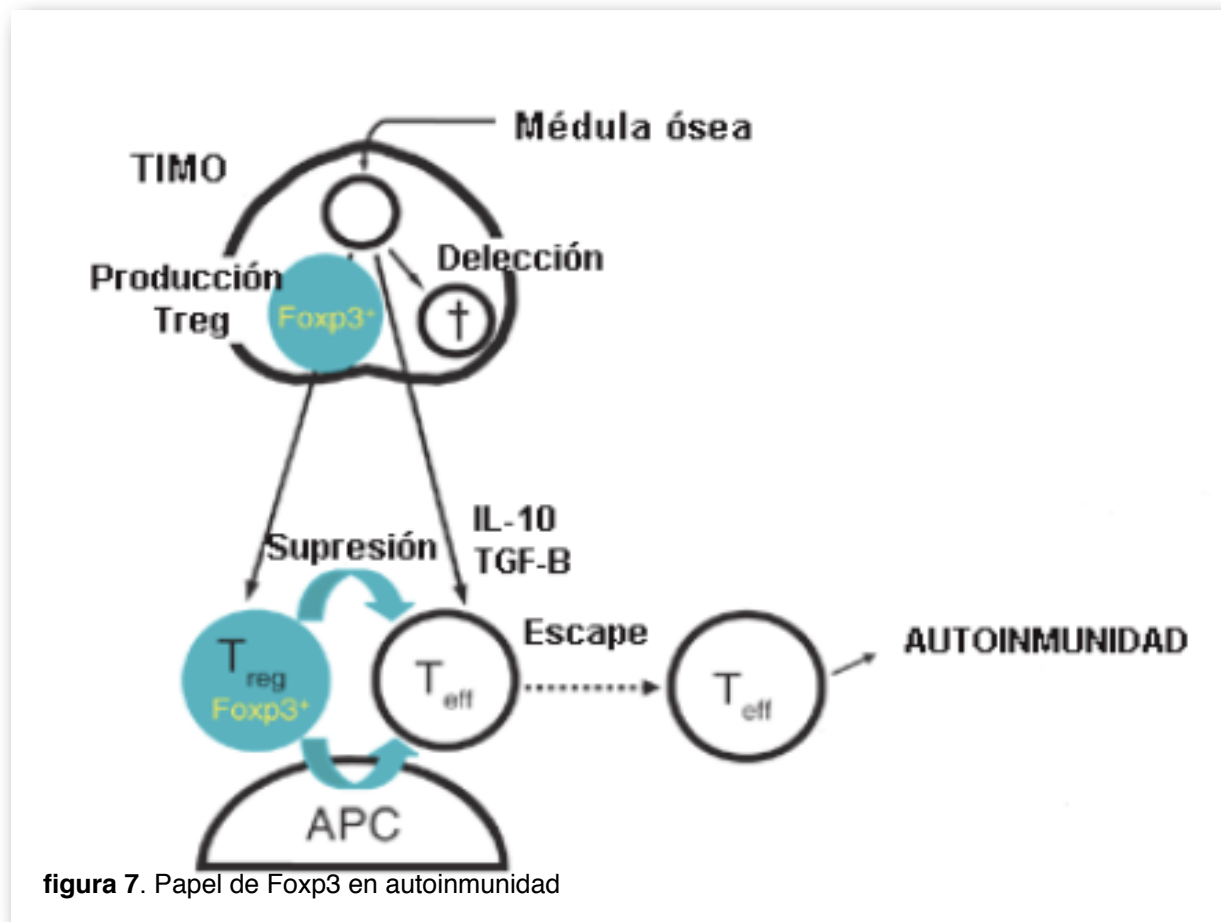


figura 7. Papel de Fxp3 en autoinmunidad

El gen *FOXP3* pertenece a la familia de factores de “transcripción forkhead winged-helix”. Su activación induce la expresión de moléculas asociadas al fenotipo y la actividad de las células Treg, como CD25 y CTLA-4[151]. Por lo tanto, es un regulador crítico de la actividad de las células Treg y por ello de la homeostasis del sistema inmune; de tal forma que cualquier alteración de los niveles de expresión del gen *FOXP3* podría desencadenar procesos autoinmunes. De hecho, la alteración genética de este importante regulador se ha asociado con la presencia de patologías muy graves, como el síndrome IPEX (X linked immunodeficiency) causado por mutaciones recesivas en *FOXP3* y que se encuentra asociado con la aparición de DT1 y enfermedad inflamatoria intestinal [152].

A parte de los polimorfismos que provocan IPEX se ha descrito otra variante, un microsatélite de repeticiones (GT)<sub>n</sub>, en el promotor del gen *FOXP3* que parece estar

afectando a los niveles de expresión del gen y que se asoció en un principio con susceptibilidad a la DT1 en la población japonesa [153][169]. En vista de estos datos, decidimos estudiar la posible influencia del gen *FOXP3* en la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal por medio del marcador genético (GT)<sub>n</sub>.

Nuestros resultados no revelaron asociación de ninguno de los alelos del microsatélite (GT)<sub>n</sub> del gen *FOXP3* con la predisposición genética a enfermedad inflamatoria intestinal [154]. Se observó una tendencia en los pacientes de colitis ulcerosa que no fue suficiente para ser estadísticamente significativa tras la corrección de Bonferroni. A la vez que para la enfermedad inflamatoria intestinal, se estudió su relevancia en la susceptibilidad genética a la AR, el LES y la E cel, confirmándose la falta de asociación del microsatélite (GT)<sub>n</sub> con estas patologías [154]. De acuerdo con lo observado en nuestra población, en un estudio llevado a cabo en otra población caucásica, tampoco se pudo replicar la asociación del microsatélite (GT)<sub>n</sub> con susceptibilidad a la DT1 [155, 156]. Recientemente se han descubierto y analizado otros marcadores genéticos del gen *FOXP3* en la enfermedad de Crohn [157], la enfermedad de Graves y la enfermedad de Addison [158]. mostrándose nuevamente que los polimorfismos hasta ahora analizados del gen *FOXP3* no están implicados en estas patologías autoinmunes.

La discordancia obtenida entre los estudios de poblaciones caucásicas y asiáticas podrían deberse a las diferencias étnicas entre ambas poblaciones. De hecho se observó que la distribución de los alelos del microsatélite (GT)<sub>n</sub> en nuestra población era significativamente distinta con respecto a la población japonesa [154]. En cuanto a la actividad funcional del microsatélite (GT)<sub>n</sub> conviene ser cautos, además de hacer más experimentos y tener en cuenta la posible existencia de otros marcadores genéticos en desequilibrio de ligamiento con dicho microsatélite que podrían ser los verdaderos causantes de las alteraciones en la expresión del gen *FOXP3*. Por tanto

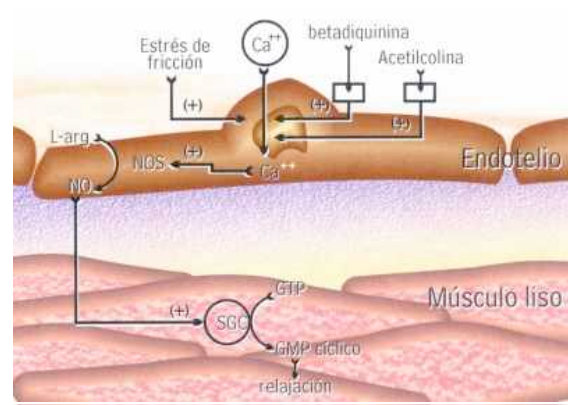
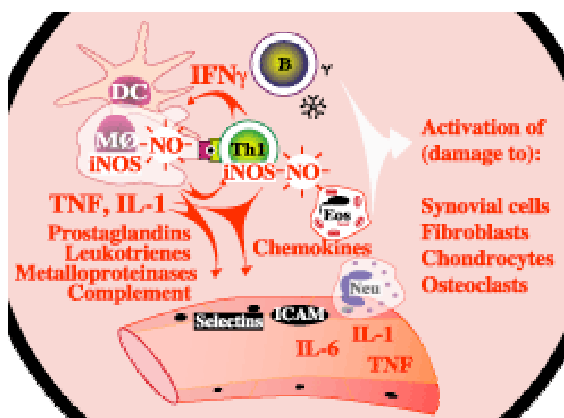
nuestros datos, junto con los obtenidos por el resto de grupos, descartaría la implicación del gen *FOXP3* como marcador genético de predisposición a enfermedades autoinmunes, al menos en poblaciones de origen caucásico. Sin embargo, dada la obvia implicación del factor de transcripción *FOXP3* en la regulación de los procesos autoinmunes, no descartamos la posibilidad de que otros marcadores genéticos puedan afectar la expresión de este gen.



## Nitric Oxide Synthase 2A; *NOS2A* y Nitric Oxide Synthase 3; *NOS3*

<b>NOMBRE GEN</b>	<i>NOS2A</i>	<i>NOS3</i>
<b>LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA</b>	17q11.2	7q36.1
<b>FUNCIÓN</b>	óxido nítrico sintasa inducible	óxido nítrico sintasa endotelial
<b>NOMBRE PROTEÍNA</b>	iNOS	eNOS
<b>POLIMORFISMOS ANALIZADOS</b>	rs28998792 (-/TTTA) (CCTTT) <sub>n</sub>	rs11771443 (-786 T/C) rs1799983(+894 G/T E298D)
<b>VARIANTES</b>	inserción/delección STR (Microsatélite)	SNPs

El óxido nítrico (ON) es un importante mediador inflamatorio. Desde su descubrimiento como modulador de la permeabilidad endotelial se ha visto implicado en numerosas patologías [159]. Con respecto a la enfermedad inflamatoria intestinal, se ha probado que el ON es uno de los factores implicados en el desencadenamiento de brotes de la enfermedad. Se ha relacionado un aumento en la producción de ON con la inflamación intestinal crónica [160, 161], no se conoce el papel exacto que juega el ON en la patogénesis de dicha enfermedad. De hecho el ON está íntimamente ligado al estrés oxidativo [162], así como a los mecanismos antibacterianos de los fagocitos [179] y a la señalización de la apoptosis [163], procesos involucrados en la enfermedad inflamatoria intestinal.



**Figuras 8 y 9.** Mecanismo de acción de iNOS y eNOS

Los estudios realizados en los pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal muestran que cuando la enfermedad está activa los niveles de ON son de dos a cinco veces superiores a los de individuos sanos o enfermos en fase de remisión [164, 165]. Las enzimas responsables de la producción de ON son las óxido nítrico sintasas, familia compuesta por tres miembros: la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Mientras el ON generado por la eNOS está relacionado con el mantenimiento del flujo sanguíneo en la mucosa y con la motilidad gástrica, en los focos inflamatorios la iNOS es responsable del aumento en la concentración de ON inducida por citoquinas, por el lipopolisacárido bacteriano, y por el TNF- $\alpha$  [166], todos relacionados con la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal.

En la actualidad el planteamiento más aceptado es que el ON podría tener un efecto protector, sin embargo, las grandes cantidades liberadas por la iNOS tendrían efectos lesivos [160, 167].

Para medir la posible contribución genética de las enzimas iNOS y eNOS en la enfermedad inflamatoria intestinal seleccionamos los genes *NOS2A* (iNOS) y *NOS3* (eNOS). Dentro de ellos se realizó una búsqueda de polimorfismos previamente descritos y con relevancia funcional ya contrastada o bien asociados a otras patologías relacionadas. Los marcadores analizados fueron la inserción/delección TAAA [168, 169] y el microsatélite (CCTTT)<sub>n</sub> [170] ambos situados en la región promotora del gen *NOS2A*. Por su parte, para el estudio del gen *NOS3*, se seleccionaron las variantes tipo SNP -786 T/C [171] y el SNP localizado en el exón 7, +894G/T [172].

Nuestros resultados no mostraron asociación genética de ninguno de los polimorfismos analizados en los genes *NOS2A* y *NOS3* con la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal. La práctica ausencia de desequilibrio de

ligamiento entre los marcadores del gen *NOS2A* pone de manifiesto las evidencias previas que describen esta región como inestable y con una elevada tasa de mutación para ser una región reguladora de un gen [173].

De manera interesante, un estudio posterior realizado en otra población española de enfermedad inflamatoria intestinal [174] confirma nuestros resultados, pero además ha encontrado asociación del gen *NOS2A* con la susceptibilidad a la enfermedad inflamatoria intestinal. Dicha asociación fue posible analizando otros marcadores a lo largo de todo el gen y eliminando del haplotipo los marcadores (CCTTT)<sub>n</sub> y (TAAA)<sub>n</sub>. Si bien es interesante el hallazgo, estos polimorfismos encontrados en asociación con la enfermedad no explican aun las diferencias en los niveles de expresión de ON encontradas en los pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal, ya que carecen de estudios funcionales.

Una posible explicación para las variaciones en la expresión génica no debidas a polimorfismos situados en las regiones promotoras podría involucrar mecanismos de regulación post-transcripcionales y post-traduccionales. También podría jugar un papel determinante una estabilidad de unión diferencial de factores de transcripción a la región promotora, como se detectó en el caso de *SLC22A4* en relación a la enfermedad de Crohn [175][191].

## Macrophage Migration Inhibitory Factor. *MIF*

<b>NOMBRE GEN</b>	<i>MIF</i>
<b>LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA</b>	22q11.23
<b>FUNCIÓN</b>	Citoquina proinflamatoria
<b>NOMBRE PROTEÍNA</b>	MIF
<b>POLIMORFISMOS ANALIZADOS</b>	-173 G/C (CATT) <sub>n</sub>
<b>VARIANTES</b>	SNPs STR (microsatelite)

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citoquina inmunoreguladora que tiene actividades proinflamatorias, hormonales y enzimáticas. Es un hecho ya evidenciado que las citoquinas proinflamatorias están involucradas en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal, especialmente en la exacerbación de la enfermedad [1, 2, 176, 177].

En el sistema inmunológico se ha observado que un gran número de células que expresan MIF, como macrófagos, células B y T, entre otras [178-180]. Los modelos murinos nos aportan una valiosa información a cerca de la relación entre MIF y la enfermedad inflamatoria intestinal, ya que los ratones deficientes en MIF no

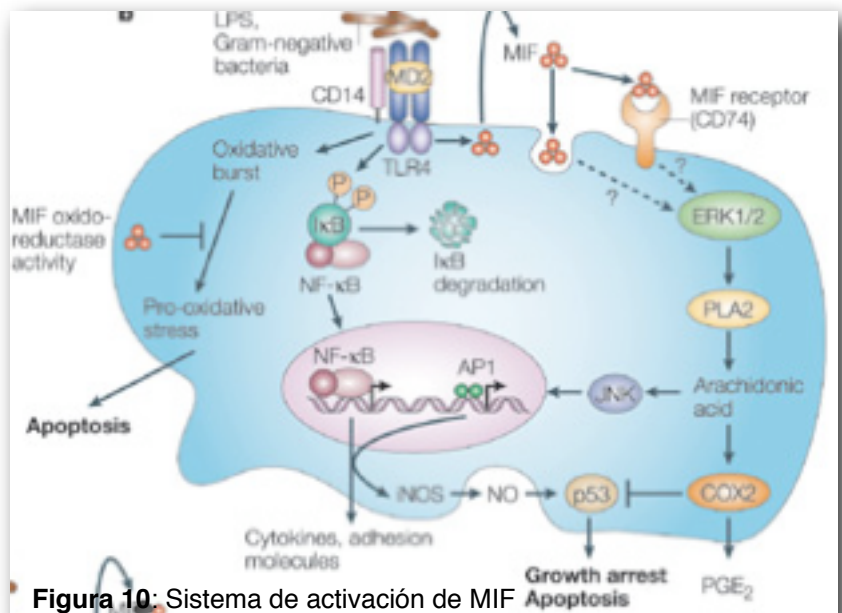


Figura 10: Sistema de activación de MIF

desarrollan la enfermedad y los que poseen una mayor expresión la desarrollan, reduciéndose ésta tras un bloqueo con anticuerpos anti-MIF [181]. Los estudios de

expresión realizados en humanos han reflejado un significativo aumento de MIF en pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal [181-183]. Este aumento podría provocar la inmovilización de los macrófagos y facilitar su localización en la mucosa intestinal, con la posterior producción de citoquinas inflamatorias. MIF, además, puede provocar la activación de las células dendríticas [184] que, junto con las citoquinas inflamatorias, están implicadas en la supervivencia de las células T activadas y en el mantenimiento de una mucosa intestinal inflamada en un ambiente como el desarrollado por los pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal. Por lo tanto la pérdida de una eficiente regulación de MIF en la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa podría estar contribuyendo a un amplio espectro de respuestas inflamatorias,

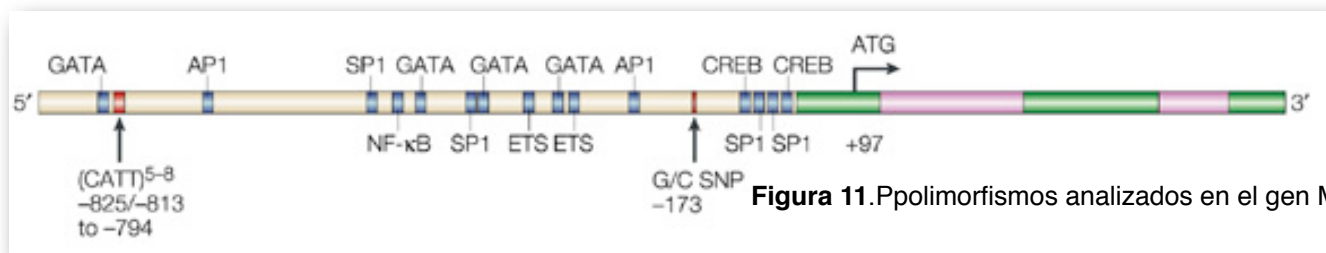


Figura 11. Polimorfismos analizados en el gen MIF

bien de la inmunidad innata bien de la inmunidad adquirida [178, 179].

Para el estudio de la región promotora del gen *MIF* analizamos los polimorfismos *MIF*-173\*C/G y el microsatélite (CATT)*n*. Hemos demostrado que el alelo *MIF* -173\*C está asociado con un incremento de 1,4 en el riesgo de padecer la enfermedad. Aún más, la homocigosidad del alelo *MIF*-173\*C presenta una OR de 1,8 tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa, lo que implica que los efectos del alelo *MIF* -173\*C son dosis dependiente para la predisposición genética a la enfermedad inflamatoria intestinal.

Los datos obtenidos en nuestro estudio [185] indican que MIF está implicado en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta conclusión se apoya en las evidencias previas que muestran que el alelo *MIF*-173\*C está relacionado con un

mayor producción de MIF, tanto *in vitro* como *in vivo* [186], además de la observación de que los niveles de MIF están sobreexpresados en pacientes de colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. [181, 183].

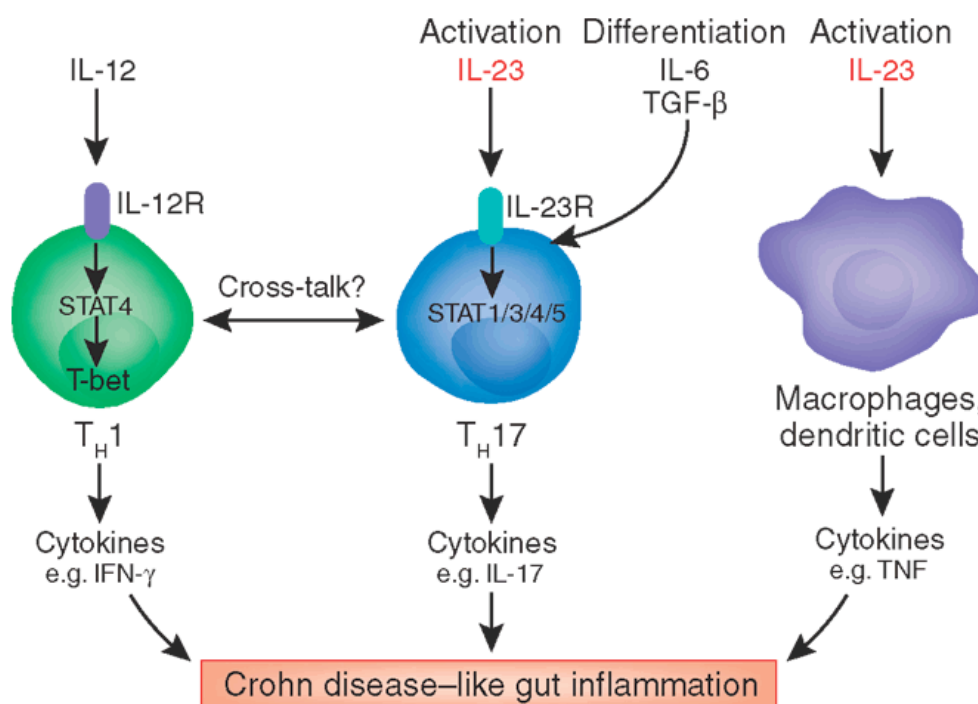
En la literatura existe otro estudio donde se muestra que el alelo *MIF* -173\*C no está asociado a la colitis ulcerosa. Este hecho es fácilmente explicable por las diferencias en las frecuencias alélicas entre las distintas poblaciones, ya que fue realizado en japoneses. Prueba de ello son numerosos ejemplos que muestran que mutaciones tan importantes como *NOD2/CARD15*, *SLC22A4*, *SLC22A5* o *DLG5* están asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal en poblaciones caucásicas y no en la población asiática [187-189].

De los análisis genotipo-fenotipo podemos concluir que MIF parece no estar actuando en las formas más severas de la enfermedad, por lo que se sugiere que está asociado a la susceptibilidad más que a la severidad. De acuerdo con este hallazgo se encuentran las asociaciones previas encontradas con el gen *MIF* y otras patologías autoinmunes, como artritis juvenil idiopática [186], psoriasis [179] o lupus eritematoso sistémico [190], en las cuales está relacionado con la susceptibilidad y no con la severidad de los subgrupos clínicos. Nuestros datos, contribuyen de forma sólida a apoyar la hipótesis de que las enfermedades autoinmunes comparten en alguna medida genes y vías fisiopatológicas comunes.

## Interleukin 23 Receptor. *IL23R*

<b>NOMBRE GEN</b>	IL23R	
<b>LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA</b>	1p31.2	
<b>FUNCIÓN</b>	Receptor Interleucina 23	
<b>NOMBRE PROTEÍNA</b>	IL23R	
<b>POLIMORFISMOS ANALIZADOS</b>	rs1004819 G/A rs7517847 A/C rs10489629 G/A rs11209026 G/A	rs1343151 G/A rs10889677 C/A rs11209032 G/A rs1495965 G/A
<b>VARIANTE</b>	SNPs	

La interleucina 23 (IL-23) es una citoquina descubierta recientemente que tiene estructura y funciones semejantes a la citoquina proinflamatoria IL-12. Se ha observado que es secretada principalmente por células dendríticas activadas, monocitos y



macrófagos. Los modelos murinos de enfermedad inflamatoria intestinal muestran que la IL-23 juega un papel fundamental en la inflamación crónica intestinal [191] y que al bloquearla reduce la enfermedad. Su capacidad proinflamatoria es debida a su papel

en la regulación de las células Th17, las cuales secretan citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , e IL-22, entre otras. Probablemente la IL-23 esté creando un “loop” autocrino en el sistema inmune innato, que dirige la producción de mediadores proinflamatorios que contribuyen a la respuesta inflamatoria intestinal [192].

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el gen de la IL23 no es polimorfo en nuestra población, por ello, se decidió abordar un estudio replicativo del receptor (IL23R) de dicha citoquina. [193].

Para analizar el análisis del gen *IL23R* seleccionamos 8 variantes genéticas a lo largo de todo el gen aplicando un criterio de Tag SNPs, basado en datos obtenidos en HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Gracias a esta estrategia se puede recoger toda la información genética de un haplotipo con el análisis de unos pocos SNPs representativos de dichos haplotipos.

Nuestros datos mostraron que el marcador más fuertemente asociado con protección a la enfermedad inflamatoria intestinal, ha sido el rs11209026, ( $p=1E-03$ , OR 0.3 IC. 0.1-0.7). Este polimorfismo provoca un cambio de aminoácido de arginina a glutamina, que afecta al residuo 50 de la proteína, concretamente se sitúa en la región inicial de la porción intracitoplasmática del receptor. Aún son necesarios estudios funcionales para determinar si este polimorfismo provoca una pérdida o ganancia de función. El resto de polimorfismos asociados también confieren protección frente a la enfermedad, hecho demostrado en el estudio de independencia realizado al estratificar por el polimorfismo rs11209026. Esto pone de manifiesto la importancia de los distintos *splicing* alternativos, es decir, que el grado de protección varía según el número de alelos portados por cada individuo de forma independiente a pesar de formar un bloque haplotípico bien definido.

Para completar el estudio se realizó un análisis de interacción génica con *NOD2*/*CARD15*, no encontrándose diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y



genotípicas tras la agrupación por *NOD2/CARD15*. Este análisis nos determina la independencia en la segregación de marcadores asociados a la enfermedad. De igual modo se estudió la posible implicación de los marcadores analizados con respecto a los patrones clínicos y aunque se observaron leves diferencias entre los distintos subfenotipos, éstas no llegaron a ser estadísticamente significativas.

Nuestro estudio ha confirmado la asociación previamente descrita en una población Germana [194, 195]. Es importante destacar que recientemente se ha replicado en numerosos estudios [195-203] convirtiéndose en el estudio replicativo más robusto hasta la fecha tras el descubrimiento de *NOD2/CARD15* en el 2001. Por el momento no ha habido ningún grupo que presente resultados contradictorios, incluidas la siempre tan distinta población japonesa [204] y las población pediátrica de enfermedad de Crohn [205, 206].

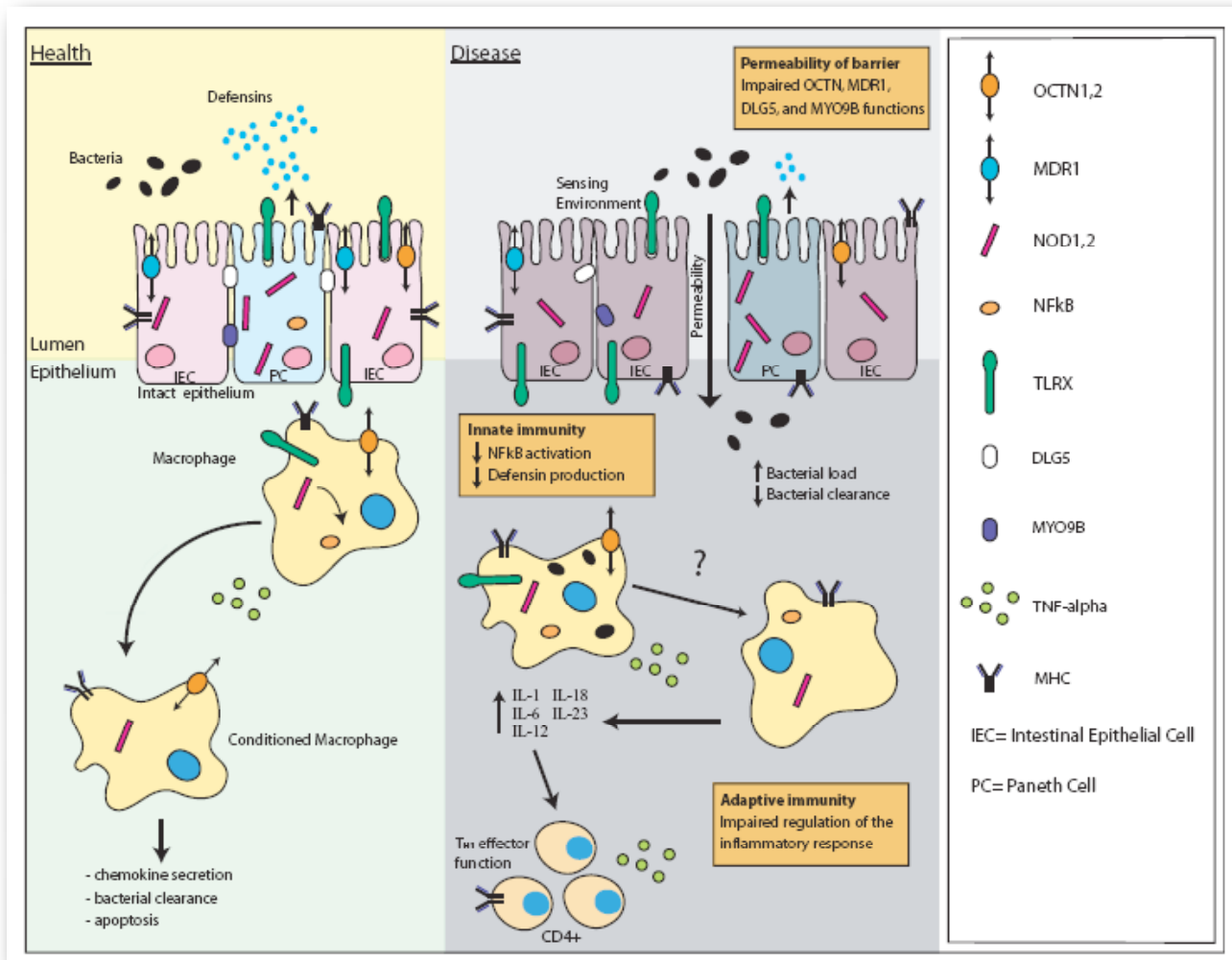
Los resultados obtenidos en los diferentes estudios muestran que los polimorfismos de *IL23R* están asociados tanto a la enfermedad de Crohn como a la colitis ulcerosa, dando así soporte a la teoría que mantiene que ambas patologías comparten genes de susceptibilidad/protección. En el caso de la IL-23 estamos incidiendo sobre una vía fisiopatológica común, no sólo a la enfermedad inflamatoria intestinal, si no también a otras patologías autoinmunes (espondilitis anquilosante psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal) [207] en las que también estos polimorfismos de *IL23R* se han visto asociados. Con estos datos se ha propuesto que *IL23R* podría ser un gen común de susceptibilidad/protección a enfermedades autoinmunes organoespecíficas. Dicha teoría está a su vez avalada por estudios realizados en enfermedades autoinmunes sistémicas como la AR o LES (en los que la presencia de autoanticuerpos es importante y además están asociadas a *PTPN22*), los cuales han resultado negativos para la asociación con *IL23R* [208, 209].



## **MYO9B**

<b>NOMBRE GEN</b>	MYO9B
<b>LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA</b>	19p13.11
<b>FUNCIÓN</b>	Integridad de la barrera intestinal
<b>NOMBRE PROTEÍNA</b>	miosina IXB
	rs2305767, A/G
<b>POLIMORFISMOS ANALIZADOS</b>	rs1457092 C/A
	rs2305764 G/A
<b>VARIANTE</b>	SNPs

La alteración de la permeabilidad de la barrera intestinal es un proceso capital para el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal. Aunque no se conoce con exactitud el papel que puede estar jugando la miosina 9b, se postula que gracias a su capacidad de remodelado del citoesqueleto (mediante su actividad GTPasa dependiente de Rho) ésta puede afectar a las uniones íntimas célula-célula. Además, los estudios de expresión indican que la miosina 9b se expresa en células epiteliales intestinales [210]. Recientemente se han visto asociados polimorfismos en el gen *MYO9B* con la Enfermedad celiaca, en la cual la permeabilidad de la barrera también se encuentra comprometida[211].



Nuestros datos obtenidos tras el análisis de los polimorfismos tipo SNPs rs2305767 (A/G), rs1470902 (C/A) rs2305764 (G/A) indican que están asociados a la Colitis ulcerosa en nuestra población, y por el contrario no están asociados a la enfermedad de Crohn [212].

Por otro lado un estudio reciente llevado a cabo en la población italiana a encontrado asociación con la enfermedad de Crohn y no con la colitis ulcerosa [213], en contraposición con un estudio publicado en la población canadiense de colitis ulcerosa [214]. Por ultimo en un estudio realizado en la población noruega de enfermedad inflamatoria intestinal no se detectó asociación ni con enfermedad de Crohn ni con colitis ulcerosa [215]. La falta de replicabilidad de los estudios hasta ahora realizados en la enfermedad inflamatoria intestinal ,al igual que ha ocurrido en

la enfermedad celíaca, podría ser un reflejo del bajo valor de OR mostrado por los polimorfismos, derivándose en una sobre-estimación del poder estadístico de los estudios. A este respecto nuestro estudio tiene un 68% de poder estadístico para una OR de 1.2, significando un fuerte poder estadístico teniendo en cuenta nuestro tamaño muestral (1306 pacientes). Otra posible explicación la podemos encontrar en la propia heterogeneidad de la enfermedad. La colitis ulcerosa “*per se*” alberga diferentes subgrupos de pacientes, pudiendo mostrar una asociación diferencial de los polimorfismos de la *MYO9B* con algún subgrupo concreto. Tal es así, que si ese subgrupo es más prevalente en una población dada, la asociación de *MYO9B* será más evidente que en otras poblaciones donde dicho subgrupo este menos representado. En nuestro estudio no encontramos diferencias de asociación de *MYO9B* entre los distintos subgrupos clínicos de la enfermedad. Con lo cual esta última teoría sería aplicable para nuestro caso.

El que los polimorfismos del gen *MYO9B* no estén asociado a la enfermedad de Crohn, no es fácilmente explicable, ya que aún no conocemos con exactitud si las funciones de la barrera son diferentes entre enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Cabe destacar que no es la primera vez que se han descrito en la literatura científica diferencias genéticas entre ambas enfermedades, como *NOD2/CARD15* o *ATG1611* que sólo está asociado a la enfermedad de Crohn [101, 216, 217] o *CARD4* [218], solamente asociadas a colitis ulcerosa.

Por lo tanto podemos hipotetizar que el gen *MYO9B* estaría afectando exclusivamente a la susceptibilidad a padecer colitis ulcerosa y que probablemente esté relacionado con la pérdida de tolerancia a agentes ambientales.

## **5. CONCLUSIONES**

1. La inserción/delección -94 ATTG de la región promotora del gen *NFKB1* no está implicada en la susceptibilidad/protección genética a padecer enfermedad inflamatoria intestinal en nuestra población.
2. Nuestro trabajo representa el primer análisis del polimorfismo 1858 C/T del gen *PTPN22* en relación con la enfermedad inflamatoria intestinal y a pesar de haberse considerado como un marcador común de autoinmunidad nuestros resultados no reflejan gran relevancia en la genética de la enfermedad inflamatoria intestinal
3. Los análisis realizados con el microsatélite (GT)<sub>n</sub> de la región promotora del gen *FOXP3* nos permiten descartar a este polimorfismo como un factor de riesgo genético para la enfermedad inflamatoria intestinal.
4. Los polimorfismos (TAAA)<sub>n</sub> y (CTTTT)<sub>n</sub> del gen *NOS2A* y las variantes genéticas tipo SNP -786 T/C y +894 G/T del gen *NOS3* no juegan un papel fundamental en la predisposición genética a la enfermedad inflamatoria intestinal.
5. En nuestra población, el alelo MIF-173\*C se presenta como un marcador genético de susceptibilidad tanto para la enfermedad de Crohn como para la colitis ulcerosa.
6. El análisis de los SNPs y haplotipos estudiados en el gen *IL23R* han revelado su posible papel como nuevos marcadores genéticos de susceptibilidad/protección asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal.
7. Las variantes genéticas analizadas en el gen de la *MYO9B* muestran una asociación diferencial entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.; Mostrándose dicho gen como neutro para la enfermedad de Crohn y como marcador de susceptibilidad para la colitis ulcerosa

## **6. PERSPECTIVAS**



La mayoría de las enfermedades autoinmunes se caracterizan por ser multifactoriales, en dichas enfermedades intervienen tanto factores ambientales como genéticos. La finalidad del trabajo aquí presentado ha sido contribuir modestamente al conocimiento acerca de los genes implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal. Entre ellos cabe destacar los datos obtenidos con los marcadores de los genes *MIF*, *MYO9B* y *IL23R* ya que se han encontrado asociados a la enfermedad confiriendo tanto protección como susceptibilidad genética. No obstante no debemos restar importancia a los resultados de no asociación que son igualmente informativos, puesto que en algunos casos han servido bien para demostrar la heterogeneidad genética y clínica inherente a la enfermedad inflamatoria intestinal o bien para mostrar a la comunidad científica discrepancias entre estudios, ayudando a sí profundizar más en los temas tratados y al mejor entendimiento de los genes estudiados. Además los estudios cuyo resultado es la no asociación sirven a otros investigadores para evitar el consiguiente gasto de recursos y tiempo. No debemos olvidar que los razonamientos y esfuerzos en la selección y análisis de genes siguen los mismos filtros, independientemente del resultado final obtenido, es decir, “es igual de difícil descubrir una región de asociación con una patología que una región de no asociación”. PK Gregersen.

Las hipótesis actuales proponen que debe haber unos pocos genes implicados fuertemente en la patología inflamatoria intestinal y una elevada panoplia de genes que contribuyen con un efecto más modesto. En los últimos años el avance en el conocimiento de la genética de las enfermedades complejas, como la enfermedad inflamatoria intestinal, ha experimentado un crecimiento ciertamente espectacular. La enfermedad de Crohn fue descrita, por el Doctor Crohn et col, en la década de los cuarenta y desde ese momento hasta el año 2005 sólo se había descrito *NOD2/CARD15* como gen implicado y bien caracterizado. A día de hoy, sólo en el año 2007 se

han propuesto más de diez genes candidatos y al menos dos de ellos bien replicados y establecidos.

Aún queda mucho camino por recorrer, debido a que estos hallazgos todavía no permiten conocer ni la contribución exacta de cada uno de los polimorfismos, ni la relación entre los factores genéticos y ambientales que hacen a los individuos susceptibles de padecer dicha enfermedad. Es decir, con los datos existentes aún no podemos determinar de manera fehaciente el modo de herencia .

Para mejorar el conocimiento generado por los estudios genéticos en las enfermedades comunes, se requiere un aumento en el número de muestras, hecho capital para otorgar mayor rigor estadístico a los análisis y poder aumentar la sensibilidad. Gracias al aumento en el número de muestras también se pueden reducir los artefactos estadísticos, propios de las estratificaciones entre las diferentes características clínicas, dando así más valor a los análisis genotipo-fenotipo.

Junto con el incremento en el número de pacientes se ha incrementado en número de variantes que se pueden analizar por muestra, gracias a una mejora en las plataformas de tipaje masivo que en la actualidad permiten analizar marcadores repartidos por todo el genoma de forma más exhaustiva y económica. Los recientemente denominados “estudios del genoma completo”(GWAS), a pesar de cubrir aproximadamente el 60% del genoma humano, están suponiendo una nueva revolución en la genética de la enfermedad inflamatoria intestinal, al igual que en el resto de enfermedades autoinmunes. Gracias a ellos se ha podido determinar fehacientemente que los genes *IL23R* y *ATG16L1* están implicados en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Además se han propuesto otros genes candidatos que están aún por replicar (*PTPN2*, *TNFS15*, desierto génico 5p13, *NCF4*, *IRGM*, *NKX2-3*, *PHOX2B*, *NELL1*). Este revolucionario desarrollo tecnológico es consecuencia del conocimiento generado por el Proyecto Genoma Humano y sus

posteriores sucesores, como el Hapmap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). En la actualidad se pueden establecer estrategias de Tag SNPs que aumentan la cobertura de las regiones a estudiar, basándose en las relaciones de desequilibrio de ligamiento existente entre los marcadores utilizados.

El incremento tanto del número de muestras por estudio como el de marcadores analizados por muestra ha provocado que se desplace el cuello de botella de los análisis genéticos. Ahora el problema no es la selección de marcadores si no la ingente cantidad de datos generados, esto ha provocado una necesidad imperiosa del desarrollo de soportes informáticos adecuados a las nuevas necesidades. Los genetistas tienen en este momento el desafío de dar un sentido biológico plausible a los datos obtenidos y eliminar las posibles correlaciones espurias.

Los análisis del genoma completo no son las únicas fuentes novedosas de conocimiento, aún hay que dilucidar cómo afectan otro tipo de variantes menos estudiadas hasta el momento, nos referimos a variaciones epigenéticas (patrones de metilación) y a variaciones en el número de copias de los genes dentro del genoma, entre otras.

Estas aproximaciones, bajo el prisma de la ciencia básica, sirven para elucidar tanto la arquitectura genética de la enfermedad inflamatoria intestinal, como el modo de herencia de la misma, es decir pueden ayudar a esclarecer las preguntas anteriormente expuestas y que aún siguen siendo un enigma: ¿Qué genes están implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal?, ¿cuál es la contribución genética de cada uno de los alelos implicados en la enfermedad inflamatoria intestinal?, etc.

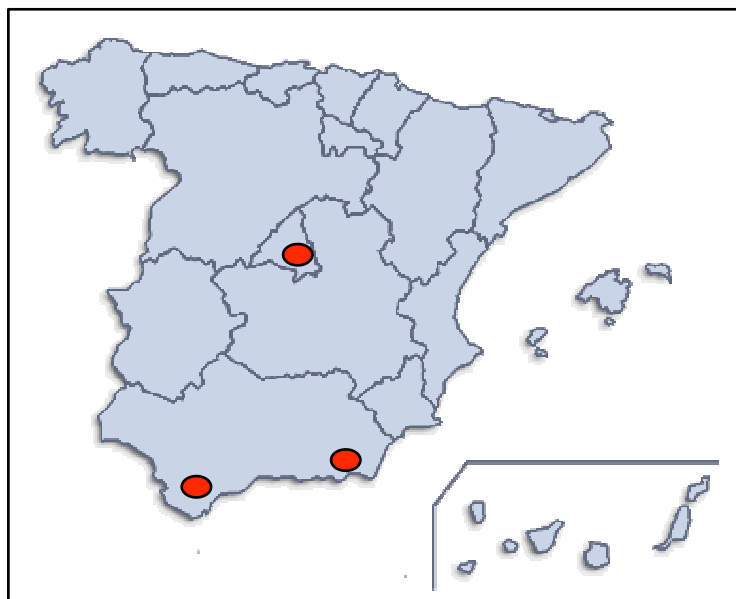
Este conocimiento de ciencia básica tiene su reflejo directo e inmediato en la ciencia aplicada, ya que muchas de las moléculas “descubiertas” gracias a los estudios genéticos son ahora dianas terapéuticas que están en fase de experimentación y sientan el conocimiento para los estudios farmacogenéticos y farmacogenómicos. Estos

esfuerzos están encaminados hacia la realización de una medicina individualizada para cada paciente, basándose en su genotipo y en su capacidad de resistencia a drogas determinadas por su genoma. En un futuro, aunando todos estos estudios se podrá establecer un consejo genético, al igual que ocurre en la actualidad con las enfermedades mendelianas.

## **ANEXO I. MATERIAL Y MÉTODOS**

## **PACIENTES Y CONTROLES**

El número de pacientes ha ido variando a lo largo de los estudios debido a que la recolección de muestras se ha realizado de forma simultánea a los estudios genéticos. La cohorte de pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal provenientes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves Granada, fue obtenida gracias a la colaboración de la doctora María Rosario Gómez García. La cohorte de pacientes y controles de Cádiz ha sido obtenida gracias a la inestimable colaboración de los servicios de Inmunología y Digestivo del Hospital Puerta del Mar, Cádiz. Eventualmente se ha contado con un tercer grupo de pacientes y controles del servicio de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

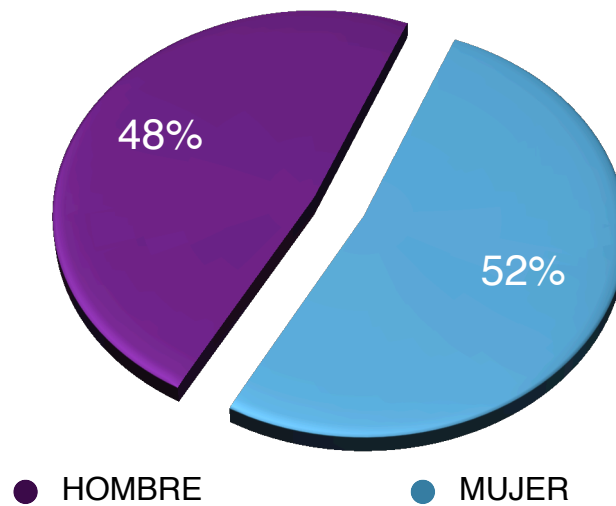


Como población sana se han seleccionado aproximadamente 450 individuos anónimos del centro de transfusión sanguínea de Granada. Fueron seleccionados bajo los criterios de edad y sexo para que resultasen lo más parecidos posible a la población de enfermos.

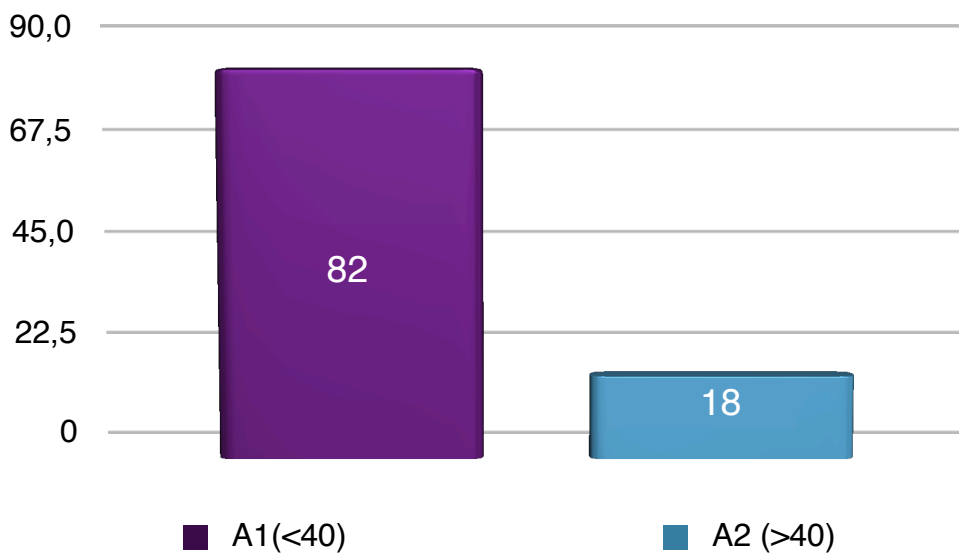
**Descripción de la población de pacientes de EII.**

**Enfermedad de Crohn:**

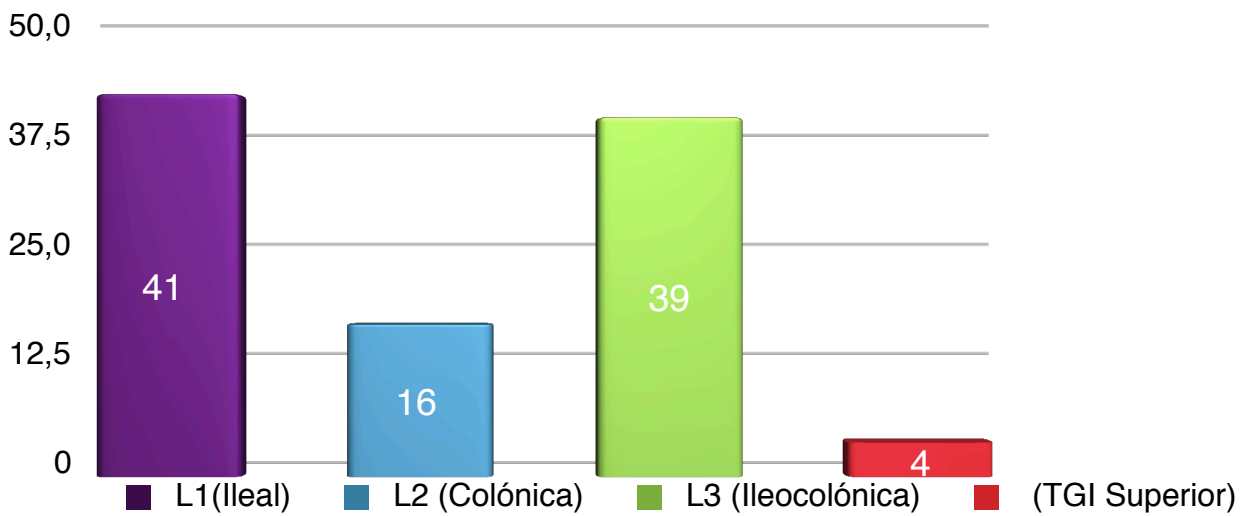
**Figura 9:** distribución de sexos en los pacientes de EC en la población analizada.



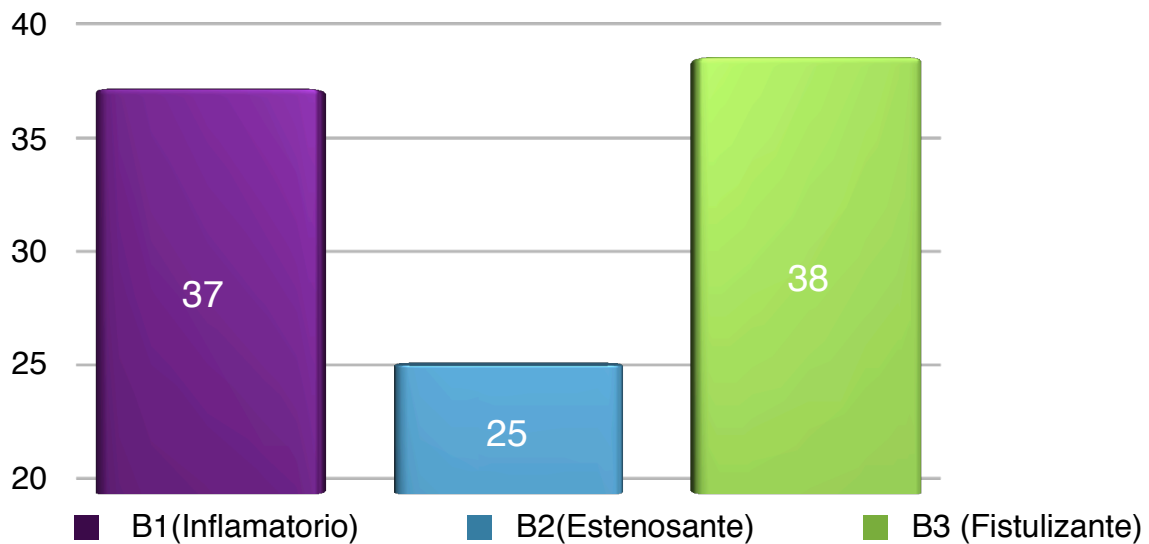
**Figura 10.** Distribución de pacientes de EC según la edad de comienzo (A1<40, A2>40) (%)



**Figura 11:** la gráfica muestra el porcentaje de distribución de los pacientes de EC (%) según localización de la enfermedad

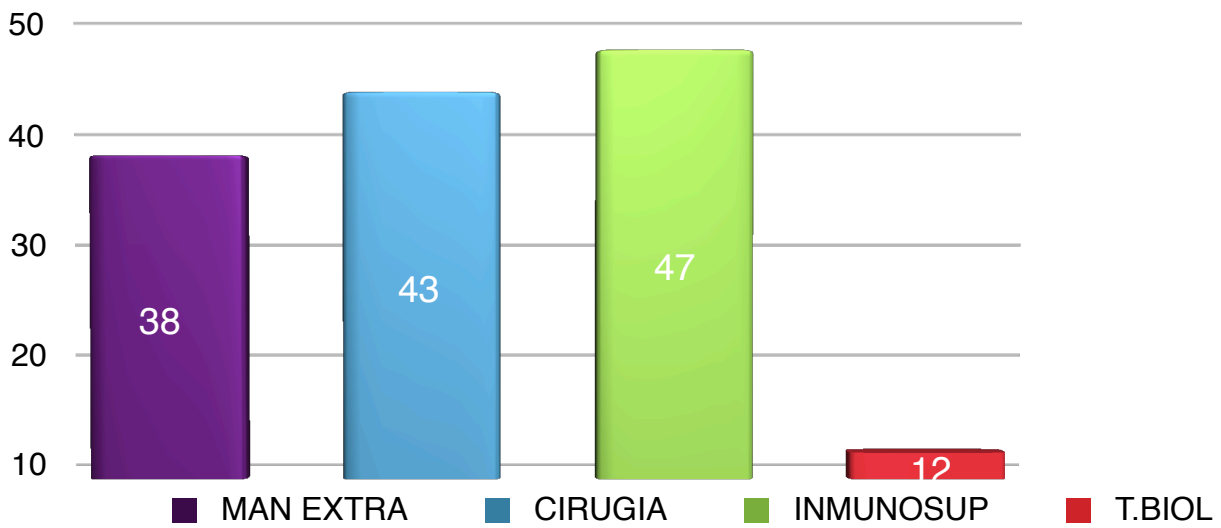


**Figura 12.** Distribución del comportamiento de los pacientes de EC expresado en %



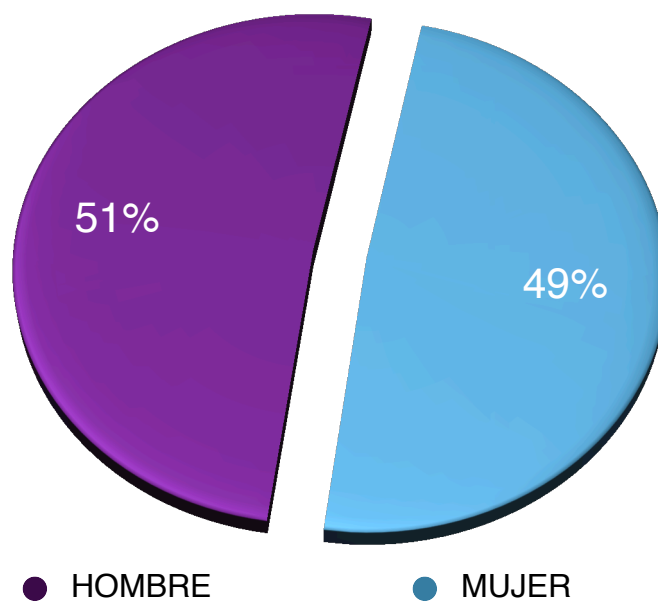


**Figura 13:** Distribución de pacientes con Manifestaciones extradigestivas, Cirugía, inmunosupresión y terapia biológica (%)

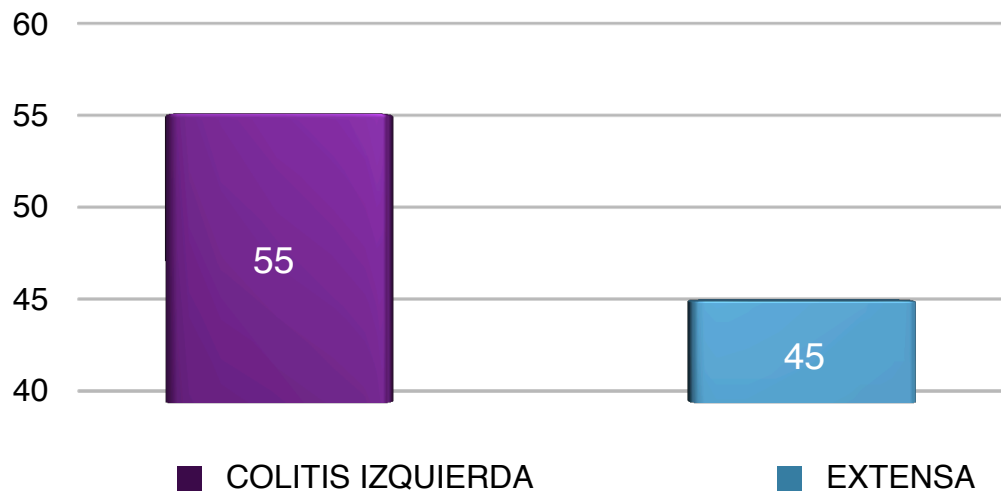


**Colitis ulcerosa:**

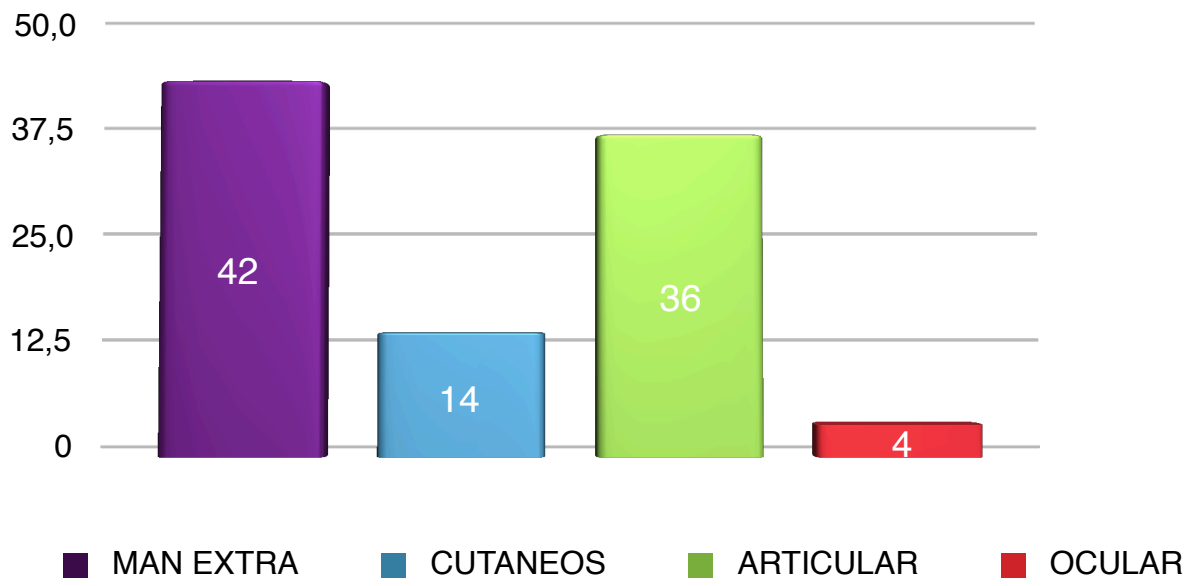
**Figura 14.** Distribución de sexo en pacientes de colitis ulcerosa (%)



**Figura 15.** Porcentaje de pacientes de colitis ulcerosa según su la localización de la enfermedad.



**Figura 16:** Manifestaciones extradiigestivas en pacientes de Colitis ulcerosa (%). el 42 % de los pacientes de colitis ulcerosa presentan manifestaciones extradiigestivas de las cuales las más frecuentes con un 36% son las articulares.



## EXTRACCIÓN DE ADN Y MÉTODOS DE TIPAJE.

La obtención de ADN a partir de sangre periférica se realizó mediante métodos estándar de extracción de ácidos nucleicos. Tras ello, para medir la calidad y el rendimiento de la extracción se realizaron medidas de Espectrofotometría, ajustándose cada una de las muestras a una concentración final de trabajo de 0.05 ng/ $\mu$ l.

Según los polimorfismos a analizar se determinó la mejor estrategia de tipaje para cada uno de ellos. Las técnicas utilizadas han sido:

PCR a tiempo real mediante sondas Taqman. Las reacciones de PCR constaron de los siguientes reactivos y concentraciones finales:

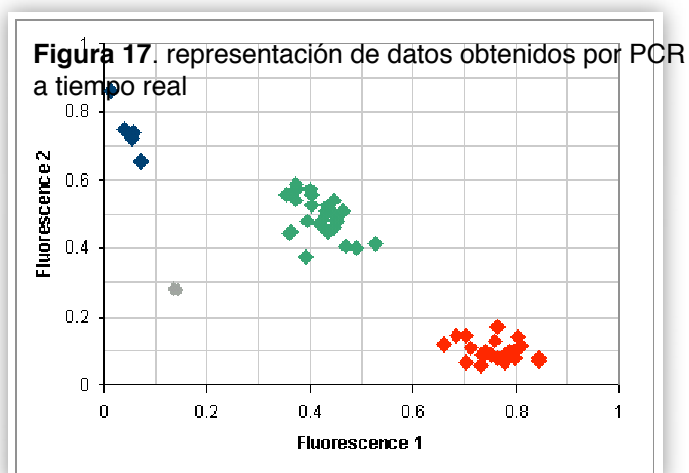
8 ng de ADN

2.5  $\mu$ l de Taqman master mix

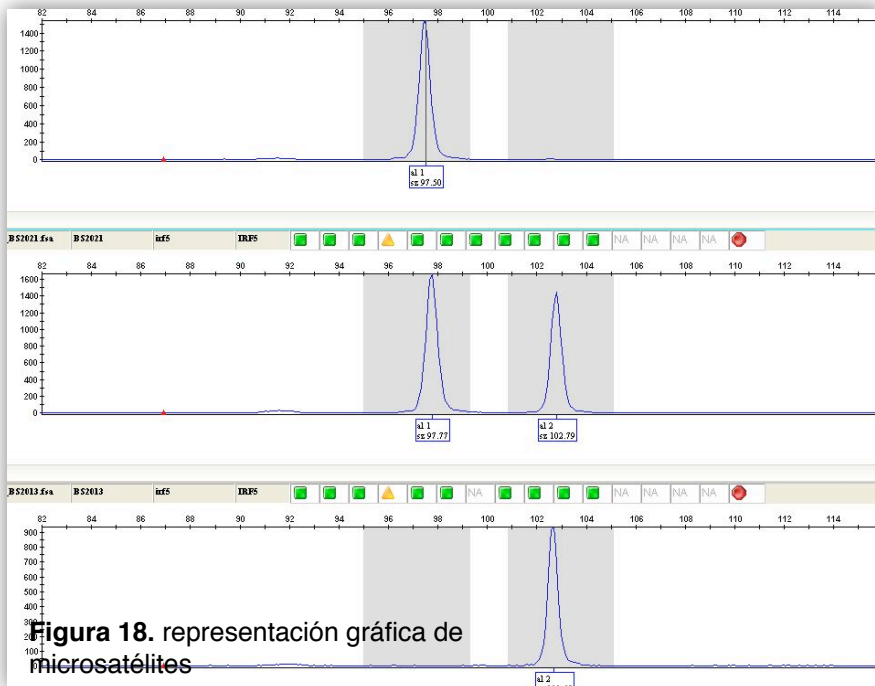
0.125  $\mu$ l de sonda Taqman 20x

ddH<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de reacción de 5  $\mu$ l.

El protocolo de amplificación estándar utilizado fue: 95° durante 2 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 50 ciclos desnaturalización a 92° durante 15 segundos, con un tiempo de annealing/extensión de 1:30 minutos a 60°. Los genotipos de cada muestra fueron determinados automáticamente determinando las medidas de fluorescencia alelo específicas (cómo se muestra en la figura 17) en el equipo ABI Prism 7900, usando el software 2.2.2 para la discriminación alélica (Applied Biosystems).



fragmentos mediante electroforesis capilar, llevado en el secuenciador automático de ADN (ABI Prism 3100 genetics analyzer, Applied Biosystems). Usando el software



Genotyper 3.7 se relacionó el tamaño de los fragmentos con los distintos alelos.(figura 18)

Para confirmar los tipos de las variantes genéticas se escogieron algunas muestras al azar para su secuenciación directa por el método de

los Dideoxy. Utilizándose para ello el

secuenciador automático de ADN (ABI Prism 3100 genetics analyzer, Applied Biosystem).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se diseñó una base de datos en entorno de Microsoft Office en la que se han recogido todas las variables estudiadas. El análisis estadístico de los datos se realizó con los programas informáticos SPSS v.11.0 y EpiInfo. Para la descripción de variables cuantitativas se utilizó la media y desviación estándar de la media. El desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos, es decir, la probabilidad de encontrar dos alelos de diferentes polimorfismo en un mismo haplotipo, se midió mediante el parámetro de desequilibrio de ligamiento normalizado  $D'$ . El valor  $D'$  tiene un máximo de 1, indicando que el desequilibrio de unión es total entre los alelos en cuestión. Para estudiar la asociación entre dos variables categóricas se utilizó el test de  $\chi^2$  de Pearson para tablas de contingencia o la prueba exacta de Fisher cuando la frecuencia esperada en

algunas celdas fue inferior a 5. Para evaluar el riesgo genético se utilizó la razón de productos cruzados *odds ratio* (OR). El test de Mantel-Haenszel basado en la OR se realizó para comparar las tendencias observadas entre distintas cohortes independientes previo análisis de homogeneidad goodness of fit, basado en la  $\chi^2$  de Pearson, mediante este análisis podemos determinar la homogeneidad de las poblaciones analizadas.

## **ANEXO II. PUBLICACIONES**

# A Functional Polymorphism of the NFKB1 Promoter Is Not Associated with Ulcerative Colitis in a Spanish Population

Javier Oliver, PhD,\* María Gómez-García, MD,† Laura Paco, PhD,‡ Miguel A. López-Nevot, MD, PhD,‡ Alexis Piñero, MD, PhD,§ Francisco Correro, MD, PhD,§ Leopoldo Martín, MD, PhD,§ José A. Brieva, MD, PhD,|| Antonio Nieto, MD, PhD,|| and Javier Martín, MD, PhD\*

**Background:** This study investigated the influence of the *NFKB1*-94ins/delATTG in the susceptibility/phenotype to ulcerative colitis.

**Methods:** We analyzed the distribution of -94ins/delATTG *NFKB1* in 258 patients and 264 healthy controls from southern Spain by a polymerase chain reaction-fluorescent method.

**Results:** The genotype and allele frequencies of -94ins/delATTG did not significantly differ between patients and controls. In fact, the frequency of the -94delATTG allele was almost identical in both groups (34.8% and 35.4%, respectively), and the del/del genotype was underrepresented in UC patients (11.2% versus 14%). In addition, no association of this polymorphism was found with any of the clinical parameters analyzed.

**Conclusion:** These results suggest that the *NFKB1* -94ins/delATTG gene variation, previously associated with UC susceptibility in North Americans, does not influence either susceptibility or phenotype of UC in the Spanish population.

**Key Words:** -94ins/delATTG polymorphism, inflammatory bowel disease, nuclear factor- $\kappa$ B, susceptibility, ulcerative colitis

(*Inflamm Bowel Dis* 2005;11:576-579)

Received for publication December 22, 2004; accepted February 28, 2005. From the \*Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra," Granada, Spain; †Servicio Digestivo, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ‡Servicio Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain; §Servicio Digestivo, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain; and ||Servicio de Inmunología, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain.

Supported by Plan Nacional de I+D+I Grant SAF03-3460 and in part by Junta de Andalucía, grupo CTS-180.

Reprints: Javier Martín, MD, PhD, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra," CSIC Parque Tecnológico, Campus de la Salud Avd del Conocimiento, s/n. 18100 Armilla Granada, Spain (e-mail: martin@ipb.csic.es)

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

The precise etiology of inflammatory bowel diseases (IBDs), Crohn's disease (CD), and ulcerative colitis (UC) is poorly understood and remains a field of intensive study. There is increasing evidence from epidemiological<sup>1,2</sup> and genome-wide linkage studies<sup>3</sup> that genetic factors play an important role in the predisposition to IBD. Genetic susceptibility to IBD, as in most autoimmune diseases, is complex and heterogenous and likely involves multiple genes of relatively low penetrance.<sup>3,4</sup>

IBDs are characterized by imbalanced activation of the intestinal immune system leading to the destruction of the mucosa and are also characterized by the production of inflammatory mediators, many of which are regulated by the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/Rel transcription factors.<sup>5,6</sup> The NF- $\kappa$ B/Rel family includes NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), p65 (RelA), RelB, and c-Rel.<sup>7</sup> The most prevalent activated form of NF- $\kappa$ B is a heterodimer consisting of a p50 or p52 subunit and p65, which contains transactivation domains necessary for gene induction.

The gene *NFKB1* is located on chromosome 4q23-q24, spans 156 kb, has 24 exons, and encodes the NF- $\kappa$ B p50/p105 isoforms.<sup>8</sup> Recently, a novel functional *NFKB1* promoter polymorphism has been identified, consisting of a common insertion/deletion (94ins/delATTG) located between two putative key promoter regulatory elements, showing functional effects on the transcription of the *NFKB1* gene.<sup>9</sup> The presence of a 4-bp deletion results in the loss of binding to nuclear proteins and reduced promoter activity of *NFKB1* promoter-luciferase reporter constructs in transient transfection experiments. Furthermore, this deletion increased the risk for UC in a North American population.<sup>9</sup> The -94ins/delATTG seems to be the first potential functional *NFKB1* polymorphism.

The aim of this study was to investigate whether the *NFKB1* -94 ins/delATTG polymorphism is associated with UC in a white Spanish population. Furthermore, we analyzed the possible influence of this polymorphism in the UC phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

This study includes 258 unrelated patients with UC and 264 healthy volunteer blood donors matched for sex and age. Patients with UC were randomly recruited from 2 hospitals in the south of Spain: Hospital Virgen de las Nieves in Granada and Hospital Puerta del Mar in Cádiz. The patients and controls were of white Spanish origin. UC was diagnosed according to standard clinical, endoscopic, radiologic, and histopathologic criteria.<sup>10</sup> The clinical characteristics of patients are shown in Table 1. Written consent was obtained from all participants. The study was approved by the Ethics Committee of both hospitals.

### –94ins/delATTG Genotyping

DNA was isolated from anticoagulant-treated peripheral blood mononuclear cells using standard methods. We determined the –94ins/delATTG genotypes by a polymerase chain reaction (PCR)-based method as described.<sup>9</sup> Briefly, a 289-bp PCR fragment was amplified from genomic DNA using the forward primer 5'-TTTAATCTGTGAAGAGATGTGAATG-3' and the reverse primer 5'-CTCTGGCTTCCTAGCAGGG-3'. The forward primer was 5'-labeled with the fluorescent dye 6-Carboxyfluorescein amino hexy FAM. The presence or absence of the 4-bp deletion was determined by the size of the labeled PCR product on an ABI 3100 sequencer, using Genescan 672 software (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Selected samples were sequenced on the ABI 3100 sequencer. The sequence results accurately confirmed the molecular weight determined by fluorescence labeling.

### Statistical Methods

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was tested by  $\chi^2$  analysis. The differences in genotype distribution and

allele frequency among the groups were examined for statistical significance by the  $\chi^2$  test for independence. Odds ratios with 95% confidence intervals were calculated according to the Woolf method. The association of the NFKB1 polymorphism with age at onset was analyzed using analysis of variance; categorical variables were compared using the  $\chi^2$  test. A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. Analyses were conducted using EpiInfo (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga) (v.6) and SPSS (Chicago, Ill.) (v.11.0) software packages.

## RESULTS

Table 2 shows the genotype and allele distribution frequencies of the –94ins/delATTG NFKB1 promoter polymorphism in patients with UC and healthy controls. No departure from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in patients or controls. No statistically significant differences between groups were observed when the –94ins/delATTG genotype and allele distributions were compared. The frequency of patients with the del/del genotype was lower than in controls (11.24% versus 14%), and the frequency of –94ins/delATTG alleles was equally distributed in both groups. Because genetic variation may not only contribute to disease susceptibility but also define or modify disease phenotype, we performed genotype/phenotype analysis. No significant association of the –94ATTG deletion was observed with any of the clinical characteristics analyzed (Table 1), indicating that the –94ins/delATTG polymorphism does not influence the disease phenotype either.

## DISCUSSION

A previous study in a white North American population showed an association between UC and the –94ins/delATTG NFKB1 promoter polymorphism.<sup>9</sup> An excess of probands with

**TABLE 1.** Clinical Features of Patients with UC

Total number	258
Sex (% male)	49
Age at onset (yr; mean $\pm$ SD)	32.3 $\pm$ 13.7
Smoking habits (%)	
Never	51.9
Ex/current	48.1
Extraintestinal manifestations (%)	31.7
Disease location (%)	
Proctosigmoiditis	23.1
Left-sided	31.7
Extensive colitis/pancolitis	45.2
Colectomy (%)	15.9
Immunosuppression (%)	26

**TABLE 2.** Frequencies of –94ins/delATTG NFKB1 Promoter Polymorphism Genotypes and Alleles in Patients with UC and Healthy Subjects

	Healthy Controls [n = 264 (%)]	UC [n = 258 (%)]	
<b>Genotypes</b>			
del/del	37 (14)	29 (11.24)	<i>P</i> = 0.48
del/ins	113 (42.8)	122 (47.29)	
ins/ins	114 (43.2)	107 (41.47)	
<b>Alleles</b>			
del	187 (35)	180 (34.88)	<i>P</i> = 0.85
ins	341 (65)	336 (65.12)	OR = 0.98 (0.75–1.27)
del, –94ATTG deletion; ins, –94ATTG insertion.			



the del/del genotype was found, resulting in overrepresentation of the *-94delATTG* allele in patients with UC. In this study, which is the first to attempt to replicate this association with the *NFKB1* gene, we have shown no association of UC with the above-mentioned polymorphism in Spanish patients. In our population, the frequency of patients with the del/del genotype was lower than in controls (11.24% versus 14%), and the frequency of *-94ins/delATTG* alleles was equally distributed in both groups. The observed genotype and allele frequencies in our control population for the *-94ins/delATTG* variation were in good agreement with those found in the North American white population.<sup>9</sup> Furthermore, no association with disease phenotype was observed.

There could be several possible explanations why the association found between *-94ins/delATTG NFKB1* and UC was not replicated in our study. The simplest explanation is that NF- $\kappa$ B, or the polymorphisms under study, do not play a major role in the pathogenesis of UC. The first possibility does not seem very likely, because an increased expression of several NF- $\kappa$ B subunits in macrophages and intestinal lamina propria cells of patients with IBD has already been reported.<sup>11,12</sup> However, it seems that NF- $\kappa$ B p65 (RelA), and not NF- $\kappa$ B p50 (NF- $\kappa$ B1), is the most relevant subunit involved in the regulation of intestinal inflammation in IBD.<sup>11,12</sup>

With regard to the functional relevance of the *NFKB1* gene variation, the *-94ins/delATTG NFKB1* alleles seem to affect promoter activity of the *NFKB1* gene and differential nuclear protein binding.<sup>9</sup> Nevertheless, caution should be exercised in extrapolating the results of in vitro experiments to the individual patient, because other factors within the disease environment may affect the NF- $\kappa$ B production and the biologic activity. In addition, further detailed molecular promoter studies using cell lines of different origins are needed to define the overall functional importance of the *-94ins/delATTG NFKB1* polymorphism, bearing in mind that other polymorphisms in linkage disequilibrium might also be influencing the promoter activity. It is clear that NF- $\kappa$ B plays an important role in autoimmunity and inflammation,<sup>5,6,13</sup> but the pathologic processes involved are complex, and further genetic studies are required to assess the relative importance of the *NFKB* gene polymorphism in relation to the genetic predisposition to autoimmunity. It would be of interest to examine the polymorphism within other NF- $\kappa$ B molecules such as NF $\kappa$ B2 and NF $\kappa$ B3 or genes encoding other components of the NF- $\kappa$ B cascade such as inhibitors of NF- $\kappa$ B in relation to IBD. Of note, a recent study has shown an association of the NF- $\kappa$ B inhibitor  $\alpha$  (*NFKBIA*) gene with CD.<sup>14</sup>

The effects of genetic, population, and clinical heterogeneity, in addition to different gene-environment interactions, may explain the discrepant results obtained with regard to the influence of *94ins/delATTG NFKB1* polymorphism in UC. Thus, it is possible that the *NFKB1* polymorphism plays

a role in susceptibility to UC only in the presence of environmental factors to which the North American, but not the Spanish, population is exposed. Differences in diet and other lifestyle factors are known to exist between the 2 ethnic groups. The lack of agreement between the different studies could also be caused by the presence of false negatives because of the relatively lower number in our study. However, this is unlikely because our study had more than 80% power to detect the relative risk for the polymorphism (considering an odds ratio of 1.7) at the 5% significance level. In addition, genotype frequencies did not differ from Hardy-Weinberg expectations in the control population, and allele frequencies in our white Spanish population are similar to those reported by Karban et al.<sup>9</sup> Alternatively, it is possible that the haplotypic context of the *-94delATTG* allele is different in North American and Spanish populations, resulting in differential susceptibility to UC when one looks only at this polymorphism. On the other hand, it is possible that the *NFKB1* polymorphism is associated with a particular UC subset underrepresented in our sample population. In this sense, it is of note that the genome-wide screen that prompted the study by Karban et al.<sup>9</sup> showed evidence for linkage with the region where *NFKB1* maps in the mixed families (CD + UC in the same pedigree) analysis but not when the UC only families were analyzed.<sup>15</sup>

In summary, our data do not support the hypothesis that there is an association between UC and the *-94ins/delATTG NFKB1* polymorphism.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Paz Ruiz and Sonia Morales for excellent technical assistance. Dr. Alexis Piñero has a fellowship from Grupo Español de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa (GETECCU)/FAES FARMA.

## REFERENCES

1. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. 1988;29:990-996.
2. Monsen U, Bernell O, Johansson C, et al. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 1991;26:302-306.
3. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet*. 2004;13:161-168.
4. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:521-533.
5. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336:1066-1071.
6. Neurath MF, Becker C, Barbusescu K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut*. 1998;43:856-860.
7. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:392-401.

8. Heron E, Deloukas P, van Loon AP. The complete exon-intron structure of the 156-kb human gene NFKB1, which encodes the p105 and p50 proteins of transcription factors NF-kappa B and I kappa B-gamma: implications for NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genomics*. 1995;30:493–505.
9. Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*. 2004;13:35–45.
10. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;170:2–6.
11. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998;42:477–484.
12. Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;859:149–159.
13. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:725–734.
14. Klein W, Tromm A, Folwaczny C, et al. A polymorphism of the NFKBIA gene is associated with Crohn's disease patients lacking a predisposing allele of the CARD15 gene. *Int J Colorectal Dis*. 2004;19:153–156.
15. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:7502–7507.

## BRIEF COMMUNICATION

## The functional genetic variation in the *PTPN22* gene has a negligible effect on the susceptibility to develop inflammatory bowel disease

M<sup>a</sup>. C. Martín<sup>1\*</sup>, J. Oliver<sup>2\*</sup>, E. Urcelay<sup>1</sup>, G. Orozco<sup>2</sup>, M. Gómez-García<sup>3</sup>, M. Á. López-Nevot<sup>4</sup>, A. Piñero<sup>5</sup>, J. A. Brieva<sup>6</sup>, E. G. de la Concha<sup>1</sup>, A. Nieto<sup>6</sup> & J. Martín<sup>2</sup>

1 Servicio de Inmunología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

2 Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", Granada, Spain

3 Servicio Digestivo, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

4 Servicio de Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

5 Servicio de Digestivo, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

6 Servicio de Inmunología, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

### Key words

Crohn's disease; *PTPN22*; inflammatory bowel disease; lymphoid-specific phosphatase (LYP); ulcerative colitis

### Correspondence

Javier Martín, MD, PhD

Instituto de Parasitología y Biomedicina

"López Neyra", CSIC

Avd. del Conocimiento s/n. Parque

Tecnológico Campus de la Salud

Armilla 18100 Granada

Spain

Tel.: 34 958 181669

Fax: 34 958 181633

e-mail: martin@ipb.csic.es

Received 12 March 2005, revised 6 April 2005,  
accepted for publication 11 April 2005

doi: 10.1111/j.1399-0039.2005.00428.x

### Abstract

The aim of this study was to assess the possible association between the protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 (*PTPN22*) gene 1858C→T (*rs2476601*, encoding R620W) polymorphism and inflammatory bowel disease (IBD). Our study population consisted of 1113 IBD [544 ulcerative colitis (UC) and 569 Crohn's disease (CD)] patients and 812 healthy subjects. All the individuals were of Spanish white origin. Genotyping of the *PTPN22* gene 1858C→T polymorphism was performed by real time polymerase chain reaction technology, using TaqMan 5'-allelic discrimination assay. The frequency of the *PTPN22* 1858T allele in healthy subjects was 6.2% compared with 6.7% in the UC patients and 5.1% in Crohn's patients. No statistically significant differences were observed when the *PTPN22* 1858C→T allele and genotype distribution among CD patients, UC patients and healthy controls were compared. These results indicate that the *PTPN22* 1858C→T polymorphism does not appear to play a major role in IBD predisposition in our population.

The precise etiology of inflammatory bowel diseases (IBD), Crohn's disease (CD), and ulcerative colitis (UC) is poorly understood and remains a field of intensive investigation. There is increasing evidence from epidemiological and genome-wide linkage studies that genetic factors play an important role in the predisposition to IBD (1–3). Genetic susceptibility to IBD, as in most autoimmune diseases, is complex and heterogenous and probably involves multiple genes of relatively low penetrance (3, 4).

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are critical regulators of T-cell signal transduction (5). In conjunction with

protein tyrosine kinases, PTPs regulate the reversible phosphorylation of tyrosine residues and thereby play important roles in many different aspects of T-cell physiology (6). Abnormalities in tyrosine phosphorylation have been shown to be involved in the pathogenesis of numerous human diseases from autoimmunity to cancer (7). Thus, T cells displaying dysregulated tyrosine phosphorylation would be expected to mediate the pathological process in autoimmunity. Because of their potential etiological and pathogenic roles in human disease, PTPs can be considered as good candidate genes in the study of genetically determined diseases.

The PTP non-receptor 22 (*PTPN22*) gene, located on chromosome 1p13, encodes a lymphoid-specific phosphatase (Lyp). Lyp is an intracellular PTP with a molecular

\*These authors have contributed equally to this work.

weight of 110 kDa containing a N-terminal catalytic domain and a non-catalytic C terminus with four proline-rich domains (8). Lyp is physically bound through one proline-rich motif (referred to as P1) to the SH3 domain of the Csk kinase (9). The ability of Csk and Lyp to inhibit T-cell receptor signaling requires their physical association (10). Recent findings suggest that a *PTPN22* single nucleotide polymorphism (SNP) (*rs2476601*; 1858C→T; R620W), located at the P1 motif, disrupts the interaction between Lyp and Csk, avoiding the formation of the complex and therefore, the suppression of T-cell activation (11). Furthermore, the *PTPN22* R620W polymorphism has been reported to be associated with autoimmune diseases such as type 1 diabetes mellitus (T1D), rheumatoid arthritis (RA), and systemic lupus erythematosus (SLE) (11–13). In contrast, no evidence of association between multiple sclerosis (MS) with the *PTPN22* R620W variation was observed (14, 15).

Taking into account these findings, the aim of this study was to assess the role of the *PTPN22* 1858C→T polymorphism in the genetic predisposition to IBD.

A total of 1113 IBD (544 with UC and 569 with CD) patients were recruited from three Spanish hospitals: Hospital Virgen de las Nieves (Granada), Hospital Puerta del Mar (Cadiz), and Hospital Clínico San Carlos (Madrid). The diagnosis of CD or UC was established according to conventional clinical, radiological, endoscopic, and histological criteria (16). Cases with an undetermined colitis were

excluded from the study. A total of 812 blood bank donors and bone marrow donors with no family history of an autoimmune disease of the corresponding cities were included as healthy controls. IBD patients and controls were matched by age and sex. All the subjects, patients and controls, were of Spanish white origin and were included in this study after written informed consent. We obtained approval for the study from all local ethical committees of the corresponding hospitals.

Table 1 summarizes the *PTPN22* 1858C→T genotypic and allelic frequencies in Crohn's patients, UC patients, and healthy subjects. The allelic distribution was similar to that obtained in other Caucasian populations (11, 12). No deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium were observed for *PTPN22* 1858C→T genotypes in any of the patient groups and healthy controls. The frequency of the *PTPN22* 1858T allele in healthy subjects was 6.2% compared with 6.7% in the UC patients, 5.1% in the Crohn's patients, and 5.9% in the combined IBD patient population. No statistically significant differences were observed when the *PTPN22* 1858C→T allele and genotype distribution between CD patients, UC patients, and healthy controls were compared. Furthermore, combined phenotype of CD and UC (IBD patients) do not show a significant difference in the frequency of *PTPN22* 1858C→T polymorphism compared with controls. The sample size used in the UC and CD studies had 84 and 78% power, respectively, to detect the effect of the SNP

**Table 1** *PTPN22* 1858C→T genotypic and allele frequencies in healthy controls, ulcerative colitis (UC) patients, Crohn's disease (CD) patients

<i>PTPN22</i> 1858C→T genotype	Controls <i>n</i> 812 (%)	UC <i>n</i> 544 (%)	UC <i>P</i> values	OR (95% CI)	CD <i>n</i> 569 (%)	CD <i>P</i> values	OR (95% CI)
CC	714 (87.93)	474 (87.13%)	0.66	0.93 (0.66–1.31)	514 (90.33)	0.16	1.28 (0.89–1.85)
CT	95 (11.70)	67 (12.32)	0.76	1.05 (0.74–1.49)	51 (8.96)	0.09	0.74 (0.51–1.07)
TT	3 (0.37)	3 (0.55)	0.62	1.5 (0.24–9.27)	4 (0.71)	0.39	1.91 (0.36–10.75)
<i>PTPN22</i> 1858C→T allele							
C	1523 (93.78)	1015 (93.29)	0.6	0.91 (0.67–1.25)	1079 (94.82)	0.25	1.20 (0.86–1.67)
T	101 (6.22)	73 (6.71)	0.6	1.08 (0.79–1.50)	59 (5.18)	0.25	0.82 (0.58–1.16)

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

DNA from patients and controls was obtained from peripheral blood using standard methods. Genotyping of the *PTPN22* SNP (*rs2476601*; 1858C→T; R620W) was performed using a TaqMan 5'-allelic discrimination Assay-By-Design method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as previously described (17). In order to confirm the genotyping obtained by the Taqman 5'-allelic discrimination assay, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism was performed on representative samples from each genotype as previously described (11). Allelic and genotypic frequencies of *PTPN22* 1858C→T were obtained by direct counting. Statistical analysis to compare allelic and genotypic distributions was performed by  $\chi^2$  test calculated on 2 × 3 or 2 × 2 contingency tables. The software used was STATCALC program (Epi Info 2002; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Statistical significance was *P* < 0.05. The power of the study to detect an effect of a polymorphism in disease susceptibility was estimated using the QUANTO v 0.5 software (Department of Preventive Medicine University of Southern California, CA, USA) assuming dominant inheritance model (18).

conferring an odd ratio 1.7 at the 5% significance level. Overall, we observed no evidence of genetic association between the *PTPN22* R620W polymorphism and IBD susceptibility.

The association of T1D, RA, SLE, juvenile idiopathic arthritis, Graves, Hashimoto, and Addison diseases (19–22) susceptibility with the *PTPN22* 1858C→T polymorphism suggests that the *PTPN22* 1858T allele predisposes individuals to developing autoimmune diseases. These data raised the hope of having a common marker for the autoimmune diseases as well as a common underlying mechanism for autoimmunity and indicate that this SNP should also be studied in other autoimmune disorders. However, *PTPN22* 1858C→T polymorphism does not seem to be a critical point in the susceptibility to IBD. Interestingly, our data are in accordance with recent reports in which no association evidence of association between the *PTPN22* 1858 SNP with MS was observed (14, 15). The finding that IBD and MS are not associated with the *PTPN22* 1858T allele, where other autoimmune diseases, such as T1D, RA, SLE, and Graves disease are, suggest that the latter diseases share common underlying mechanism that may not have an important role in the predisposition to IBD or MS. It is worth noting that in most autoimmune diseases associated with *PTPN22* 1858C→T polymorphism are characterized by the presence of autoantibodies that are related with clinical outcome. Kyogoku *et al.* (13) proposed that *PTPN22* 1858C→T variant may predispose individuals to autoimmune diseases by facilitating the generation of certain disease-associated autoantibodies, thereby contributing to disease progression. IBD, and also MS, is thought to be primarily a T-cell-mediated disease, and although there are reports on the presence of autoantibodies in IBD, such as anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody, anti-neutrophil cytoplasmic antibody with perinuclear staining, their role in disease pathogenesis and progression is not well established (23).

Similar findings have been reported concerning the influence of *CTLA-4* gene in autoimmunity. While the *CTLA-4*-CT60 marker has been associated with a range of autoimmune diseases, such as T1D, Graves' disease, thyroiditis, and SLE (24, 25), no linkage was observed with RA (26, 27) or celiac disease (28–30). These findings support the notion that common susceptibility alleles are not shared among all autoimmune diseases but rather only among certain groups of autoimmune diseases.

It is possible that different genetic backgrounds could condition the effect of the *PTPN22* polymorphism, but it seems not to be the reason, because the *PTPN22* polymorphism confers susceptibility to other autoimmune diseases such as RA and SLE with the same genetic background (12, 13, 17). Furthermore, there are no significant differences between 1858C→T genotype

distribution of control groups from North America, where an association of the *PTPN22* 1858C→T polymorphism with RA and SLE was described, and the South Spain population.

In summary, the present study is the first to investigate the role of *PTPN22* 1858C→T polymorphism in IBD, and our data suggest that the *PTPN22* 1858 SNP has no or only a negligible effect on IBD susceptibility in this Spanish population. However, a minor effect of the *PTPN22* SNP cannot be ruled out, and this can only be verified in an extremely large data set.

### Acknowledgments

This work was supported by grants SAF03-3460 and SAF03-8522 from Plan Nacional de I – D + I and in part by Junta de Andalucía, grupo CTS-180.

### References

1. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; **29**: 990–6.
2. Mosen U, Bernell O, Johansson C, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1991; **26**: 302–6.
3. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet* 2004; **13** Spec No 1: R161–8.
4. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 521–33.
5. Alonso A, Sasin J, Bottini N *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 2004; **117**: 699–711.
6. Mustelin T, Alonso A, Bottini N *et al.* Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Mol Immunol* 2004; **41**: 687–700.
7. Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM *et al.* A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *Faseb J* 2004; **18**: 8–30.
8. Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood* 1999; **93**: 2013–24.
9. Cloutier JF, Veillette A. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *Embo J* 1996; **15**: 4909–18.
10. Cloutier JF, Veillette A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med* 1999; **189**: 111–21.
11. Bottini N, Musumeci L, Alonso A *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004; **36**: 337–8.

12. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: 330–7.
13. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; **75**: 504–7.
14. Begovich AB, Caillier SJ, Alexander HC et al. The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 is not associated with multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2005; **76**: 184–7.
15. Matesanz F, Rueda B, Orozco G et al. Protein tyrosine phosphatase gene (PTPN22) polymorphism in multiple sclerosis. *J Neurol.* **17**: 2005: [Epub ahead of print]
16. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; **170**: 2–6.
17. Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 219–24.
18. Gauderman WJ. Sample size requirements for association studies of gene–gene interaction. *Am J Epidemiol* 2002; **155**: 478–84.
19. Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK et al. Association analysis of the 1858C > T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. *Genes Immun.* (Epub ahead of print)
20. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE et al. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 5862–5.
21. Smyth D, Cooper JD, Collins JE et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004; **53**: 3020–3.
22. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF et al. Analysis of Families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet* 2005; **76**: 561–71. (Epub 2005 February 17)
23. Sandborn WJ. Serologic markers in inflammatory bowel disease: state of the art. *Rev Gastroenterol Disord* 2004; **4**: 167–74.
24. Furugaki K, Shirasawa S, Ishikawa N et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. *J Hum Genet* 2004; **49**: 166–8.
25. Torres B, Aguilar F, Franco E et al. Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; **5**: 2211–5.
26. Orozco G, Torres B, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF, Martin J. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 667–70.
27. Barton A, Jury F, Eyre S et al. Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 748–52.
28. King AL, Moodie SJ, Fraser JS et al. Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA4 gene region. *Eur J Immunogenet* 2003; **30**: 427–32.
29. Amundsen SS, Naluai AT, Ascher H et al. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 593–9.
30. Rueda B, Zhernakova AMA, López-Nevot M et al. CTLA4/CT60 polymorphism is not relevant in susceptibility to autoimmune inflammatory intestinal disorders. *Hum Immunol.* 2005; **66**: 321–5.

# Analysis of a GT Microsatellite in the Promoter of the *foxp3/scurfin* Gene in Autoimmune Diseases

Elena Sánchez, Blanca Rueda, Gisela Orozco, Javier Oliver, Jose R. Vilchez, Laura Paco, Miguel A. López-Nevot, José L. Callejas, José M. Sabio, Maria Gómez-Garcia, A. Nieto, Mario Delgado, and Javier Martín

**ABSTRACT:** The aim of this study was to assess the possible association of the functional (GT)<sub>n</sub> microsatellite polymorphism in the *FOXP3* gene with predisposition to several autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), ulcerative colitis (UC), Crohn's disease, and celiac disease. We analyzed a case-control cohort composed of 231 SLE patients, 293 RA patients, 528 inflammatory bowel disease (354 Crohn's disease patients and 260 UC patients) patients, 103 celiac disease patients, and 274 healthy controls ethnically matched. Genotyping of (GT)<sub>n</sub> microsatellite was performed by polymerase chain reaction (PCR)-based method combined with fluorescent technology. We found no evidence for association of this polymorphism between controls

and these autoimmune disease patients. Additionally, no differences in the genotype and allele distribution were found when patients were stratified according to clinical manifestation. The (GT)<sub>n</sub> microsatellite of the *FOXP3* gene may not play a relevant role in the susceptibility to SLE, RA, inflammatory bowel disease, and celiac disease in our population. *Human Immunology* 66, 869–873 (2005). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2005. Published by Elsevier Inc.

**KEYWORDS:** *FOXP3* gene; systemic lupus erythematosus (SLE); rheumatoid arthritis (RA); ulcerative colitis (UC); Crohn's disease; celiac disease; autoimmune diseases (AID); microsatellite

## ABBREVIATIONS

AID autoimmunity diseases  
CI confidence interval  
HLA human leukocyte antigen  
IBD inflammatory bowel disease  
OR odds ratio  
PBMC peripheral blood mononuclear cell

PCR polymerase chain reaction  
RA rheumatoid arthritis  
SLE systemic lupus erythematosus  
T1D type 1 diabetes  
Tregs regulatory T cells  
UC ulcerative colitis

## INTRODUCTION

Autoimmune diseases (AID) affect approximately 5% of the population and are characterized by loss of self-tolerance causing immune-mediated tissue destruction [1]. AID share a number of characteristics that suggest

common etiologic pathways or mechanisms, including reactivity to self-antigens, inflammatory manifestation, as well as genetic associations with human leukocyte antigens (HLA) [2]. Although the etiology of AID is

*From the Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra," Granada, Spain (E.S., B.R., G.O., J.O., M.D., J.M.); Servicios Inmunología (J.R.V., L.P., M.A.L.), de Medicina Interna (J.M.S.), and de Digestivo (M.G.-G.), Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain; Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain (J.L.C.); Servicio Inmunología, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain (A.N.).*

*Address reprint requests to: Javier Martín MD, PhD, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra," CSIC, Parque Tecnológico de*

*Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n 18100-Armilla (Granada), Spain; Tel.: +34-958-181669; Fax: +34-958-181633; E-mail: martin@ipb.csic.es.*

*E. Sánchez, B. Rueda, G. Orozco, and J. Oliver contributed equally to this study.*

*Supported by grant SAF03-3460 from Plan Nacional de I+D+I, and in part by Junta de Andalucía, grupo CTS-180.*

*Received April 20, 2005; accepted May 23, 2005.*

unknown, it is widely accepted that both environmental and genetic factors are involved in the pathogenesis of these disorders [3]. The genetic background of AID is complex and likely involves multiple genes encoding proteins with significant functions in the regulation of the immune system.

Regulatory T cells (Tregs) are important components of the homeostasis of the immune system, because impaired regulatory T-cell activity can cause AID [4, 5]. There is compelling evidence that the role of Treg is not limited to the prevention of autoimmunity, but is important in controlling virtually all forms of immune response, including inflammation. *FoxP3/Scurfin* gene encodes a protein that is a member of the forkhead/winged-helix family of transcriptional regulators, and is specifically expressed in naturally occurring CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells [6, 7]. Furthermore, retroviral gene transfer of *Foxp3* converts naive T cells toward a regulatory T-cell phenotype similar to naturally occurring CD4<sup>+</sup> regulatory T cells [7]. Thus, *Foxp3* is a master regulatory gene for the development of regulatory T cells.

A rare recessive monogenetic disorder called IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, including type 1 diabetes, enteropathy, and X-linked syndrome), is caused by a mutation in the *FOXP3* gene on human chromosome Xp11.23 [8]. Because of the pathologic role in the maintenance of the immune system and the variation in the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, dysregulation of *FOXP3/Scurfin* gene expression may lead to the development of AID. Of interest, Bassuny *et al.* reported an association of a functional microsatellite polymorphism (GT)<sub>n</sub> of *FOXP3* gene with susceptibility to type 1 diabetes (T1D) in a Japanese population [9].

There is increasing evidence that AID share a common genetic risk factor, which is suggested by the familial aggregation of autoimmunity and also that the chromosomal region linkage to AID tends to overlap. Taking into account these findings, the aim of our study was to examine the possible influence of the functional (GT)<sub>n</sub> polymorphism in the *FOXP3* gene on genetic predisposition of a panel of autoimmune diseases, namely rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), inflammatory bowel disease (IBD), and celiac disease.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

A total of 231 SLE patients, 293 RA patients, 528 IBD patients (354 Crohn's disease patients and 260 UC patients), 103 celiac disease patients, and 274 healthy controls included in this study were recruited from Hospital Virgen de las Nieves (Granada) and Hospital Clínico San Cecilio (Granada), Hospital Puerta del Mar

(Cadiz), and Hospital Materno-Infantil (Granada). SLE and RA patients fulfilled the classification criteria of the American College of Rheumatology [10, 11]. Celiac disease patients were diagnosed following the European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition criteria for celiac disease [12]. IBD patients were diagnosed according to standard clinical, endoscopic, radiologic, and histopathologic criteria [13]. All the subjects, cases and controls, were Caucasian Spanish, living in the same geographic area and were matched for age and sex. All study subjects were included in this study after written informed consent. We obtained approval for the study from all local ethical committees of the corresponding hospitals.

### Genotyping

Genomic DNA was isolated from anticoagulant-treated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using standard methods. Genotyping of the (GT)<sub>n</sub> microsatellite marker located between exon -1 and exon 1 of the *FOXP3* gene was performed by a polymerase chain reaction (PCR)-based method as previously described [9], using the following primers: forward, 5'-CAACCATTC-CCCTCATAGAGG-3', and reverse, 5'-GGCGGTATG-AGATACTCGACCA-3'. The forward primer was 5' labeled with the fluorescent dye 6-FAM and the lengths of the fragments were analyzed in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and using a Genescan 672 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). To verify the repeat numbers of each allele we used direct sequencing using ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### Statistical Analyses

Allelic and genotypic frequencies of *FOXP3* polymorphism were obtained by direct counting. Statistical analysis to compare allelic and genotypic distributions was performed by chi-square test. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated according to Wolf's method. The software used was Statcalc program (Epi Info 2002; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). *p* Values were corrected for the number of alleles determined using the Bonferroni test, and *p* values below 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

The genotype and allele distribution frequencies of the (GT)<sub>n</sub> *FOXP3* microsatellite in AID patients and healthy controls is shown in Tables 1 and 2. In both patient and control groups, genotype and allele frequencies did not deviate significantly from those expected from Hardy-Weinberg equilibrium. We found seven different alleles comprising repeat and bp ranges (GT)<sub>12</sub>–(GT)<sub>18</sub> and 255–267, respectively. The most frequent alleles were (GT)<sub>15</sub> (54.1%) and (GT)<sub>16</sub> (36.6%) in the control



**TABLE 1** Genotype distribution of *FOXP3/Scurfin* (GT)<sub>n</sub> in female and male controls and SLE, RA, CD, UC, and celiac disease patients

	SLE (%) (n = 206)	RA (%) (n = 232)	CD (%) (n = 177)	UC (%) (n = 130)	Celiac disease (%) (n = 65)	Controls (%) (n = 147)
<b>Female</b>						
(GT) <sub>14</sub> /(GT) <sub>15</sub>	0	1 (0.4)	8 (4.6) <sup>a</sup>	2 (1.5)	0	1 (0.7)
(GT) <sub>14</sub> /(GT) <sub>16</sub>	0	0	2 (1.1)	0 (0)	0	0
(GT) <sub>15</sub> /(GT) <sub>15</sub>	62 (30.1)	72 (31)	45 (25.4)	34 (26.2)	18 (27.7)	44 (30)
(GT) <sub>15</sub> /(GT) <sub>16</sub>	94 (45.7)	108 (46.6)	74 (41.8)	50 (38.5)	29 (44.6)	62 (42.2)
(GT) <sub>15</sub> /(GT) <sub>17</sub>	9 (4.3)	8 (3.5)	16 (9)	6 (4.6)	5 (7.7)	8 (5.4)
(GT) <sub>16</sub> /(GT) <sub>16</sub>	29 (14)	33 (14.2)	14 (7.9)	30 (23.1) <sup>b</sup>	8 (12.3)	18 (12.2)
(GT) <sub>16</sub> /(GT) <sub>17</sub>	8 (3.9)	8 (3.5)	12 (6.8)	5 (3.8)	2 (3)	5 (3.4)
Others	4 (2)	2 (0.8)	6 (3.4)	3 (2.3)	3 (4.7)	9 (6.1)
<b>Males</b>						
(GT) <sub>14</sub>	0	0	2 (1.9)	2 (1.8)	0	0
(GT) <sub>15</sub>	16 (64)	32 (52.5)	59 (55.1)	57 (50)	25 (65.7)	69 (54.3)
(GT) <sub>16</sub>	7 (28)	25 (41)	42 (39.2)	50 (43.8)	11 (29)	47 (37)
(GT) <sub>17</sub>	1 (4)	4 (6.5)	3 (2.8)	5 (4.4)	2 (5.3)	11 (8.7)
Others	1 (4)	0	1 (0.9)	0	0	0

Abbreviations: SLE = systemic lupus erythematosus; RA = rheumatoid arthritis; CD = Crohns disease; UC = ulcerative colitis.

<sup>a</sup> *p* = 0.03, *p* corrected = NS.

<sup>b</sup> *p* = 0.01, *p* corrected = NS.

group. *FOXP3* genotypes and alleles with a frequency of ≤2% in patients or controls were jointly considered. The allele frequencies observed in our control population were in good agreement with allele frequencies found in other Caucasian South-European population [14]. However, these allele frequencies contrast significantly with those detected in the Japanese population (Table 3).

No statistically significant differences were observed between allele frequencies of SLE, RA, or celiac patients

and controls. In addition, we found no association of this polymorphism and genotype frequencies in female and male patients with these AID. With regard to the IBD patients, the (GT)<sub>16</sub>/(GT)<sub>16</sub> genotype was slightly increased in UC patients (23.1% versus 12.2% in the control group, *p* = 0.01, *p<sub>c</sub>* = not significant, OR = 2.15, 95% CI = 1.08–4.29). We observed a statistically significant deviation in the distribution of the (GT)<sub>14</sub> allele among the female Crohn’s patients (5.1% versus

**TABLE 2** Distribution of allele frequencies of *FOXP3/Scurfin* (GT)<sub>n</sub> in female and male SLE, RA, CD, CU, celiac disease, and healthy controls

Alleles	Size (bp)	SLE (%) (n = 412)	RA (%) (n = 462)	CD (%) (n = 354)	UC (%) (n = 260)	Celiac Disease (%) (n = 130)	Controls (%) (n = 294)
<b>Female</b>							
(GT) <sub>14</sub>	259	0	1 (0.2)	18 (5.1) <sup>a</sup>	2 (0.8)	0	4 (1.3)
(GT) <sub>15</sub>	261	228 (55.3)	263 (57)	189 (53.4)	127 (48.8)	72 (55.4)	159 (54.1)
(GT) <sub>16</sub>	263	162 (39.3)	182 (39.4)	116 (32.7)	115 (44.2)	47 (36.2)	107 (36.4)
(GT) <sub>17</sub>	265	18 (4.4)	16 (3.4)	30 (8.5)	15 (5.8)	9 (6.9)	19 (6.5)
Others	Others	4 (1)	0	1 (0.3)	1 (0.4)	2 (1.5)	5 (1.7)
<b>Males</b>							
(GT) <sub>14</sub>	259	0	0	2 (1.9)	2 (1.8)	0	0
(GT) <sub>15</sub>	261	16 (64)	32 (52.5)	59 (55.1)	57 (50)	25 (65.7)	69 (54.3)
(GT) <sub>16</sub>	263	7 (28)	25 (41)	42 (39.2)	50 (43.8)	11 (29)	47 (37)
(GT) <sub>17</sub>	265	1 (4)	4 (6.5)	3 (2.8)	5 (4.4)	2 (5.3)	11 (8.7)
Others	Others	1 (4)	0	1 (0.9)	0	0	0

Abbreviations: SLE = systemic lupus erythematosus; RA = rheumatoid arthritis; CD = Crohns disease; UC = ulcerative colitis.

<sup>a</sup> *p* = 0.009, *p* corrected = 0.05; OR = 3.88 (1.22–13.72).

**TABLE 3** Comparative allele frequencies between Japanese and Spanish populations

Alleles	Japanese controls (%) ( <i>n</i> = 472)	Spanish controls (%) ( <i>n</i> = 421)	<i>p</i> Value	<i>p<sub>c</sub></i>
(GT) <sub>12</sub>	0	3 (0.7)	0.03	ns
(GT) <sub>13</sub>	0	2 (0.5)	ns	ns
(GT) <sub>14</sub>	1 (0.2)	4 (1)	ns	ns
(GT) <sub>15</sub>	154 (32.6)	228 (54.1)	>0.000001	>0.000001
(GT) <sub>16</sub>	296 (62.8)	154 (36.6)	>0.000001	>0.000001
(GT) <sub>17</sub>	11 (2.3)	30 (7.1)	0.002	0.01
(GT) <sub>18</sub>	10 (2.1)	0	0.001	0.006

GT = genotyping; ns = not significant.

1.3% in the control group;  $p = 0.009$ , OR 3.88, 95% CI = 1.22–13.72) that turned out to be nonsignificant after applying the Bonferroni test ( $p_{corr} = 0.05$ ).

## DISCUSSION

There is increasing evidence that common genes may underlie autoimmunity [3, 15]. However, evidence that specific risk alleles are associated with multiple AID is relatively sparse. Genes within the MHC complex, and not only the HLA alleles, are associated with multiple autoimmunity diseases [16]. Recently there have also been examples showing that non-HLA complex genes play a role in the development of more than one autoimmune disease. Thus, *CTLA4* gene variants are associated with T1D, Graves' disease, and SLE [17, 18]. In addition, the *PTPN22* R620W polymorphism has been associated with a number of AID [19, 20]. This leads to the hypothesis of common predisposing genes to autoimmunity and consequently when a potential risk factor for an autoimmune disease is discovered, such as the *FOXP3* gene, investigating its involvement in different AID is of interest.

In the current case-control study, the possible association of RA, SLE, IBD, and celiac disease with variants in the *FOXP3* gene was investigated. The data reveal no association between the AID investigated with the *FOXP3* variant that was found to be associated with T1D in the Japanese population.

The possible reason for the lack of association for this polymorphism in our population may result from a *FOXP3/Scurfin* gene located on one of the T1D susceptible loci, Xp11.23, which is not a RA, SLE, IBD, or celiac disease susceptibility loci. However, the absence of linkage evidence in a particular chromosomal region does not mean that genes in that region do not contribute to disease risk. Our negative findings could be due to lack of power to detect a true association in these diseases, specially in Crohn's disease, in which we observed a trend of association for the GT14 allele. Therefore, genotyping

in larger number of materials is warranted before drawing any definitive conclusions.

In accordance with our findings, no association was detected between T1D and *FOXP3* polymorphisms in an Italian population [14]. Zavattari *et al.* extensively characterized the *FOXP3* region, searching for genetic variants, and no evidence of association between T1D and the 12 *FOXP3* polymorphisms analyzed was observed. Differences in the ethnicities of the study population may account for the failure to replicate the T1D association with *FOXP3* in a Japanese population [9]. This possibility is consistent with the marked differences in *FOXP3* allele frequencies in the Japanese versus the white population. Alternatively, it is possible that the specific disease-relevant alleles for at least some susceptibility genes vary among different ethnic groups. Thus, our findings together with those of Zavattari *et al.* suggest that the *FOXP3* microsatellite is not a susceptibility allele for most common AID, at least in the Caucasian population. Further studies are warranted to assess the *FOXP3* variants' relevance to AID in the Japanese population.

With regard to the functional relevance of the *FOXP3* gene microsatellite polymorphism, the different microsatellite alleles appear to affect promoter activity of the *FOXP3* gene [9]. Nevertheless, caution should be exercised in extrapolating the results of previous functional assays, because the presence of other polymorphisms within intron zero or other distant genetic variants in strong linkage disequilibrium with *FOXP3* gene microsatellite might be those that are really affecting *FOXP3* gene expression.

In summary, we found no evidence of association between this genetic variant in *FOXP3* gene with AID patients in our Spanish population. Obviously, the participation of FOXP3 protein in autoimmunity is not brought into question by these data, and the existence of other *FOXP3* gene regulatory polymorphisms that might affect *FOXP3* expression and influence AID risk cannot be excluded.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank M<sup>a</sup> Paz Ruiz and Sonia Morales for excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO: Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 248:1380, 1990.
2. Davidson A, Diamond B: Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345:340, 2001.
3. Ermann J, Fathman CG: Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol* 2:759, 2001.
4. von Herrath MG, Harrison LC: Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 3:223, 2003.
5. Shevach EM: Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 18:423, 2000.
6. Clark LB, Appleby MW, Brunkow ME, Wilkinson JE, Ziegler SF, Ramsdell F: Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol* 162:2546, 1999.
7. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057, 2003.
8. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20, 2001.
9. Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, Hara T: A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 55:149, 2003.
10. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271, 1982.
11. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315, 1988.
12. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 65:909, 1990.
13. Lennard-Jones JE: Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 170:2, 1989.
14. Zavattari P, Deidda E, Pitzalis M, Zoa B, Moi L, Lampis R, Contu D, Motzo C, Frongia P, Angius E, Maioli M, Todd JA, Cucca F: No association between variation of the FOXP3 gene and common type 1 diabetes in the Sardinian population. *Diabetes* 53:1911, 2004.
15. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF, Trent JM: Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9979, 1998.
16. Jawaheer D, Li W, Graham RR, Chen W, Damle A, Xiao X, Monteiro J, Khalili H, Lee A, Lundsten R, Begovich A, Bugawan T, Erlich H, Elder JT, Criswell LA, Seldin MF, Amos CI, Behrens TW, Gregersen PK: Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 71:585, 2002.
17. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadi A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC: Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506, 2003.
18. Torres B, Aguilar F, Franco E, Sanchez E, Sanchez-Roman J, Jimenez Alonso J, Nunez-Roldan A, Martin J, Gonzalez-Escribano MF: Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:2211, 2004.
19. Siminovitch KA: PTPN22 and autoimmune disease. *Nat Genet* 36:1248, 2004.
20. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, Moser KL, Begovich AB, Carlton VE, Li W, Lee AT, Ortmann W, Behrens TW, Gregersen PK: Analysis of families in the Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium (MADGC) Collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet* 76:561, 2005.

## BRIEF COMMUNICATION

## Inducible and endothelial nitric oxide synthase genes polymorphism in inflammatory bowel disease

J. Oliver<sup>1</sup>, M. Gómez-García<sup>2</sup>, J. R. Vilchez<sup>3</sup>, M. Á. López-Nevot<sup>3</sup>, A. Piñero<sup>4</sup>, F. Corroero<sup>4</sup>, A. Nieto<sup>5</sup> & J. Martín<sup>1</sup>

1 Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", CSIC, Granada, Spain

2 Servicio Digestivo, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

3 Servicio de Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

4 Servicio de Digestivo, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

5 Servicio de Inmunología, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

### Key words

Crohn's disease; nitric oxide synthases; polymorphisms; susceptibility; ulcerative colitis

### Correspondence

Javier Martín MD, PhD

Instituto de Parasitología y Biomedicina

"López Neyra"

CSIC, Avd. del Conocimiento s/n. Parque

Tecnológico Campus de la Salud

Armillar- 18100 Granada

Spain

Tel: 34 958 181669

Fax: 34 958 181633

e-mail: martin@ipb.csic.es

### Abstract

To assess the influence of inducible and endothelial nitric oxide synthase gene (*NOS2A* and *NOS3*) polymorphisms in susceptibility to Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). A total of 505 inflammatory bowel disease (IBD) patients (221 with UC and 284 with CD) and 332 ethnically matched controls were studied. Patients and controls were genotyped by polymerase chain reaction -based techniques for a multiallelic (CCTTT)<sub>n</sub> repeat and biallelic marker (TAAA)<sub>n</sub> in the promoter region of the *NOS2A* gene and for a T/C polymorphism at position -786 in the promoter region and a polymorphism in exon 7(298Glu/Asp) of the *NOS3* gene. There was not association between *NOS2A* and *NOS3* genotypes, alleles or haplotypes frequencies with UC, CD and controls. Our data suggest that *NOS2A* and *NOS3* polymorphisms do not play a major role in IBD predisposition.

Received 25 September 2005; revised 22 December 2005; accepted 9 February

doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00578.x

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are common, chronic intestinal inflammation disorders. The molecular basis of pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) is not yet clear, but contributory factors may include persistent bacterial infection, and an imbalance in the regulation of intestinal immune response. Epidemiological, linkage studies and candidate gene approach, suggest that genetics factors play a significant role in determining IBD susceptibility (1). In this regard, variants in *CARD15/NOD2*, *SLC22A4/SLC22A5* and *DLG5* genes have been shown to confer genetic risk for IBD (1).

Nitric oxide (NO) is a free radical that is largely produced by three isoforms of NO synthase (NOS): neuronal (nNOS), endothelial (eNOS), and inducible (iNOS). NOS catalyzes the production of NO and L-citrulline from L-arginine, O<sub>2</sub> and NADPH (2, 3).

The NO generation by eNOS throughout the gastrointestinal tract is important for the maintenance of

mucosal blood flow and gut motility. eNOS is constitutively expressed and their expression can be modulated by temperature, ischemia, inflammation, hypoxia and lipopolysaccharide (LPS) may increase or decrease expression depending on the cell type (4, 5). NO concentration is increased at sites of inflammation, as the result of activity of the iNOS whose expression is induced by a complex cyto-kines combination including interferon (IFN)- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  (6). These inducer and suppressor cytokines are important in the inflammatory response present in IBD patients. UC and CD patients show increased expression of iNOS and eNOS in the epithelial and immune cells (7, 8). However, the relative contributions of the different NOS isoforms in the regulation of inflammatory responses in the gastrointestinal tract are unclear.

Several polymorphisms have been described in *NOS2A* and *NOS3* genes. A highly polymorphic pentanucleotide

95

(CCTTT)<sub>n</sub> repeat located at *NOS2A* gene promoter region has been shown to be functionally important in the regulation of *NOS2A* transcription (9). Also, a functional polymorphism in the proximal promoter involving the insertion or deletion of one unit of an TAAA repeat has been described (10, 11). In *NOS3* gene two functional SNPs, –786 T/C and exon 7 (Glu298Asp), were reported, which are associated vascular diseases in several populations (12, 13).

Due to the role of NO in development of inflammatory process *NOS2A* and *NOS3* can be considered as good candidates genes in the study of IBD. Therefore, the purpose of the present study was to address the possible contribution of the described polymorphisms located within the *NOS2A* and *NOS3* genes to the susceptibility and/or severity of IBD.

Genotypes and distribution of allele frequencies in patients and controls for the (TAAA)<sub>n</sub> biallelic marker, 220 and 224 bp alleles, in the promoter region are listed in Table 1. In both patients and controls, genotype and allele frequencies did not deviate significantly from those expected from Hardy–Weinberg equilibrium. After comparing patients with CD and patients with UC as two independent groups, with the control population, we found no significant deviation in the distribution of the genotype and allele frequency of (TAAA)<sub>n</sub> biallelic marker. Similarly, when both groups were considered as a whole, no statistically significant differences was found between patient with IBD and controls.

The distribution of alleles of the (CCTTT)<sub>n</sub> polymorphism in our population is shown in Table 2. We found 10 alleles comprising repeat and bp ranges 7–16 and 171–216 bp, respectively; the most common occurring repeats are 12 (31.16%) and 11 (20.85%). The 13 repeat

allele (201 bp) showed a trend for decreased frequency in the UC patients compared with controls (19.85% vs 14.7%,  $P = 0.01$ ,  $P_c = 0.1$ ), although this difference was not statistically significant after correcting for the number of comparisons.

The relationship between the two microsatellites repeats in the *NOS2A* promoter was investigated in our population. The linkage disequilibrium (LD) between the individual CCTTT microsatellite alleles and the two TAAA alleles was determined. For the two TAAA alleles, there was a strikingly wide distribution of CCTTT microsatellite alleles, reflecting lack of LD between the two markers analyzed (global  $\Delta' = 0.25$ ). No association was observed comparing the CCTTT-TAAA haplotype distribution between IBD patients and controls (data not shown).

Genotype and allele frequencies of both exon 7 (Glu298Asp) and –786 T/C polymorphisms in IBD patients and healthy controls are shown in Table 3. Genotypes and alleles frequencies were in accordance with Hardy–Weinberg equilibrium. Regarding to exon 7 (Glu298Asp) polymorphism, genotypes and allele frequencies did not differ significantly in IBD patients compared to controls. The GG genotype was decreased in controls (37.6%) compared to UC patients (44.3%), however, it failed to reach significance ( $P$ -value = 0.11). We also found no statistically significant association of the –786 T/C polymorphism with UC, CD or IBD.

We also estimated the *NOS3* haplotype frequencies and evaluated associations between these variants with UC and CD. The Glu298Asp and –786 T/C polymorphisms were not in LD ( $D' = 0.01$ , 0.08, and 0.12 for UC, CD and controls, respectively). Moreover, we found no association between *NOS3* haplotypes with UC, CD in our population.

**Table 1** Genotypic and allelic frequencies of (TAAA)<sub>n</sub> polymorphisms of *NOS2A* gene in Controls, **Ulcerative colitis (UC)** and **Crohn's disease (CD)** patients\*

(TAAA) <sub>n</sub>	Controls <i>n</i> = 332	UC <i>n</i> = 221	<i>P</i> -value, OR (95% CI)	CD <i>n</i> = 284	<i>P</i> -value OR (95% CI)
220/220	233 (70.1)	168 (76)		206 (72.5)	
220/224	95 (28.7)	47 (20.2)		76 (26.8)	
224/224	4 (1.1)	6 (2.7)		2 (0.7)	
220	561 (84.5)	383 (86.6)	0.31 OR 0.84 (0.59–1.19)	488 (86)	0.48 OR 0.89 (0.64–1.24)
224	103 (15.5)	59 (13.3)	0.31 OR 1.18 (0.83–1.67)	80 (14)	0.48 OR 1.12 (0.81–1.56)

\*Comparison of (TAAA)<sub>n</sub> genotype frequencies in UC and CD patients and controls, using 2 × 3 contingency table,  $P = 0.08$  (UC vs Controls),  $P = 0.7$  (CD vs controls).

A total of 505 IBD (221 with UC and 284 with CD) patients were recruited from Hospital Virgen de las Nieves (Granada) and Hospital Puerta del Mar (Cadiz). The diagnosis of Crohn's disease or ulcerative colitis was established according to conventional clinical, radiological, endoscopic and histological criteria (14). A total of 332 blood bank donors and bone marrow donors were included as healthy controls. All the subjects, patients and controls, were of Spanish white origin.

**Table 2** Allelic frequencies of (CCTTT)<sub>n</sub> microsatellite polymorphisms of *NOS2A* gene for Controls, **Ulcerative colitis (UC)** and **Crohn's disease (CD)** patients

Alleles	bp	Controls <i>n</i> = 332 (%)	UC <i>n</i> = 221 (%)	CD <i>n</i> = 284 (%)
7	171	3 (0.5)	0 (0)	0 (0)
8	176	13 (2.01)	14 (3.2)	19 (3.3)
9	181	32 (4.77)	20 (4.5)	16 (2.7)
10	186	73 (11.06)	49 (11.3)	61 (10.7)
11	191	138 (20.85)	95 (21.4)	127 (22.0)
12	196	210 (31.6)	133 (30.0)	182 (32.1)
13	201	132 (19.85)	65 (14.7)	88 (15.5)
14	206	47 (7.4)	47 (10.6)	45 (8.0)
15	211	13 (2.01)	16 (3.6)	22 (3.9)
16	216	3 (0.25)	3 (0.6)	8 (1.5)

*P*-values were no significant.

DNA from patients and controls was obtained from peripheral blood using standard methods. We determined the (TAAA)<sub>n</sub> and (CCTTT)<sub>n</sub> genotypes by a polymerase chain reaction (PCR)-based method combined with fluorescence technology as described previously (9,15). Forward and reverse primers were 5'-TGCCACTCCGCTCCAG-3' and 5'-GGCCTCTGAGATGTTGGTCTT-3' for (TAAA)<sub>n</sub>, and 5'-ACCCCTGGAAGCCTACAACCTGCAT-3' and 5'-GCCACTGCACCCTAGCCTGTCTCA-3', for (CCTTT)<sub>n</sub>. The forward primers were 5' labeled with the fluorescent dye 6-FAM. The different alleles of (CCTTT)<sub>n</sub> and (TAAA)<sub>n</sub> were resolved by capillary electrophoresis on automated DNA sequencer (AbiPrism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) and analyzed using Genotyper 3.7 (Applied Biosystems). The *NOS3*-786 T/C and exon 7 (Glu298Asp) gene variations were analyzed by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) as previously described (16). Briefly, for determination of the -786 polymorphism, a 306-base pair fragment was amplified using the following primers: forward 5'-GTGTACCCACCTGCATTCT-3' and reverse 5'-CCCAGCAAGGATGTAGTGAC-3'. The amplified fragment was digested with the enzyme *TurboNae*, resulting in uncut products of 306 base pairs for allele T and 225 and 81 base pairs for allele C. For determination of the exon 7 (Glu298Asp) polymorphism, a 248-base pair fragment was amplified using the following forward and reverse primers: 5'-AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGGA-3' and 5'-CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3', respectively. The PCR product was digested with the enzyme *Mbol* (17). The 248 bp PCR product is cleaved into 158 bp and 90 bp fragments in the presence of the T allele, but not in the presence of the G allele. In order to confirm the genotypes direct sequencing was performed on representative samples from each genotypes.

Next, available clinical characteristics of patients with IBD were analyzed for possible association with the different alleles or genotypes of *NOS3* and *NOS2A* polymorphisms. No correlation was observed between *NOS3* and *NOS2A* genetics variants and the following variables: sex, age at onset, smoking habits, extraintestinal manifestations, disease localization and immunosuppression for UC patients and subgroups of Vienna classification for CD patients (data not shown). Our study had more than 80% power to detect the relative risk for the polymorphisms (considering an odds ratio 1.8) at the 5% significance level.

Our study constitutes the first attempt to establish the potential implication of genetic variants in the *NOS2A* and *NOS3* genes in predisposition to IBD using a Spanish Caucasian cohort.

Several reports have shown that NO overproduction plays an important role in autoimmunity and inflammation (20). In inflamed intestinal areas of IBD, both eNOS and iNOS activity were enhanced (21, 22). In addition, iNOS is increased in circulating monocytes from patients with active IBD and this increased expression correlates with disease activity (7). The complex promoter of *NOS2A* gene contains multiple transcription initiation sites and it has been suggested that this region may have an important role in translational regulation of *NOS2A*. In the present

study we tested a biallelic marker (TAAA)<sub>n</sub> and (CCTTT)<sub>n</sub> microsatellite in the promoter region of *NOS2A* gene that could potentially affect expression of the iNOS enzyme. We did not obtain evidence to suggest that the *NOS2A* promoter polymorphisms are associated with IBD predisposition. Previous investigations of *NOS2A* polymorphisms have been reported association with other autoimmune diseases such multiple sclerosis and rheumatoid arthritis (23, 24). However, other studies did not demonstrate significant associations in both diseases (25, 26). In addition, *NOS2A* genetic variations have not been associated with other autoimmune diseases, such as celiac disease (27) and systemic lupus erythematosus (28).

However, it is important to consider the possibility that genetic variants elsewhere in the gene, especially in the 3' region, which are not in LD with these polymorphisms are associated with susceptibility to IBD. The high levels of NO observed in IBD patients may be caused by the action of proinflammatory mediators; combinations of cytokines or LPS with IFN- $\gamma$  induce iNOS expression synergistically. On the other hand high levels of NO could be explained by others post-transcriptional, translational and post-translational mechanisms.

The role of constitutively expressed eNOS in intestinal inflammation is not fully understood. Although different

**Table 3** Distribution of *NOS3* polymorphisms in Controls, **Ulcerative colitis (UC)** and **Crohn's disease (CD)** patients

	Controls <i>n</i> = 332 (%)	UC <i>n</i> = 221 (%)	p-value OR (95% CI)	CD <i>n</i> = 284 (%)	p-value OR (95% CI)
NOS3 Exon 7					
GG	125 (37.6)	98 (44.3)		113 (39.8)	
GT	169 (50.9)	94 (42.5)		132 (46.5)	
TT	38 (11.44)	29 (13.2)		39 (13.7)	
G	419 (63.1)	290 (65.6)	0.39 OR = 0.90 (0.69–1.16)	358 (63)	0.97 OR = 1 (0.78–1.27)
T	245 (36.9)	152 (34.4)	0.39 OR = 1.12 (0.86–1.45)	210 (37)	0.97 OR = 1 (0.78–1.27)
NOS3 – 786 T/C	CONTROLS	UC		CD	
TT	165 (49.7)	93 (42)		134 (47.1)	
CT	133 (40.06)	103 (46.6)		118 (41.5)	
CC	34 (10.24)	25 (4.11)		32 (11.4)	
T	463 (69.7)	289 (65.3)	0.12 OR = 0.82 (0.63–1.07)	386 (68)	0.5 OR = 0.92 (0.72–1.18)
C	201 (30.3)	153 (34.7)	0.12 OR = 1.22 (0.94–1.59)	182 (32)	0.5 OR = 1.09 (0.85–1.39)

\*Comparison of genotype frequencies of *NOS3* polymorphisms in UC and CD patients and controls, using  $2 \times 3$  contingency table.  $P = 0.15$  (Exon 7, UC vs controls),  $P = 0.48$  (Exon 7, CD vs controls).  $P = 0.20$  (*NOS3*-786 T/C, UC vs controls).  $P = 0.8$  (*NOS3*-786 T/C CD vs controls).

Allelic and genotypic frequencies were obtained by direct counting. Statistical analysis to compare allelic and genotypic distributions was performed by  $\chi^2$  tests. The software used was Statcalc program (Epi Info 2002; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Statistical significance was  $p < 0.05$ . For the haplotype analysis, pairwise linkage disequilibrium measures were investigated and haplotypes constructed using the expectation-maximization (EM) algorithm implemented in UNPHASED software (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/>) (18, 19). The power of study to detect an effect of polymorphisms in disease susceptibility was estimated using Quanto Software (Department of Preventive Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA).

studies showed that the –786 T/C polymorphism, and the Glu298Asp variation of *NOS3* may have functional effects (29, 30), our data suggest that *NOS3* polymorphisms have a negligible impact on predisposition to IBD. In concordance with our data a lack of association of *NOS3* polymorphisms with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis in European populations has been shown (23, 31). The association of *NOS3* variation with systemic lupus erythematosus found in Colombian (32), was not confirmed in a North American population (33). The interethnic differences in the distribution of *NOS3* polymorphism may account for the discrepancy between results (33, 34). Of note, the *NOS3* genotype and allele frequencies observed in our study were similar to those described in other Caucasian population (23, 31).

According to our findings, the increased levels of NO in the digestive tract of IBD individuals do not seem to be due to an effect of polymorphism in promoter region of *NOS2A* and *NOS3*. The numerous conflicting reports linking genetic polymorphisms and different diseases point to the multigene interactions and environmental factors that likely define a complex disease such as IBD.

Newer technologies utilizing microarray analysis or high through-put genotyping platforms provide a genome-wide look, bringing new insight to the pathogenesis of IBD and other complex genetic autoimmune diseases.

In conclusion, our data suggest that the *NOS2A* and *NOS3* polymorphisms analyzed do not have a major effect on IBD predisposition or clinical phenotype in our population.

### Acknowledgments

This work was supported by grant SAF03-3460 from Plan Nacional de I + D + I, and in part by Junta de Andalucía, grupo CTS-180.

### References

1. Newman B, Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; **21**: 401–7.
2. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; **6**: 3051–64.

3. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; **329**: 2002–12.
4. Bucher M, Ittner KP, Zimmermann M, Wolf K, Hobbhahn J, Kurtz A. Nitric oxide synthase isoform III gene expression in rat liver is up-regulated by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *FEBS Lett* 1997; **412**: 511–4.
5. Chen K, Inoue M, Wasa M, Fukuzawa M, Kamata S, Okada A. Expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase mRNA in gastrointestinal mucosa and its downregulation by endotoxin. *Life Sci* 1997; **61**: 1323–9.
6. Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 2003; **384**: 1343–64.
7. Dijkstra G, Zandvoort AJ, Kobold AC *et al.* Increased expression of inducible nitric oxide synthase in circulating monocytes from patients with active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; **37**: 546–54.
8. Palatka K, Serfozo Z, Vereb Z *et al.* Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric oxide synthase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2005; **40**: 670–80.
9. Warpeha KM, Xu W, Liu L *et al.* Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT) (n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J* 1999; **13**: 1825–32.
10. Bellamy R, Hill AV. Bi-allelic tetranucleotide repeat in the promoter of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Clin Genet* 1997; **52**: 192–3.
11. Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **29**: 802–7.
12. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C *et al.* Evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and inflammatory markers: the ATTICA study. *Am Heart J* 2004; **148**: 733–8.
13. Hyndman ME, Parsons HG, Verma S *et al.* The T-786 → C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 2002; **39**: 919–22.
14. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; **170**: 2–6.
15. Johannesen J, Pociot F, Kristiansen OP, Karlsen AE, Nerup J. No evidence for linkage in the promoter region of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2) in a Danish type 1 diabetes population. *Genes Immun* 2000; **1**: 362–6.
16. Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. Endothelial nitric oxide synthase haplotype associations in biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2003; **30**: 2019–22.
17. Guzik TJ, Black E, West NE *et al.* Relationship between the G894T polymorphism (Glu298Asp variant) in endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated endothelial function in human atherosclerosis. *Am J Med Genet* 2001; **100**: 130–7.
18. Dudbridge F. Methods and software for association tests of uncertain haplotypes in case-parent trios. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: A2338.
19. Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 2003; **25**: 115–21.
20. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 1141–51.
21. Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995; **36**: 718–23.
22. Kimura H, Miura S, Shigematsu T *et al.* Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997; **42**: 1047–54.
23. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Sanchez E *et al.* Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2004; **43**: 1182–5.
24. Barcellos LF, Begovich AB, Reynolds RL *et al.* Linkage and association with the NOS2A locus on chromosome 17q11 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2004; **55**: 793–800.
25. Pascual M, Lopez-Nevot MA, Caliz R *et al.* Genetic determinants of rheumatoid arthritis: the inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene promoter polymorphism. *Genes Immun* 2002; **3**: 299–301.
26. Blanco Y, Yague J, Graus F, Saiz A. No association of inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) to multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; **250**: 598–600.
27. Rueda B, Lopez-Nevot MA, Pascual M *et al.* Polymorphism of the inducible nitric oxide synthase gene in celiac disease. *Hum Immunol* 2002; **63**: 1062–5.
28. Lopez-Nevot MA, Ramal L, Jimenez-Alonso J, Martin J. The inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism does not confer susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2003; **42**: 113–6.
29. Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **14**: 2832–5.
30. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M *et al.* Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a –786T → C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 2629–37.
31. Allanore Y, Borderie D, Lemarechal H, Ekindjian OG, Kahan A. Lack of association of eNOS (G894T) and p22phox NADPH oxidase subunit (C242T) polymorphisms with systemic sclerosis in a cohort of French Caucasian patients. *Clin Chim Acta* 2004; **350**: 51–5.
32. Serrano NC, Paez C, Correa PA, Anaya JM. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004; **31**: 2163–8.
33. Douglas G, Reilly C, Dooley MA, Page G, Cooper G, Gilkeson G. Angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004; **31**: 1756–62.
34. Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC *et al.* Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 2005; **12**: 177–82.





## Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease

J Oliver, A Márquez, M Gómez-García, A Martínez, J L Mendoza, J R Vilchez, M A López-Nevot, A Piñero, E G de la Concha, A Nieto, E Urcelay and Dr J Martín

*Gut* 2007;56;150-151  
doi:10.1136/gut.2006.107649

---

Updated information and services can be found at:  
<http://gut.bmj.com/cgi/content/full/56/1/150>

---

*These include:*

**Email alerting service**

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

---

### Notes

---

To order reprints of this article go to:  
<http://www.bmjournals.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Gut* go to:  
<http://www.bmjournals.com/subscriptions/>

**J D Rioux**

Universite de Montreal, Montreal Heart Institute,  
Montreal, Quebec, Canada

**M J Daly**

The Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge,  
Massachusetts, USA

Correspondence to: Dr S Brescianini, Reparto di  
Epidemiologica Genetica, Centro Nazionale di  
Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della  
Salute, Istituto Superiore di Sanità, V.le Regina Elena,  
299, 00161 Roma, Italy; [sonia.brescianini@iss.it](mailto:sonia.brescianini@iss.it)

**Ethical approval:** There is IRB approval for all samples  
from the Charité in Berlin and from University of Kiel,  
where the samples were collected.

doi: 10.1136/gut.2006.102723

\*These authors contributed equally to this work.

JDR is supported by grants from the NIDDK and CCFA.

Competing interests: None declared.

**References**

- 1 **Gasche C**, Grundtner P. Genotypes and phenotypes in Crohn's disease: do they help in clinical management? *Gut* 2005;**54**:162-7.
- 2 **Rioux JD**, Daly MJ, Silverberg MS, *et al*. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001;**29**:223-8.
- 3 **Giallourakis C**, Stoll M, Miller K, *et al*. IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet* 2003;**73**:205-11.
- 4 **Armuzzi A**, Ahmad T, Ling KL, *et al*. Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut* 2003;**52**:1133-9.
- 5 **Vermeire S**, Pierik M, Hlavaty T, *et al*. Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology* 2005;**129**:1845-53.
- 6 **Palmieri O**, Latiano A, Valvano R, *et al*. Variants of OCTN1-2 cation transporter genes are associated with both Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;**23**:497-506.
- 7 **Latiano A**, Palmieri O, Valvano RM, *et al*. Contribution of IBD5 locus to clinical features of IBD patients. *Am J Gastroenterol* 2006;**101**:318-25.
- 8 **Noble CL**, Nimmo ER, Drummond H, *et al*. The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;**129**:1854-64.

## Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease

Macrophage migration inhibitory factor (MIF), an immunoregulatory cytokine that has pro-inflammatory, hormonal and enzymatic activities, has been found to be markedly increased in the serum of patients with inflammatory bowel disease (IBD).<sup>1,2</sup> MIF-deficient mice failed to develop disease<sup>1</sup> and blockage with anti-MIF antibody reduced disease activity.<sup>1,2</sup> Finally, functional polymorphisms of the human *MIF* gene have been associated with increased susceptibility to inflammatory and autoimmune diseases.<sup>3</sup> These findings prompted us to investigate the potential association of the functional *MIF* -173G/C and -794 (CATT)<sub>n</sub> gene variants with the susceptibility and clinical expression of IBD.

We studied a case-control cohort (cohort 1) comprising 336 patients with Crohn's disease and 287 patients with ulcerative colitis from south Spain and 361 controls from the same area. An additional cohort (cohort 2) was analysed, comprising 325 patients with Crohn's disease, 347 patients with ulcerative colitis and 526 controls from Madrid. Table 1 shows the clinical characteristics of both cohorts separately. *MIF* -173 and *MIF* CATT repeat genotyping was carried out as described previously.<sup>4</sup>

Evidence for association of *MIF* and IBD was found when the *MIF* -173G/C genotypes and alleles were compared between patients with IBD and controls from cohort 1 (table 2). The *MIF* -173\*G allele was associated with an increased susceptibility to IBD ( $p=0.002$ ). Similarly, an increased -173\*G allele frequency was observed in patients with IBD in cohort 2 ( $p=0.034$ ). In the combined analysis, the odds ratio (OR) for the estimated risk for the *MIF* -173\*G allele was 1.37 (95% confidence interval 1.1 to 1.6), with an overall  $p=0.001$ .

Next, we analysed the prevalence of the *MIF* -173G/C variation in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis independently. The *MIF* -173\*G allele frequency was significantly higher in patients with ulcerative colitis from cohorts 1 ( $p=0.02$ ) and 2 ( $p=0.01$ ) compared with their respective controls. Similarly, the allele frequency of the *MIF* polymorphism in patients with Crohn's disease from cohort 1 was significantly higher than in controls ( $p=0.002$ ). When the entire population with IBD was subdivided into ulcerative colitis and Crohn's disease cohorts, the *MIF* -173\*G allele was found to be associated with both disease subgroups (Crohn's disease, pooled OR = 1.3,  $p=0.004$ ; ulcerative colitis, pooled OR = 1.4,  $p=0.001$ ). No significant differences were observed in the distribution of CATT<sub>n</sub> genotype and allele frequencies between IBD, Crohn's disease, ulcerative colitis and controls in the two cohorts, when analysed independently or combined (data not shown). For the genotype-phenotype analysis, patients from cohorts 1 and 2 were grouped and

**Table 1** Clinical features of 558 Spanish patients with Crohn's disease and 472 Spanish patients with ulcerative colitis

	Cohort 1	Cohort 2
<i>Ulcerative colitis</i>		
Sex (% M)	49	43
Mean (SD) age at onset (y)	32.3 (13.7)	37.5 (12.3)
Mean (SD) disease duration (y)	8.1 (6.4)	11.8 (7.6)
Smoking habits (%)		
Never	51.9	43.2
Ex/current	48.1	56.8
Extraintestinal manifestations		
Cutaneous (%)	41.7	46.6
Articular (%)	13.7	15.8
Ocular (%)	35.8	36.8
	3.6	3.2
Disease location (%)		
Left sided	54.8	58.6
Extensive colitis/pancolitis	45.2	41.4
Surgery (%)		
Immunosuppression (%)	15.9	12.1
	26	23
<i>Crohn's disease</i>		
Sex (% M)	48	47.1
Mean (SD) age at onset (y)	29.2 (11.7)	27.3 (13.4)
<40 (A1)	82.3	80.1
>40 (A2)	17.7	19.9
Mean (SD) disease duration (y)	7.9 (6.1)	11 (6.6)
Smoking habits (%)		
Never	49.2	53.9
Ex/current	50.8	46.1
Disease location		
Ileal (L1)	41.2	47.9
Colonic (L2)	16.4	16.4
Ileocolonic (L3)	38.7	32.2
Upper GI tract (L4)	3.7	3.4
Disease behaviour		
Inflammatory (B1)	36.7	43.2
Structuring (B2)	25.3	15.1
Perforating (B3)	38	41.8
Extraintestinal manifestations		
Surgery (%)	37.8	36.9
Immunosuppression (%)	43.2	41.5
Infliximab (%)	46.8	45.1
	12.3	10.8

GI, gastrointestinal; M, male.

**Table 2** Genotype and allele frequencies of *MIF* -173G/C in patients with inflammatory bowel disease and in controls

<i>MIF</i> -173G/C	Genotypes, (n %)			Alleles, (n %)		p Value*	OR (95% CI)
	GG	GC	CC	G	C		
<b>Cohort 1</b>							
Controls (n = 361)	275 (76.2)	81 (22.4)	5 (1.4)	631 (87.4)	91 (12.6)		
IBD (n = 623)	423 (67.9)	178 (28.6)	22 (3.5)	1024 (82.2)	222 (17.8)	0.002	1.5 (1.1 to 1.9)
CD (n = 336)	227 (67.5)	94 (27.9)	15 (4.5)	548 (81.5)	124 (18.4)	0.002	1.5 (1.1 to 2.0)
UC (n = 287)	196 (68.3)	84 (29.3)	7 (2.4)	476 (82)	98 (17)	0.02	1.4 (1.04 to 1.9)
<b>Cohort 2</b>							
Controls (n = 526)	406 (77.2)	107 (20.3)	13 (2.5)	919 (87.3)	133 (12.6)		
IBD (n = 672)	484 (73.2)	165 (23.5)	23 (3.3)	1133 (84.3)	211 (15.7)	0.034	1.2 (1.01 to 1.6)
CD (n = 325)	239 (73.5)	78 (24)	8 (2.5)	556 (85.5)	94 (14.4)	0.2	1.1 (0.8 to 1.5)
UC (n = 347)	245 (72.9)	87 (23)	15 (3.9)	577 (83.1)	117 (16.8)	0.01	1.4 (1.07 to 1.8)
<b>Combined</b>							
Controls (n = 887)	681 (76.7)	188 (21.3)	18 (2)	1550 (87.4)	224 (12.6)		
IBD (n = 1295)	907 (70)	343 (26.4)	45 (3.4)	2157 (83.3)	433 (16.7)	0.001	1.3 (1.1 to 1.6)
CD (n = 661)	466 (70.5)	172 (26)	23 (3.5)	1104 (83.5)	218 (16.5)	0.002	1.3 (1.1 to 1.6)
UC (n = 634)	441 (70.9)	171 (25.7)	22 (3.3)	1053 (83)	215 (17)	0.001	1.4 (1.1 to 1.7)

CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis.

\*p Value of *MIF* -173\* C allele.

Mantel-Haenszel test:

IBD pooled OR 1.37, 95% CI 1.1 to 1.6; p=0.001.

CD pooled OR 1.34, 95% CI 1.1 to 1.6; p=0.005.

UC pooled OR 1.4, 95% CI 1.1 to 1.7; p=0.001.

analysed together, and no significant differences were observed.

Along with the data reported here, the observations that the *MIF* -173\* C risk allele is related to high *MIF* expression<sup>5</sup> and that serum *MIF* levels were markedly increased in patients with IBD<sup>1, 2</sup> support the involvement of *MIF* in the pathogenesis of IBD. Interestingly, transgenic overexpression of *MIF* renders mice markedly more susceptible to experimental colitis.<sup>6</sup> High levels of *MIF* in patients with IBD might immobilise macrophages and facilitate their localisation at the intestinal mucosa, leading to the production of several inflammatory cytokines. Upregulation of *MIF* in both Crohn's disease and ulcerative colitis indicates that *MIF* might contribute to a broad spectrum of inflammatory responses via innate and acquired immune systems in IBD that may involve different pathogenic mechanisms.<sup>7</sup>

The *MIF* allele frequencies found in the Spanish population are similar to those reported in other white populations.<sup>3</sup> It is remarkable that, although an increase in the *MIF* -173\* C allele was observed in patients with ulcerative colitis compared with controls, the *MIF* -173\* C allele was not associated with susceptibility to ulcerative colitis in the Japanese population.<sup>8</sup>

Regarding the genotype-phenotype analysis, we observed that *MIF* allele frequencies in the different ulcerative colitis and Crohn's disease subgroups were not significantly different when compared with other subphenotypes. It must be cautioned that the numbers in the ulcerative colitis and Crohn's disease subphenotype samples were small and should be expanded before the extent of associations can be properly assessed.

Autoimmune diseases such as IBD are presumed to have common underlying mechanisms and thus, some degree of shared genetic predisposition.<sup>9</sup> *MIF* genetic variants have been found to be associated with autoimmune diseases.<sup>3-5</sup> These observations, together with our findings that *MIF* gene polymorphisms are associated with IBD,

provide support for the notion that susceptibility to multiple autoimmune diseases may have some common susceptibility alleles or pathways.

#### J Oliver

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain

#### A Márquez

Servicio de Inmunología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

#### M Gómez-García

Servicio de Digestivo, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

#### A Martínez

Servicio de Inmunología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

#### J L Mendoza

Servicio de Digestivo, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

#### J R Vilchez, M A López-Nevot

Servicio de Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

#### A Piñero

Servicio de Digestivo, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

#### E G de la Concha

Servicio de Inmunología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

#### A Nieto

Servicio de Inmunología, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

#### E Urcelay

Servicio de Inmunología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

#### Dr J Martín

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain

Correspondence to: Dr J Martín, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC,

Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n 18100-Armilla, Granada, Spain; martin@ipb.csic.es

doi: 10.1136/gut.2006.107649

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Plan Nacional de I+D SAF2003-03460 and SAF2006-0398.

Competing interests: None.

## References

- de Jong YP, Abadía-Molina AC, Satoskar AR, *et al*. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine *MIF*. *Nat Immunol* 2001;2:1061-6.
- Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, *et al*. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 2002;123:256-70.
- Renner P, Roger T, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases. *Clin Infect Dis* 2005;41(Suppl 7):S513-19.
- Sanchez E, Gomez LM, Lopez-Nevot MA, *et al*. Evidence of association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2006;7:433-6.
- Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F, *et al*. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2402-9.
- Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:791-800.
- Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin Exp Immunol* 2005;141:412-21.
- Nohara H, Okayama N, Inoue N, *et al*. Association of the -173 G/C polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2004;39:242-6.
- Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001;2:802-9.

## Replication of an Association Between *IL23R* Gene Polymorphism With Inflammatory Bowel Disease

JAVIER OLIVER,\* BLANCA RUEDA,\* MIGUEL A. LÓPEZ-NEVOT,† MARÍA GÓMEZ-GARCÍA,§ and JAVIER MARTÍN\*

\*Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC; †Servicio de Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves; and §Servicio de Digestivo, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

**Background & Aims:** Recently, the interleukin 23 receptor (*IL23R*) gene encoding a subunit of the receptor of the inflammatory cytokine IL-23 has been identified as a novel genetic factor strongly associated with inflammatory bowel disease (IBD). We aimed to replicate the IBD association of *IL23R* genetic markers in an IBD independent Spanish cohort. **Methods:** Four hundred sixty IBD patients of Spanish white origin (238 CD and 222 UC) and 342 ethnically matched healthy controls comprised the study population. Eight single nucleotide polymorphisms (SNPs) spanning the *IL23R* gene and its downstream intergenic region were selected as genetic markers and genotyped by using Taqman 5' allelic discrimination assay. **Results:** All genetic variants located within the *IL23R* gene were observed to confer a strong protective effect against IBD susceptibility in our population. The Arg381Gln (rs11209026) non-synonymous SNP was most significantly associated with IBD protection (odds ratio, 0.4; 95% confidence interval, 0.3–0.7). In addition to the single SNP analysis, we performed a haplotype analysis identifying 2 haplotypes significantly associated with IBD protection. **Conclusions:** In this study we replicate the association of *IL23R* genetic variants with IBD in a Spanish population. These findings, together with the previous results, suggest that the *IL23R* gene is one of the genetic factors implicated in the genetics of IBD in the general population.

Crohn's disease and UC are 2 related, relapsing, and chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract, commonly denoted as IBD.<sup>1</sup> Although the precise etiology of IBD remains unknown, both animal models and human studies have pointed out a substantial genetic contribution to disease susceptibility.<sup>2</sup> Several chromosomal regions have been in linkage with IBD susceptibility in genome-wide scan analysis, and subsequent association studies further identified specific genetic variants associated with IBD.<sup>3,4</sup> The identification that the gene encoding the caspase-activating recruitment domain 15 (CARD15 or NOD2) is important in the pathogenesis of CD has refocused attention on the role of the innate immune system in IBD. Interleukin 12 (IL-12) and interleukin 23 (IL-23) are critical immunoregulatory cytokines that bridge innate and adaptive immunity, playing an important role in the intestinal inflammatory pathology.<sup>5</sup>

IL-23 is a recently discovered cytokine that bears structural and functional resemblance to IL-12. Like IL-12, IL-23 is primarily secreted by activated dendritic cells, monocytes, and macrophages.<sup>6</sup> IL-23 is a heterodimer composed of a subunit identical to IL-12 p40 and a novel IL-12 p35-related protein,

p19.<sup>7</sup> Besides a common subunit, IL-23 shares its receptor structure with IL-12. The high-affinity IL-23 receptor complex is composed of an IL-12Rβ1 and a unique cytokine receptor subunit termed IL-23R.<sup>8</sup> Although IL-12 and IL-23 share common p40 subunits, IL-23, rather than IL-12, seems to drive the pathogenesis of various experimental models of autoimmune diseases.<sup>9,10</sup> Specifically, IL-23 has emerged as a key player in chronic intestinal inflammation as shown in several models.<sup>11–14</sup> The proinflammatory activities of IL-23 have been partially ascribed to its ability to support the development of a novel subset of CD4<sup>+</sup> inflammatory T cells known as Th17 cells.<sup>5,14,15</sup> In addition, recent studies reported elevated expression of both IL-12 and IL-23 in the inflamed gut of CD patients.<sup>16,17</sup> These findings highlight the importance of the IL-12/IL-23 pathway components as functional candidate genes in IBD.

A very recent genome-wide association study showed that the *IL23R* gene, coding for a subunit of the receptor of IL-23 on chromosome 1p31, was strongly associated with IBD.<sup>18</sup> A non-coding variant (Arg381Gln) together with other genetic markers located in the *IL23R* gene and in its downstream intergenic region was identified as exerting a potent protective effect against IBD susceptibility.

The aim of the current study was to investigate whether the *IL23R* gene associated with IBD in a North American population is associated with IBD in a Spanish white population.

## Materials and Methods

### Patients and Controls

We studied a case-control cohort, comprising 460 IBD patients (238 CD and 222 UC) from the south of Spain region and 342 blood bank and bone marrow donors from the same area who were included as healthy individuals.

Both patient and control groups were of Spanish white origin and were matched for age and sex. Patients were diagnosed according to standard clinical, endoscopic, radiologic, and histopathologic criteria.<sup>19</sup> Information on demographic and clinical parameters of IBD patients has been published

**Abbreviations used in this paper:** CARD 15, caspase-activating recruitment domain 15; CD, Crohn's disease; CI, confidence interval; IBD, inflammatory bowel disease; IL, interleukin; LD, linkage disequilibrium; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism; UC, ulcerative colitis.

© 2007 by the AGA Institute  
1542-3565/07/\$32.00  
doi:10.1016/j.cgh.2007.05.002

**Table 1.** Genetic Variants Selected for the *IL23R* Gene Association Study

SNP	Gene location	Taqman SNP genotyping assay part number
rs1004819	Intron 5	C__1272321_10
rs7517847	Intron 6	C__30369702_10
rs10489629	Intron 7	C__30279129_20
rs11209026	Exon 9 (non-synonymous SNP: Arg381Gln)	C__1272298_10
rs1343151	Intron 9	C__8367043_10
rs10889677	Exon 11 (synonymous)	C__11283764_10
rs11209032	Intergenic	C__2720238_10
rs1495965	Intergenic	C__8361864_10

elsewhere.<sup>20</sup> The local ethical committee of the hospital approved the study.

### *IL23R* Single Nucleotide Polymorphism Selection and Genotyping

Eight single nucleotide polymorphisms (SNPs) spanning the *IL23R* gene located in intronic, coding, and 3' untranslated regions were selected as genetic markers for our association study on the basis of their previously reported association with IBD susceptibility (Table 1). Although 10 SNPs of the *IL23R* region were reported to be strongly associated with IBD genetic predisposition by Duerr et al,<sup>18</sup> with the tagger algorithm we determined that rs2201841 and rs11465804 SNPs were in complete linkage disequilibrium with rs10889677 and rs11209026 SNPs, respectively ( $r^2=1$ , Hapmap CEU dataset), and were not tested. Therefore, 8 of the previously studied *IL23R* genetic variants were analyzed in our population and genotyped by using a Taqman 5' allelic discrimination assay (Taqman Pre-designed SNP Genotyping Assays; Applied Biosystems, Foster City, CA) (Table 1).

### Statistical Analysis

Both allelic and genotypic frequencies were calculated and compared by  $\chi^2$  tests with the Statcalc software (Epi Info 2002; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Significance was calculated by  $2 \times 2$  contingency table and Fisher exact test to obtain *P* values, odds ratios (ORs), and 95% confidence intervals (CIs). Statistical significance was considered when  $P < 5E-02$ . The Haploview software was used to obtain linkage disequilibrium (LD) pairwise values, haplotype construction, and to implement the tagger algorithm.

As a test for association of *IL23R* SNPs independent of rs11209026, we compared the distribution of haplotypes not carrying the rs11209026 A allele in IBD patients and controls. In addition, a conditional case-control test implemented in the UNPHASED software was used as an overall test for independent association of rs11209026.

## Results

### *IL23R* Single Nucleotide Polymorphism Association Study

All 8 *IL23R* tested SNPs were observed to be in Hardy-Weinberg equilibrium in both healthy control and patient

groups. Seven of the analyzed markers (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs11209026, rs1343151, rs10889677, and rs1495965) showed statistically significant differences between cases and controls, considering either allelic or genotypic frequencies (Table 2). The strongest association was observed for the rs10489629 SNPs, with significant *P* values ranging from  $P = 2E-02$  to  $4E-05$  when testing for CD, UC, or IBD disease status. Meanwhile, the *IL23R* genetic variant with the highest protective effect against IBD as well as CD and UC development was the rs11209026 non-synonymous SNP, for which the lowest ORs were found (0.3 for CD, 0.6 for UC, and 0.4 for IBD) (Table 2). Only 1 of the 8 SNPs, the rs11209032 genetic variant, was not found to be significantly associated with IBD, CD, or UC, showing very similar allelic and genotypic frequencies in patient and control groups.

In addition, we investigated the LD pattern of the 8 tested *IL23R* SNPs and observed the existence of 2 haplotype blocks characterized by high *D'* pairwise values and defined by the 6 markers located within the *IL23R* gene, excluding the 2 SNPs located downstream of the gene. The first block (block 1) was determined by SNPs rs1004819 and rs7517847 and comprised the 11-kb region. A second block (block 2) spanning 36-kb included rs10489629, rs11209026, rs1343151, and rs10889677 genetic variants (Supplementary Figure 1). Two haplotypes GC (block 1) and AAAC (block 2) were significantly associated with protection against the development of IBD (ORs, 0.6 and 0.4, respectively) (Supplementary Table 1).

Because of the high degree of LD existing in this region, we investigated whether the contribution of the tested *IL23R* SNPs was independent of the rs11209026 genetic variant, which showed the most significant association, or whether all of the association evidence can be explained by linkage with rs11209026. After stratifying the case-control groups by rs11209026 alleles, we observed that several of the *IL23R* analyzed SNPs maintained the association in the absence of the rs11209026 A protective allele (Table 3). In addition, the overall conditional extended case-control test for *IL23R* SNPs conditioned on the rs11209026 polymorphism confirmed the existence of different independent effects throughout the *IL23R* gene, contributing to IBD in our population (Table 3).

### *IL23R* Gene Variants: Interaction With Caspase-activating Recruitment Domain 15 Gene and Association With Clinical Manifestations

To test gene-gene interaction, all patients with CD were stratified according to their *CARD15* phenotype. There was no difference in allele frequencies for the studied variants in *IL23R* gene between *CARD15*-positive (defined as carrying at least one *CARD15* variant) and *CARD15*-negative patients (data not shown).

In general, *IL23R* allele frequencies within the various CD and UC subphenotypes showed small variations and were not statistically different when compared with other subphenotypes, a factor compounded by the relatively small numbers of each phenotype observed (data not shown).

## Discussion

Genetic association studies represent one of the most powerful and direct approaches to investigate the basis of

**Table 2.** IL23R Single Marker Analysis in Spanish Case-Control Cohorts

IL23R SNP	Healthy controls (n = 342)						CD (n = 238)						UC (n = 222)						IBD (n = 420)											
	Allele		Genotypes		MAF	P value allele	Genotypes		MAF	P value allele	Genotypes		MAF	P value allele	Genotypes		MAF	P value allele	Genotypes		MAF	P value allele	Genotypes		MAF	P value allele	Genotypes		MAF	P value allele
	1	2	11	12	22	22	11	12	22	22	11	12	22	22	11	12	22	22	11	12	22	22	11	12	22	22	11	12	22	22
rs1004819	G <sup>a</sup>	A	170	137	35	0.30	86	130	22	0.37	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	84	109	29	0.38	9E-03	0.7 (0.5-0.92)	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)
rs7517847	A	C <sup>a</sup>	121	153	68	0.42	101	119	18	0.32	8E-04	0.6 (0.5-0.8)	92	102	28	0.36	2E-02	0.8 (0.5-0.9)	7E-04	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)	2E-02	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)	2E-02	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)	2E-02	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)
rs10489629	G	A <sup>a</sup>	78	192	72	0.49	85	130	23	0.37	4E-05	0.6 (0.4-0.7)	69	118	35	0.42	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	1E-04	0.6 (0.5-0.8)	0.6 (0.5-0.8)	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	0.7 (0.5-0.9)
rs11209026	G	A <sup>a</sup>	302	34	6	0.07	226	12	0	0.02	1E-03	0.3 (0.1-0.7)	203	19	0	0.40	8E-02	0.6 (0.3-1.09)	1E-03	0.4 (0.3-0.7)	0.4 (0.3-0.7)	8E-02	0.6 (0.3-1.09)	0.6 (0.3-1.09)	1E-03	0.4 (0.3-0.7)	0.4 (0.3-0.7)	1E-03	0.4 (0.3-0.7)	0.4 (0.3-0.7)
rs1343151	G	A <sup>a</sup>	136	157	49	0.37	109	108	21	0.31	4E-02	0.7 (0.6-0.9)	99	101	22	0.33	1E-01	0.8 (0.6-1.05)	2E-02	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)	2E-02	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)	2E-02	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)	2E-02	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)
rs10889677	C <sup>a</sup>	A	167	134	41	0.32	84	127	27	0.38	2E-02	0.7 (0.5-0.9)	75	112	35	0.41	1E-03	0.8 (0.6-1.07)	1E-03	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)	1E-03	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)	1E-03	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)	1E-03	0.7 (0.5-0.8)	0.7 (0.5-0.8)
rs11209032	G	A	161	137	44	0.33	92	116	30	0.37	1E-01	0.8 (0.6-1.1)	101	100	21	0.37	1E-01	0.8 (0.6-1.07)	9E-02	0.8 (0.6-1.03)	0.8 (0.6-1.03)	9E-02	0.8 (0.6-1.03)	0.8 (0.6-1.03)	9E-02	0.8 (0.6-1.03)	0.8 (0.6-1.03)	9E-02	0.8 (0.6-1.03)	0.8 (0.6-1.03)
rs1495965	G	A	135	139	68	0.40	64	115	59	0.49	3E-03	0.7 (0.5-0.8)	68	109	45	0.45	1E-01	0.8 (0.6-1.05)	7E-03	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)	7E-03	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)	7E-03	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)	7E-03	0.7 (0.6-0.9)	0.7 (0.6-0.9)

<sup>a</sup>Protective allele.

**Table 3.** Test for Association of IL23R SNPs Independent of rs11209026 (Arg381Gln) SNP

SNP	Gene location	Stratification by rs11209026 A allele, P value <sup>a</sup>	Overall test for independence, P value <sup>b</sup>
rs1004819	Intron 5	.007	.02
rs7517847	Intron 6	.01	.04
rs10489629	Intron 7	.0004	.01
rs1343151	Intron 9	.19	.2
rs10889677	Exon 11	.04	.01
rs11209032	Intergenic	8.3E-7	2.7E-9
rs1495965	Intergenic	.12	.14

<sup>a</sup>Association test for haplotypes lacking the rs11209026 A allele.

<sup>b</sup>Conditional extended case-control analysis for IL23R SNPs conditioned on rs11209026.

human complex diseases. However, in many cases reported associations are not consistently reproducible.<sup>21,22</sup> Therefore, the independent replication of results is a key feature of association studies that strengthens their confidence and validates disease gene association.<sup>21</sup>

The present study replicates a recently reported association of IL23R gene with IBD susceptibility. We analyzed 8 genetic variants spanning the IL23R gene and its downstream intergenic region that were significantly associated with IBD in a North American population.<sup>18</sup> Interestingly, several IL23R genetic variants were found to exert an independent and strong protective effect against IBD susceptibility in a Spanish population, confirming the contribution of IL23R gene to IBD genetics. The only difference with the previously reported results was the lack of association of the rs11209032 genetic variant located in the intergenic region between IL23R and IL12RB2 genes. Although a second marker in this region (rs1495965) showed a significant association with IBD in our population, when performing a haplotype analysis we observed that this effect might be due to the strong LD with Gln381Arg SNP (D' = 0.93). In fact, the analysis of the rs1495965 conditioned on Gln381Arg showed that its effect was dependent of the latter (conditional case-control test, P = 0.2) (Table 3). Therefore, the existence of a genetic marker associated with IBD mapping in the IL23R intergenic region seems to be unlikely in our population. The different associations of the IL23R intergenic region polymorphisms in North American and Spanish populations might account for genetic heterogeneity in LD patterns and ancestral haplotype backgrounds between both populations.

Although the available genetic data implicate the IL23R gene as determinant of IBD predisposition, the clinical importance of these data remains unclear. We found that IL23R mutations do not influence the phenotype expression of the disease. It might be cautioned, however, that the numbers in the CD and UC subphenotype samples were relatively small and should be expanded before drawing any definitive conclusions regarding the influence of IL23R variants in the disease phenotype.

The strongest protective effect of IL23R genetic variants is exerted by an uncommon non-synonymous Arg381Gln polymorphism, located in the exon 9 and coding for the 1053R intracytoplasmic tail. The most common Arg381 allele is located in the initial portion of the intracytoplasmic region,

very near the first putative tyrosine phosphorylation site located in the 399 position. Therefore, the change of the highly conserved Arg381 for Gln381 might have functional consequences in the transducing pathway of IL23R, modifying the interaction between IL23R and its associated Jack2 kinase. This might lead to a reduction in the cellular response to IL-23 and could explain the protective effect of this infrequent allele in IBD pathogenesis.

It has been described that IL23R has 6 different splicing forms, with differential expression depending on the cellular subset.<sup>23</sup> CD4+ lymphocytes have a complex IL23R pattern, expressing together with IL23R1, IL23R3, IL23R2, and /or IL23R4. IL23R3 and IL23R4 are 2 soluble forms lacking the exon 10 that codifies for the transmembrane region. These alternative IL23R splice forms might block the binding of IL-23 with its receptor membrane-anchor isoforms inhibiting its signaling pathway. Interestingly, we observed a protective *IL23R* haplotype (AAAC) including the Gln381 allele together with 3 alleles of *IL23R* variants (rs100489629, rs11209026, and rs10889677) flanking the exon 10. Therefore, it could be hypothesized that this protective haplotype might affect IL23R splicing, leading to a higher expression of soluble isoforms inhibiting IL-23 proinflammatory activities and exerting a protective effect in IBD.

IL-12 and IL-23 are master regulators of innate and adaptive immunity.<sup>5</sup> The balance and timing for production of these 2 immunoregulatory cytokines are critically important in driving and efficient cellular immune response. Because of its proinflammatory and immunoregulatory activities, the IL-12 and IL-23 signaling pathway molecules might be important candidate genes for autoimmune diseases. However, no evidence for association of *IL12RB1*, *IL12B*, or *IL23A* genes with IBD has been reported.<sup>18,24</sup> Similarly, we previously observed no evidence of association of *IL12B*, *IL12RB1*, and *IL23A* genes in systemic lupus erythematosus<sup>25</sup> or rheumatoid arthritis.<sup>26</sup> Together these findings suggest that the *IL12B*, *IL12RB1*, and *IL23A* gene variants do not play a relevant role in autoimmunity. Nevertheless, the recently discovered implication of *IL23R* gene in IBD genetics prompted us to investigate the possible implication of *IL23R* gene in other autoimmune diseases. Thus, we analyzed the *IL23R* gene variant in our systemic lupus erythematosus cohort. However, no evidence of association was observed (unpublished observations). Interestingly, recent data suggest that IL-23 is essential for local tissue inflammation in the intestine but not required for systemic inflammation.<sup>27</sup> Although the mechanisms behind the *IL23R* gene association with IBD are still unknown, it is tempting to speculate that the *IL23R* association with IBD, and not with systemic lupus erythematosus, the prototype of systemic autoimmunity, might be related to the fact that IL-23 is a key effector cytokine for local but not for systemic inflammation.

In summary, the results obtained in the present study confirm previous findings in independent cohorts and therefore reinforce the role of the *IL23R* gene polymorphism as a genetic determinant in IBD.

### Supplementary Data

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Clinical Gastroenterology and Hepatology* at [www.cghjournal.org](http://www.cghjournal.org).

### References

- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417–429.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521–533.
- Vermeire S, Rutgeerts P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 2005;6:637–645.
- Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, et al. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 2006; 367:1271–1284.
- Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, et al. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2004;202:96–105.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003;19:641–644.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715–725.
- Parham C, Chirica M, Timans J, et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002;168: 5699–5708.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003;421:744–748.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951–1957.
- Becker C, Wirtz S, Blessing M, et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003;112:693–706.
- Hue S, Ahern P, Buonocore S, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203:2473–2483.
- Kullberg MC, Jankovic D, Feng CG, et al. IL-23 plays a key role in *Helicobacter hepaticus*-induced T cell-dependent colitis. *J Exp Med* 2006;203:2485–2494.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310–1316.
- McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006;27:17–23.
- Fuss IJ, Becker C, Yang Z, et al. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:9–15.
- Schmidt C, Giese T, Ludwig B, et al. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11: 16–23.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461–1463.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:2–6; discussion 16–19.
- Oliver J, Marquez A, Gómez-García M, et al. Association of the macrophage inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;56:150–151.
- Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, et al. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 2003;361:567–571.
- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003;33:177–182.

23. Zhang XY, Zhang HJ, Zhang Y, et al. Identification and expression analysis of alternatively spliced isoforms of human interleukin-23 receptor gene in normal lymphoid cells and selected tumor cells. *Immunogenetics* 2006;57:934–943.
24. Zwiers A, Seegers D, Heijmans R, et al. Definition of polymorphisms and haplotypes in the interleukin-12B gene: association with IL-12 production but not with Crohn's disease. *Genes Immun* 2004;5:675–677.
25. Sanchez E, Morales S, Paco L, et al. Interleukin 12 (IL12B), interleukin 12 receptor (IL12RB1) and interleukin 23 (IL23A) gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1136–1139.
26. Orozco G, Gonzalez-Gay MA, Paco L, et al. Interleukin 12 (IL12B) and interleukin 12 receptor (IL12RB1) gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2005;66:710–715.
27. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, et al. Differential activity of IL-12

and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006;25:309–318.

---

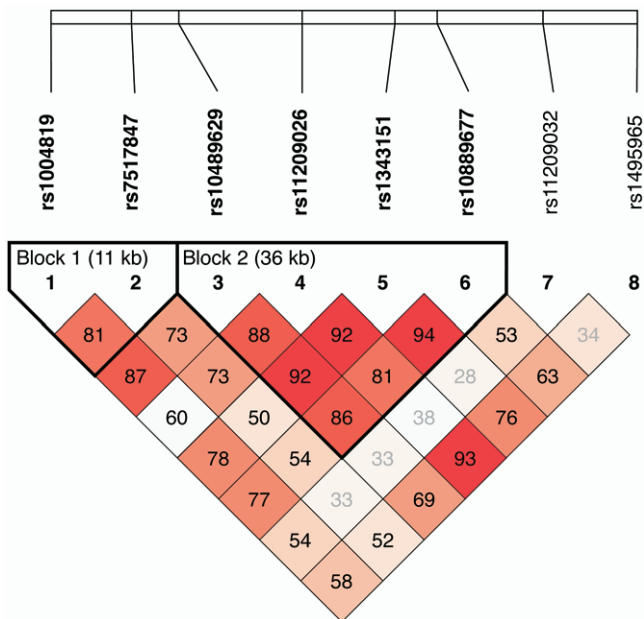
Address requests for reprints to: Javier Martín, MD, PhD, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra," CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100-Armilla, Granada, Spain. e-mail: martin@ipb.csic.es; fax: +34-958-181632.

Supported by grants SAF2006-00398 and in part by Junta de Andalucía, grupo CTS-180.

Drs Oliver and Rueda have contributed equally to this work

The authors are most grateful to Gema Robledo and Ma. Paz Ruiz for their expert technical assistance. We are grateful to all IBD patients and controls for their participation in this study.





**Supplementary Figure 1.** Pairwise linkage disequilibrium LD between the eight *IL23R* tested SNPs, given by the  $D'$  obtained computing the genotype data.

**Supplementary Table 1.** Distribution of the *IL23R* haplotype blocks in Spanish case-control cohorts.

Haplotype		Healthy controls (2n=684)			Crohn's disease (2n=476)			Ulcerative colitis (2n=444)			IBD (2n=920)		
Block 1													
rs1004819	rs7517847												
G	C	272 (39.7)	140 (29.4)	0.0002E-04	145 (32.7)	1E-02	0.7 (0.5-1)	2E-04	0.6 (0.5-0.8)				
G	A	203 (29.7)	164 (34.4)	0.08E-02	133 (29.9)	9E-01	1 (0.7-1.3)	3E-01	1.1 (0.9-1.4)				
A	A	188 (27.5)	160 (33.6)	0.02E-02	152 (34.2)	1E-02	1.4 (1-1.8)	5E-03	1.3 (1-1.6)				
A	C	21 (3.1)	12 (2.5)	1	14 (3.1)	1	1 (0.8-1.2)	1	1 (0.8-1.2)				
(2n=920)													
Block 2		Healthy controls (2n=684)			Crohn's disease (2n=476)			Ulcerative colitis (2n=444)			IBD (2n=920)		
rs10489629	rs11209026	rs1343151	rs10889677										
G	G	G	A	195 (28.5)	175 (36.8)	3E-03	164 (36.9)	2E-03	1.5 (1.1-1.9)	4E-03	1.4 (1.2-1.8)		
A	G	A	C	202 (29.5)	128 (26.9)	3E-01	117 (26.3)	2E-01	0.8 (0.6-1.1)	2E-01	0.8 (0.6-1.1)		
G	G	G	C	137 (20.0)	103 (21.6)	5E-01	91 (20.5)	8E-01	1 (0.7-1.4)	6E-01	1.1 (0.8-1.3)		
A	G	G	C	83 (12.1)	47 (9.9)	9E-01	41 (9.2)	9E-01	1 (0.8-1.1)	9E-01	1 (0.8-1.1)		
A	A	A	C	43 (6.3)	11 (2.4)	1E-03	13 (3.0)	1E-02	0.5 (0.2-0.9)	2E-03	0.4 (0.2-0.7)		
	Others*			24 (3.5)	12 (2.5)	3E-01	18 (4.0)	6E-01	1.2 (0.6-2.4)	7E-01	0.9 (0.5-1.7)		

Considering CD and UC independently this protective effect was still significant. Additionally, two at-risk haplotypes were identified AA (block 1) and GGA (block2) that were significantly over-represented among Crohn's disease and UC patients compared with controls (Table 3). This association remained significant for IBD, with an OR of 1.3 for the AA haplotype and 1.4 for the GGA haplotype (Table 3). The distribution of the rest of common haplotypes (frequency > 5%) did not show any statistically significant deviation between patients (CD, UC and IBD) and controls.



## MYO9B polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease

C Núñez, J Oliver, J L Mendoza, M Gómez-García, A Piñero, C Taxonera, M Díaz-Rubio, M A López-Nevot, E G de la Concha, A Nieto, E Urcelay, A Martínez and J Martín

*Gut* 2007;56;1321-1322  
doi:10.1136/gut.2007.121905

---

Updated information and services can be found at:  
<http://gut.bmj.com/cgi/content/full/56/9/1321>

---

*These include:*

### References

This article cites 7 articles, 3 of which can be accessed free at:  
<http://gut.bmj.com/cgi/content/full/56/9/1321#BIBL>

### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

---

### Notes

---

To order reprints of this article go to:  
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Gut* go to:  
<http://journals.bmj.com/subscriptions/>

- aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut* 2006;**55**:47–53.
- 11 Hyams J, Markowitz J, Lerer T, *et al*. The natural history of corticosteroid therapy for ulcerative colitis in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;**4**:1118–23.
- 12 Decorti G, De Ludicibus S, Stocco G, *et al*. Glucocorticoid receptor polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Gut* 2006;**55**:1053–4.
- 13 Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, *et al*. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:1846–52.
- 14 Sakaeda T. MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;**20**:391–414.

## MYO9B polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease

An abnormal function of the intestinal barrier has been found not only in patients with inflammatory bowel disease (IBD) but even in their healthy relatives, suggesting that this condition may precede disease onset by years.<sup>1</sup> A genetic alteration in the intestinal permeability has also been proposed to exist in patients with coeliac disease. In support of this proposal, polymorphisms in the *MYO9B* gene (the gene for myosin IXb involved in cytoskeleton remodelling) were found to be associated with increased susceptibility to coeliac disease.<sup>2</sup>

The *MYO9B* gene has recently been investigated in relation to IBD and produced discordant results. No association was observed in a Norwegian population,<sup>3</sup> but shortly afterwards an international collaboration group performed a statistically powerful study on samples collected from the UK, Netherlands, Canada and Italy in which *MYO9B* was found to be associated with IBD, and with ulcerative colitis and Crohn's disease considered separately in some populations.<sup>4</sup> In that study, a stronger effect was seen in ulcerative colitis

than in Crohn's disease. Our aim in the present study was to evaluate the described *MYO9B* associations in a large sample of Spanish patients with IBD.

We performed a case-control study of 627 patients with ulcerative colitis and 677 with Crohn's disease recruited from three Spanish hospitals; 990 blood donors of the same ethnicity were used as controls. Written informed consent was obtained from all subjects and ethical approval for the study was obtained from the ethics committees of the hospitals. The diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease was based on standard clinical, radiological, endoscopic and histological criteria. Clinical data from essentially the same cohort can be found in a previous report.<sup>5</sup>

Table 1 shows the distribution of *MYO9B* polymorphisms in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease and in healthy controls. All single nucleotide polymorphisms (SNPs) conformed to Hardy-Weinberg predictions in our control sample. In all cases a strong association was seen when patients with ulcerative colitis were compared with healthy controls. However, the association with Crohn's disease was almost negligible. Moreover, when patients with ulcerative colitis were compared with those with Crohn's disease, significant differences were observed. Stratification of the patients by clinical characteristics did not show differences between the groups.

Table 2 shows the *MYO9B* haplotype distribution estimated by the expectation-maximisation algorithm. Only the most strongly associated SNPs, in tight linkage disequilibrium as shown in the previous exhaustive research in coeliac disease susceptibility, were included in our study. It is therefore not surprising that the haplotypes show results which closely mirror those found with individual polymorphisms. In particular, the rs2305767G allele is an almost perfect marker

of the first haplotype (GCG) and rs1457092A allele of the second haplotype (AAA). The AAA haplotype confers a strong predisposition to ulcerative colitis compared with the GCG haplotype ( $p = 0.0001$ ).

This study shows a clear association of *MYO9B* polymorphisms with ulcerative colitis in the Spanish population but not with Crohn's disease. This lack of association does not seem to be derived from a low statistical power (68% for rs1457092 with OR 1.20), because the size of our Crohn's disease sample was high enough to show a strong difference with ulcerative colitis. A lower association has previously been observed with Crohn's disease than with ulcerative colitis, and no association with Crohn's disease was found in the Canadian/Italian sample.<sup>4</sup>

The diverse results found in the previous studies are difficult to explain. It may be that the low intrinsic OR renders most of the studies underpowered and an association is found only with luck. Another explanation might be the heterogeneous nature of the disease. There is also no easy explanation for the strikingly different susceptibility to Crohn's disease and ulcerative colitis. To our knowledge, no report has claimed that there is a difference in barrier function between the two diseases. However, this is not the first time that genetic differences have been reported between these two forms of IBD.<sup>6</sup> Since twin concordance rate data for ulcerative colitis suggest that the heritable component is less important than for Crohn's disease, it has been proposed that environmental factors have a stronger impact in ulcerative colitis.<sup>7</sup> It is therefore intriguing that the *MYO9B* gene, which seems specifically to affect susceptibility to ulcerative colitis, is probably involved in loss of tolerance to environmental agents. However, functional analyses are needed to explore further the role of this gene in ulcerative colitis and other diseases.

**Table 1** *MYO9B* polymorphisms in Spanish patients with ulcerative colitis, Crohn's disease and controls

	UC (n = 677) n (%)	CD (n = 627) n (%)	Controls (n = 990) n (%)	UC vs controls	CD vs controls	UC vs CD
<b>Rs2305767</b>						
AA	263 (39)	183 (29)	296 (30)	3*2	3*2	3*2
AG	297 (44)	318 (51)	518 (52)	p=0.0004	p=0.51	p=0.001
GG	117 (17)	126 (20)	176 (18)			
A	823 (61)	684 (55)	1110 (56)	G vs A: p=0.007 OR=0.82 (95% CI 0.71 to 0.95)	G vs A: p=0.40 OR=1.06 (95% CI 0.92 to 1.23)	G vs A: p=0.001 OR=0.77 (95% CI 0.66 to 0.91)
G	531 (39)	570 (45)	870 (44)			
<b>Rs1457092</b>						
CC	258 (38)	281 (45)	403 (41)	3*2	3*2	3*2
CA	282 (42)	257 (41)	451 (46)	p=0.002	p=0.18	p=0.005
AA	137 (20)	89 (14)	136 (14)			
C	798 (59)	819 (65)	1257 (63)	A vs C: p=0.008 OR=1.21 (95% CI 1.05 to 1.40)	A vs C: p=0.29 OR=0.92 (95% CI 0.79 to 1.07)	A vs C: p=0.0008 OR=1.31 (95% CI 1.12 to 1.54)
A	556 (41)	435 (35)	723 (37)			
<b>Rs2305764</b>						
GG	227 (34)	262 (42)	364 (37)	3*2	3*2	3*2
GA	300 (44)	269 (43)	469 (47)	p=0.005	p=0.12	p=0.0008
AA	150 (22)	96 (15)	157 (16)			
G	754 (56)	793 (63)	1197 (60)	A vs G: p=0.006 OR=1.22 (95% CI 1.05 to 1.40)	A vs G: p=0.11 OR=0.89 (95% CI 0.77 to 1.03)	A vs G: p=0.00009 OR=1.37 (95% CI 1.17 to 1.61)
A	600 (44)	461 (37)	783 (40)			

Genotyping was performed by TaqMan technology under conditions recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis.

**Table 2** MYO9B haplotypes in Spanish patients with ulcerative colitis, Crohn's disease and controls

Rs2305767/ rs1457092/ rs2305764	UC (n = 1356) n (%)	CD (n = 1254) n (%)	Controls (n = 1980) n (%)	UC vs controls	CD vs controls	UC vs CD
GCG	516 (38)	563 (45)	844 (43)	p=0.008 OR=0.83 (95% CI 0.72 to 0.95)	p=0.20 OR=1.10 (95% CI 0.95 to 1.27)	p=0.0004 OR=0.75 (95% CI 0.64 to 0.89)
AAA	549 (40)	424 (34)	713 (36)	p=0.009 OR=1.21 (95% CI 1.05 to 1.40)	p=0.20 OR=0.91 (95% CI 0.78 to 1.06)	p=0.0004 OR=1.33 (95% CI 1.13 to 1.57)
ACG	226 (17)	223 (18)	347 (18)	p=0.52 OR=0.94 (95% CI 0.78 to 1.14)	p=0.85 OR=1.02 (95% CI 0.84 to 1.23)	p=0.45 OR=0.92 (95% CI 0.75 to 1.14)
ACA	42 (3.1)	24 (1.9)	46 (2.3)	p=0.17 OR=1.34 (95% CI 0.86 to 2.10)	p=0.44 OR=0.82 (95% CI 0.48 to 1.39)	p=0.05 OR=1.64 (95% CI 0.96 to 2.81)
Rare haplotypes	23 (1.7)	20 (1.6)	30 (1.5)	p=0.68 OR=1.12 (95% CI 0.63 to 2.00)	p=0.86 OR=1.05 (95% CI 0.57 to 1.93)	p=0.84 OR=1.06 (95% CI 0.56 to 2.03)

Haplotypes were estimated by the expectation-maximisation algorithm implemented in the Arlequin software.  
CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis.

## Acknowledgements

The authors thank Carmen Martínez Cuervo for her expert technical assistance.

### C Núñez\*

Clinical Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

### J Oliver\*

Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Spain

### J L Mendoza

Gastroenterology Unit, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

### M Gómez-García

Gastroenterology Unit, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

### A Piñero

Gastroenterology Unit, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

### C Taxonera, M Díaz-Rubio

Gastroenterology Unit, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

### M A López-Nevot

Immunology Department, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

### E G de la Concha

Clinical Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

### A Nieto

Immunology Department, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain

### E Urcelay, A Martínez\*

Clinical Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

### J Martín\*

Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Spain

Correspondence to: Dr A Martínez Doncel, Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, C/Martín Lagos, sn 28040 Madrid, Spain; [alfmdoncel@terra.es](mailto:alfmdoncel@terra.es)

doi: 10.1136/gut.2007.121905

\*These authors contributed equally to this work.

This work was supported by grants SAF2003-08522 and SAF2006-00398. AM has a FIS contract (CP04/00175) and EU works for the "Fundación para la Investigación Biomédica-Hospital Clínico San Carlos".

Competing interests: None.

## References

- Buhner S, Buning C, Genschel J, *et al*. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006;**55**:342–7.
- Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, *et al*. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet* 2005;**37**:1341–4.
- Amundsen SS, Vatn M, Wijmenga C, *et al*. Association analysis of MYO9B gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Norwegian cohort. *Tissue Antigens* 2006;**68**:249–52.
- van Bodegraven AA, Curley CR, Hunt KA, *et al*. Genetic variation in myosin IXB is associated with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006;**131**:1768–74.
- Oliver J, Marquez A, Gomez-Garcia M, *et al*. Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease. *Gut* 2007;**56**:150–1.
- van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, *et al*. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:763–70.
- Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;**18**:525–39.

## Cathepsin B gene polymorphism Val26 is not associated with idiopathic chronic pancreatitis in European patients

Pancreatitis is thought to be a disease of autodigestion triggered by premature and intracellular activation of digestive proteases.<sup>1</sup> We and others have shown that lysosomal cathepsin B can activate trypsinogen intracellularly<sup>2</sup> and that a large proportion of pancreatic cathepsin B is physiologically sorted into the secretory compartment.<sup>3</sup> Further support for a role of cathepsin B in pancreatitis came from a recent study published by Mahurkar and coworkers in *Gut*<sup>4</sup> in which the authors reported that a leucine to valine mutation at position 26 of cathepsin B (L26V) is associated with tropical calcifying pancreatitis (odds ratio ~2.2) in patients from southern India. Tropical calcifying pancreatitis is also associated (in up to 50% of cases) with mutations in the SPINK1 gene<sup>5</sup>—with N34S being the most common mutation. In the study by Mahurkar *et al* the

cathepsin B L26V mutation was, however, equally as common in SPINK1 N34S patients as in SPINK1 wild type patients, which suggests that cathepsin B is involved in an independent disease causing mechanism for pancreatitis.

As idiopathic chronic pancreatitis in Western countries and tropical calcifying pancreatitis in India share a high prevalence of SPINK1 mutations,<sup>5</sup> we investigated whether the former is also associated with the L26V cathepsin B mutation. We studied 64 patients with idiopathic chronic pancreatitis (ICP, defined as having unequivocal morphological evidence of chronic pancreatitis on computed tomography or endoscopic retrograde cholangio-pancreatography, or both) from northern Germany (aged 3 to 68 years; 38 male, 26 female) and 100 locally recruited healthy control subjects according to a recently reported ethics committee approved protocol.<sup>6</sup> Patients with known risk factors for pancreatitis, such as a history of regular alcohol consumption (more than two drinks or 20 g a day), or with biliary, metabolic, or endocrine disorders, cystic fibrosis, or hereditary pancreatitis were excluded.

Genomic DNA was extracted from blood leucocytes and polymerase chain reaction amplification of exons 2 and 3 of the cathepsin B gene was undertaken using specific oligonucleotides (sense: CGA GAC GGT GCC CCT GTG TGT G; antisense: GAG GCC TTC ACT CTC CCA CTT CC). Sequencing of cathepsin B exons in ICP patients identified 31 heterozygous and 10 homozygous Val26 alleles (allele frequency 0.398), while in the control cohort we found 46 heterozygous and 25 homozygous Val26 mutations (allele frequency 0.48; table 1). To our surprise and in contrast to the study by Mahurkar *et al*,<sup>4</sup> the allele frequency of cathepsin B Val26 appeared to be even higher among controls than among ICP patients.

Being faced with a Val26 allele frequency higher in Western control subjects than in Indian pancreatitis patients, we searched the SNP Genbank of NCBI for ethnic cohorts in whom the frequency of the Val26 variant had been reported. From the reported 16 groups of diverse ethnic backgrounds, the nine largest cohorts (n >40) were selected, comprising 1198 individuals. The according frequencies for C→G mutations (C is replaced by G in Val26) at codon 26 are given in table 2.

## OTRAS PUBLICACIONES

**Oliver J**, Martin J, López-Nevot MA. HLA-A, -B, -Cw, -DQB1 and -DRB1 alleles in a population from Perú.

*Human Immunol* 2004; 65:1052.

**Oliver J**, Martin J, López-Nevot MA. HLA-DQB1 and -DRB1 alleles and cytokine polymorphisms frequencies in a population from Granada, Spain.

*Human Immunol* 2004; 65:1096-1097.

**Oliver J**, García-Agúndez JA, Fernández-Arquero M, Fernández B, G de la Concha E, Díaz-Rubio M, Martín J, Ladero JM. Polymorphisms in the transforming growth factor beta-1 gene (*TGF- $\beta$ 1*) and the risk of advanced alcoholic liver disease.

*Liver International* 2005 ;25:935-9

González-Gay MA, **Oliver J**, Orozco G, Garcia-Porrúa C, López-Nevot MA, Martin J. Lack of association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding protein phosphatase, with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis.

*J Rheumatol* 2005 32:1510-2

González-Gay MA, **Oliver J**, Sánchez E, García-Porrúa C, Paco L, López-Nevot MA, Ollier WR, Martín J. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis.

*J Rheumatol* 2005; 32:2178-82.

Callejas JL, **Oliver J**, Martin J, Ortego N. Anakinra in mutation-negative CINCA syndrome.

*Clin Rheumatol*. 2006. 27;1-2

Torres B, Orozco G, Garcia-Lozano JR, **Oliver J**, Fernandez O, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Garcia A, Pascual-Salcedo D, Lopez-Nevot MA, Nunez-Roldan A, Martin J, Gonzalez-Escribano MF. Asporin repeat polymorphism in rheumatoid arthritis.

*Ann Rheum Dis*.66:118-20. 2006

Gómez-García M, **Oliver J**, Márquez A, Mendoza JL, López-Nevot MA, Fernández-Arquero M, González-Escribano MF, Díaz-Rubio MF, de la Concha EG, Urcelay E, Martín J, Martínez A.

Strong protective effect of DR3 against ulcerative colitis in the Spanish population.

*American journal of Gastroenterology* 102:2762-6 2007

Rueda B, **Oliver J**, Robledo G, López-Nevot MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, González-Gay MA, González-Escribano MF, Martín J. HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum. 2007;56(12):3953-8

Nunez C, **Oliver J**, Mendoza JL, Gomez-Garcia M, Taxonera C, Gomez LM, Lopez-Nevot MA, G de la Concha E, Urcelay E, Martinez A, Martin J. CD209 in inflammatory bowel disease: a case-control study in the Spanish population. BMC Med Genet. 10;8:75. 2007

## **REFERENCIAS**



- [1] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521-33.
- [2] Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 2002 Aug 8;347(6):417-29.
- [3] Price AB. Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *Journal of clinical pathology*. 1978 Jun;31(6):567-77.
- [4] Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB, Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology*. 1975 Apr;68(4 Pt 1):627-35.
- [5] Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflammatory bowel diseases*. 2000 Feb;6(1):8-15.
- [6] Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2005 Sep;19 Suppl A:5-36.
- [7] Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996 Nov;39(5):690-7.
- [8] Loftus EV, Jr., Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology clinics of North America*. 2002 Mar;31(1):1-20.
- [9] Bernstein D, Rogers A. Malignancy in Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*. 1996 Mar;91(3):434-40.

- [10] Pajares JM, Gisbert JP. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Spain. A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig.* 2001 Jan;93(1):9-20.
- [11] Stowe SP, Redmond SR, Stormont JM, Shah AN, Chessin LN, Segal HL, et al. An epidemiologic study of inflammatory bowel disease in Rochester, New York. Hospital incidence. *Gastroenterology.* 1990 Jan;98(1):104-10.
- [12] Freeman HJ. Application of the Vienna Classification for Crohn's disease to a single clinician database of 877 patients. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie.* 2001 Feb;15(2):89-93.
- [13] Heresbach D, Gulwani-Akolkar B, Lesser M, Akolkar PN, Lin XY, Le Berre NH, et al. Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. *American Journal of Gastroenterology.* 1998;93(12):2368-72.
- [14] Hampe J, Heymann K, Kruis W, Raedler A, Fo?lsch UR, Schreiber S. Anticipation in inflammatory bowel disease: A phenomenon caused by an accumulation of confounders. *American Journal of Medical Genetics.* 2000;92(3):178-83.
- [15] Niv Y, Abuksis G, Fraser GM. Epidemiology of ulcerative colitis in Israel: A survey of Israeli kibbutz settlements. *American Journal of Gastroenterology.* 2000;95(3):693-8.
- [16] Grossman A, Fireman Z, Lilos P, Novis B, Rozen P, Gilat T. Epidemiology of ulcerative colitis in the Jewish population of central Israel 1970-1980. *Hepato-Gastroenterology.* 1989;36(4):193-7.
- [17] Nguyen GC, Torres EA, Regueiro M, Bromfield G, Bitton A, Stempak J, et al. Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic whites: Characterization of a large North American cohort. *American Journal of Gastroenterology.* 2006;101(5):1012-23.
- [18] Leong RWL, Lau JY, Sung JJY. The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflammatory bowel diseases.* 2004;10(5):646-51.

- [19] McKee RF, Keenan RA. Perianal Crohn's disease--is it all bad news? *Diseases of the colon and rectum*. 1996 Feb;39(2):136-42.
- [20] Chamberlin WM, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit*. 2006 Feb; 12(2):RA27-33.
- [21] Korzenik JR. Past and current theories of etiology of IBD: Toothpaste, worms, and refrigerators. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2005;39(4 SUPPL.):S59-S65.
- [22] Sechi LA, Gazouli M, Ikonomopoulos J, Lukas JC, Scanu AM, Ahmed N, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, genetic susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the way ahead. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Oct;43(10):5275-7.
- [23] Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2007 Sep;7(9):607-13.
- [24] Almy TP, Tulin M. Alterations in man under stress. Experimental production of changes simulating the irritable colon. *Gastroenterology*. 1947;8:616-26.
- [25] Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG. Breakfast and dietary aspects of Crohn's disease. *British Medical Journal*. 1978;2(6149):1401.
- [26] Dudek B, Spiro HM, Thayer Jr WR. A study of ulcerative colitis and circulating antibodies to milk proteins. *Gastroenterology*. 1965;49(5):544-7.
- [27] Glassman MS, Newman LJ, Berezin S, Gryboski JD. Cow's milk protein sensitivity during infancy in patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology*. 1990;85(7):838-40.
- [28] Rigas A, Rigas B, Glassman M, Yen YY, Shou Jen L, Petridou E, et al. Breast-feeding and maternal smoking in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in childhood. *Annals of Epidemiology*. 1993;3(4):387-92.

- [29] Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):182-205.
- [30] Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Mar;117(3):514-21.
- [31] Cobrin GM, Abreu MT. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunological reviews*. 2005 Aug;206:277-95.
- [32] Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut*. 2006 Mar;55(3):342-7.
- [33] Porras M, Martin MT, Yang PC, Jury J, Perdue MH, Vergara P. Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Sep;12(9):843-52.
- [34] Loftus EV, Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1504-17.
- [35] Riordan AM, Ruxton CHS, Hunter JO. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1998;52(4):229-38.
- [36] Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJM. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology*. 2000;95(4):1008-13.
- [37] Weylandt KH, Kang JX. Rethinking lipid mediators. *Lancet*. 2005;366(9486):618-20.
- [38] Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(5):1342-52.

- [39] Hampe J, Heymann K, Krawczak M, Schreiber S. Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *International Journal of Colorectal Disease*. 2003;18(5):413-7.
- [40] Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene and infancy. *Lancet*. 1994;343(8900):766-7.
- [41] McCormick PA, Manning D. Chronic inflammatory bowel disease and the 'over-clean' environment: Rarity in the Irish 'Traveller' community. *Irish Medical Journal*. 2001;94(7):203-4.
- [42] Mawdsley JE, Rampton DS. Psychological stress in IBD: New insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. 2005;54(10):1481-91.
- [43] Cosnes J. Tobacco and IBD: Relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*. 2004;18(3):481-96.
- [44] Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(1):44-54.
- [45] Davis RL, Kramarz P, Bohlke K, Benson P, Thompson RS, Mullooly J, et al. Measles-mumps-rubella and other measles-containing vaccines do not increase the risk for inflammatory bowel disease: A case-control study from the vaccine safety datalink project. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*. 2001;155(3):354-9.
- [46] Robertson DJ, Sandler RS. Measles virus and Crohn's disease: A critical appraisal of the current literature. *Inflammatory bowel diseases*. 2001;7(1):51-7.
- [47] Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: A critical review. *Inflammatory bowel diseases*. 2002;8(4):277-86.

- [48] Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, et al. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2002;51(6):808-13.
- [49] Cosnes J, Seksik P, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Gendre JP. Prior appendectomy and the phenotype and course of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(8):1235-42.
- [50] Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;124(1):40-6.
- [51] Melmed GY, Abreu MT. New insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Current gastroenterology reports*. 2004 Dec;6(6):474-81.
- [52] Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet*. 2002 Jan 5;359(9300):62-9.
- [53] Soederholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, et al. Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 2002;50(3):307-13.
- [54] Sun Y, Fihn BM, Sjoqvall H, Jodal M. Enteric neurones modulate the colonic permeability response to luminal bile acids in rat colon in vivo. *Gut*. 2004;53(3):362-7.
- [55] Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, et al. TNF- $\alpha$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- $\kappa$ B activation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004;286(3):49-53.
- [56] Musch MW, Clarke LL, Mamah D, Gawenis LR, Zhang Z, Ellsworth W, et al. T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(11):1739-47.
- [57] Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129(2):550-64.

- [58] Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*. 2000;68(12):7010-7.
- [59] Rosenstiel P, Fantini M, Bra?utigam K, Ku?hbacher T, Waetzig GH, Seegert D, et al. TNF-? and IFN-? regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(4):1001-9.
- [60] Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut*. 2003;52(6):840-6.
- [61] Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? the toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*. 2004;53(7):987-92.
- [62] Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005;129(1):50-65.
- [63] Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut*. 2004;53(5):678-84.
- [64] Nakazawa A, Dotan I, Brimnes J, Allez M, Shao L, Tsushima F, et al. The Expression and Function of Costimulatory Molecules B7h and B7-H1 on Colonic Epithelial Cells. *Gastroenterology*. 2004;126(5):1347-57.
- [65] Srikrishna G, Turovskaya O, Shaikh R, Newlin R, Foell D, Murch S, et al. Carboxylated glycans mediate colitis through activation of NF-?B. *Journal of Immunology*. 2005;175(8):5412-22.

- [66] Hokama A, Mizoguchi E, Sugimoto K, Shimomura Y, Tanaka Y, Yoshida M, et al. Induced reactivity of intestinal CD4<sup>+</sup> T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation. *Immunity*. 2004;20(6):681-93.
- [67] Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *Journal of Immunology*. 1999;163(2):1081-90.
- [68] Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Be?conrt C, et al. Suppression of CD4<sup>+</sup> T Lymphocyte Effector Functions by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Cells in Vivo. *Journal of Immunology*. 2004;172(6):3391-8.
- [69] Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, et al. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(9):1129-43.
- [70] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(2):233-40.
- [71] Baumgart D, Metzke D, Wiedenmann B, Dignass A. Activated dendritic cells are significantly increased in inflamed intestinal mucosa of inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology*. 2004;126.
- [72] Fuss IJ, Becker C, Yang Z, Groden C, Hornung RL, Heller F, et al. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(1):9-15.
- [73] Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(10):1490-7.



- [74] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.
- [75] Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):207-11.
- [76] Wang H, Yu M, Ochani M, Amelia CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384-8.
- [77] Furlan R, Ardizzone S, Palazzolo L, Rimoldi A, Perego F, Barbic F, et al. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: Effects of clonidine. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2006;290(1).
- [78] Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: Implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut*. 2006;55(5):655-61.
- [79] Charo IF, Ransohoff RM. Mechanisms of disease: The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(6):610-21.
- [80] Goebel S, Huang M, Davis WC, Jennings M, Siahaan TJ, Steven Alexander J, et al. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: Implications for inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006;290(4).
- [81] Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, et al. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(5):720-8.

- [82] Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Go?ke M, et al. Reduced Migration of Fibroblasts in Inflammatory Bowel Disease: Role of Inflammatory Mediators and Focal Adhesion Kinase. *Gastroenterology*. 2003;125(5):1341-54.
- [83] Theiss AL, Simmons JG, Jobin C, Lund PK. Tumor necrosis factor (TNF) ? increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(43):36099-109.
- [84] Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut*. 2004;53(5):701-9.
- [85] Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet*. 2006 Apr 15;367(9518):1271-84.
- [86] Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124(2):521-36.
- [87] Hugot JP. Genetic origin of IBD. *Inflammatory bowel diseases*. 2004 Feb;10 Suppl 1:S11-5.
- [88] Hayward AR. Lymphoid cell development. *Immunology series*. 1989;43:145-62.
- [89] Price WH. A high incidence of chronic inflammatory bowel disease in patients with Turner's syndrome. *Journal of medical genetics*. 1979 Aug;16(4):263-6.
- [90] Hayward PA, Satsangi J, Jewell DP. Inflammatory bowel disease and the X chromosome. *Qjm*. 1996 Sep;89(9):713-8.
- [91] Schinella RA, Greco MA, Cobert BL, Denmark LW, Cox RP. Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis. *Annals of internal medicine*. 1980 Jan;92(1):20-3.
- [92] Couper R, Kapelushnik J, Griffiths AM. Neutrophil dysfunction in glycogen storage disease Ib: association with Crohn's-like colitis. *Gastroenterology*. 1991 Feb;100(2):549-54.

- [93] Moll JM. Inflammatory bowel disease. Clinics in rheumatic diseases. 1985 Apr; 11(1):87-111.
- [94] Yang H, Taylor KD, Rotter JI. Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. Molecular genetics and metabolism. 2001 Sep-Oct;74(1-2):1-21.
- [95] Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. Nature immunology. 2001 Sep;2(9):802-9.
- [96] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411(6837):599-603.
- [97] Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, Wilson DC, et al. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel diseases. 2007 Mar;13(3):338-55.
- [98] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2007 Jul 26;448(7152):427-34.
- [99] Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. The Journal of clinical investigation. 2005 Jun;115(6):1404-7.
- [100] Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. Lancet. 2005 Sep 17-23;366(9490):1036-44.
- [101] Mathew CG. New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans. Nature reviews. 2008 Jan;9(1):9-14.
- [102] Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature. 1996;379(6568):821-3.
- [103] Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. Nature Genetics. 1996;14(2):199-202.

- [104] Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, Labuda MC, Rohal PM, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: Evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(13):7502-7.
- [105] Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, et al. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *American Journal of Human Genetics*. 1999;65(6):1647-55.
- [106] Yang H. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 1999;5(4):271-8.
- [107] Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfu?tzer R, Weeks DE. High-density genome scan in crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *American Journal of Human Genetics*. 2000;66(6):1857-62.
- [108] Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, et al. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *American Journal of Human Genetics*. 2000;66(6):1863-70.
- [109] Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflammatory bowel diseases*. 2002;8(6):375-81.
- [110] Paavola-Sakki P, Ollikainen V, Helio T, Halme L, Turunen U, Lahermo P, et al. Genome-wide search in Finnish families with inflammatory bowel disease provides evidence for novel susceptibility loci. *European Journal of Human Genetics*. 2003;11(2):112-20.
- [111] Vermeire S. DLG5 and OCTN. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(6):888-90.
- [112] Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, Achkar JP, Panhuysen CI, Bayless TM, et al. A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflammatory bowel diseases*. 2004;10(1):15-22.

- [113] Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006 Dec 1;314(5804):1461-3.
- [114] van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Human molecular genetics*. 2004 Apr 1;13(7):763-70.
- [115] Barton A, Ollier W. Genetic approaches to the investigation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 May;14(3):260-9.
- [116] Maier LM, Wicker LS. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol*. 2005 Dec;17(6):601-8.
- [117] Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1315-23.
- [118] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*. 1998;16:225-60.
- [119] Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):725-34.
- [120] Schottelius AJ, Baldwin AS, Jr. A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal inflammation. *Int J Colorectal Dis*. 1999 Feb;14(1):18-28.
- [121] Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Human molecular genetics*. 2004 Jan 1;13(1):35-45.
- [122] De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, Bitton A, Cohen A, Langelier D, et al. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes and immunity*. 2007 Jul;8(5):387-97.

- [123] Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G. A NFkB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *Int J Immunogenet.* 2005 Dec;32(6):401-5.
- [124] Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Staiano AM, D'Inca R, Guariso G, et al. Role of CARD15, DLG5 and OCTN genes polymorphisms in children with inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2007 Feb 28;13(8):1221-9.
- [125] Mustelin T, Vang T, Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jan;5(1):43-57.
- [126] Mustelin T, Alonso A, Bottini N, Huynh H, Rahmouni S, Nika K, et al. Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Molecular immunology.* 2004 Jul;41(6-7):687-700.
- [127] Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood.* 1999 Mar 15;93(6):2013-24.
- [128] Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet.* 2004 Apr;36(4):337-8.
- [129] Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes.* 2004 Nov;53(11):3020-3.
- [130] Ladner MB, Bottini N, Valdes AM, Noble JA. Association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene with type 1 diabetes. *Human immunology.* 2005 Jan;66(1):60-4.

- [131] Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet.* 2004 Sep;75(3):504-7.
- [132] Matesanz F, Rueda B, Orozco G, Fernandez O, Leyva L, Alcina A, et al. Protein tyrosine phosphatase gene (PTPN22) polymorphism in multiple sclerosis. *Journal of neurology.* 2005 Aug;252(8):994-5.
- [133] Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Caliz R, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism.* 2005 Jan;52(1):219-24.
- [134] Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):330-7.
- [135] Siminovitch KA. PTPN22 and autoimmune disease. *Nat Genet.* 2004 Dec;36(12):1248-9.
- [136] Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* 2005 Dec;37(12):1317-9.
- [137] Gregersen PK. Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nat Genet.* 2005 Dec;37(12):1300-2.
- [138] Martin MC, Oliver J, Urcelay E, Orozco G, Gomez-Garcia M, Lopez-Nevot MA, et al. The functional genetic variation in the PTPN22 gene has a negligible effect on the susceptibility to develop inflammatory bowel disease. *Tissue antigens.* 2005 Oct;66(4):314-7.

- [139] Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, Bossa F, Latiano T, Corritore G, et al. Evaluating the role of the genetic variations of PTPN22, NFKB1, and FcGR3A genes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Oct; 13(10):1212-9.
- [140] Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG, Nath SK, et al. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2007 Jan;46(1):49-56.
- [141] Prescott NJ, Fisher SA, Onnie C, Pattni R, Steer S, Sanderson J, et al. A general autoimmunity gene (PTPN22) is not associated with inflammatory bowel disease in a British population. *Tissue antigens*. 2005 Oct;66(4):318-20.
- [142] Orozco G, Garcia-Porrúa C, Lopez-Nevot MA, Raya E, Gonzalez-Gay MA, Martin J. Lack of association between ankylosing spondylitis and a functional polymorphism of PTPN22 proposed as a general susceptibility marker for autoimmunity. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006 May;65(5):687-8.
- [143] Rueda B, Nunez C, Orozco G, Lopez-Nevot MA, de la Concha EG, Martin J, et al. C1858T functional variant of PTPN22 gene is not associated with celiac disease genetic predisposition. *Human immunology*. 2005 Jul;66(7):848-52.
- [144] Pearce SH, Merriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *Trends in molecular medicine*. 2006 Feb;12(2):90-8.
- [145] Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):661-78.
- [146] Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2007 Jul;39(7):830-2.
- [147] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*. 2005 Apr;6(4):345-52.



- [148] Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity\*. Annual review of immunology. 2000;18:423-49.
- [149] von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2003 Mar;3(3):223-32.
- [150] Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004 Dec; 1029:132-41.
- [151] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
- [152] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet. 2001 Jan;27(1):20-1.
- [153] Bassuny WM, Ihara K, Sasaki Y, Kuromaru R, Kohno H, Matsuura N, et al. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. Immunogenetics. 2003 Jun;55(3):149-56.
- [154] Sanchez E, Rueda B, Orozco G, Oliver J, Vilchez JR, Paco L, et al. Analysis of a GT microsatellite in the promoter of the foxp3/scurfin gene in autoimmune diseases. Human immunology. 2005 Aug;66(8):869-73.
- [155] Zavattari P, Deidda E, Pitzalis M, Zoa B, Moi L, Lampis R, et al. No association between variation of the FOXP3 gene and common type 1 diabetes in the Sardinian population. Diabetes. 2004 Jul;53(7):1911-4.
- [156] Park Y. Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. Diabetes research and clinical practice. 2007 Sep;77 Suppl 1:S110-5.
- [157] Park O, Grishina I, Leung PS, Gershwin ME, Prindiville T. Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease. Annals of the New York Academy of Sciences. 2005 Jun; 1051:218-28.

- [158] Owen CJ, Eden JA, Jennings CE, Wilson V, Cheetham TD, Pearce SH. Genetic association studies of the FOXP3 gene in Graves' disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population. *Journal of molecular endocrinology*. 2006 Aug; 37(1):97-104.
- [159] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochemical Society transactions*. 1989 Aug;17(4):642-4.
- [160] Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *The American journal of medicine*. 2000 Aug 1;109(2):150-8.
- [161] Kolios G, Petoumenos C, Nakos A. Mediators of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology*. 1998 Sep-Oct;45(23): 1601-9.
- [162] Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, et al. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *The Journal of pathology*. 1998 Dec;186(4):416-21.
- [163] Cho WS, Chae C. Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary pathology*. 2004 Nov;41(6):666-72.
- [164] Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *The Journal of pathology*. 2003 Sep;201(1):28-36.
- [165] Rachmilewitz D, Eliakim R, Ackerman Z, Karmeli F. Direct determination of colonic nitric oxide level--a sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology*. 1998 Mar;93(3):409-12.
- [166] Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological chemistry*. 2003 Oct-Nov;384(10-11):1343-64.

- [167] Kolios G, Valatas V, Ward SG. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*. 2004 Dec;113(4):427-37.
- [168] Bellamy R, Hill AV. A bi-allelic tetranucleotide repeat in the promoter of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Clinical genetics*. 1997 Sep;52(3):192-3.
- [169] Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994 Apr 29;200(2):802-7.
- [170] Warpeha KM, Xu W, Liu L, Charles IG, Patterson CC, Ah-Fat F, et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *Faseb J*. 1999 Oct;13(13):1825-32.
- [171] Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, et al. The T-786-->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*. 2002 Apr;39(4):919-22.
- [172] Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Antoniadou C, Skoumas J, Brown M, et al. Evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (G894T) and inflammatory markers: the ATTICA study. *American heart journal*. 2004 Oct;148(4):733-8.
- [173] Burgner D, Usen S, Rockett K, Jallow M, Ackerman H, Cervino A, et al. Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Human genetics*. 2003 Apr;112(4):379-86.
- [174] Martin MC, Martinez A, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, Fernandez-Arquero M, et al. Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility. *Immunogenetics*. 2007 Nov;59(11):833-7.
- [175] Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*. 2004 May;36(5):471-5.

- [176] Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Jan;12 Suppl 1:S3-9.
- [177] Vermeire S, Rutgeerts P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes and immunity*. 2005 Dec;6(8):637-45.
- [178] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):791-800.
- [179] Donn RP, Plant D, Jury F, Richards HL, Worthington J, Ray DW, et al. Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2004 Sep;123(3):484-7.
- [180] Maaser C, Eckmann L, Paesold G, Kim HS, Kagnoff MF. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology*. 2002 Mar;122(3):667-80.
- [181] de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, et al. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nature immunology*. 2001 Nov;2(11):1061-6.
- [182] Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology*. 2002 Jul;123(1):256-70.
- [183] Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest*. 2001 Apr;31(4):337-43.
- [184] Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clinical and experimental immunology*. 2002 Jun;128(3):504-10.

- [185] Oliver J, Marquez A, Gomez-Garcia M, Martinez A, Mendoza JL, Vilchez JR, et al. Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007 Jan;56(1):150-1.
- [186] Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F, Meazza C, Zeggini E, Lunt M, et al. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2002 Sep;46(9):2402-9.
- [187] Tosa M, Negoro K, Kinouchi Y, Abe H, Nomura E, Takagi S, et al. Lack of association between IBD5 and Crohn's disease in Japanese patients demonstrates population-specific differences in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2006 Jan;41(1):48-53.
- [188] Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, et al. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet*. 2004;49(12):664-8.
- [189] Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet*. 2002;47(9):469-72.
- [190] Sanchez E, Gomez LM, Lopez-Nevot MA, Gonzalez-Gay MA, Sabio JM, Ortego-Centeno N, et al. Evidence of association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity*. 2006 May 18.
- [191] Cho JH, Weaver CT. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007 Oct;133(4):1327-39.
- [192] McGovern D, Powrie F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*. 2007 Oct;56(10):1333-6.
- [193] Sanchez E, Morales S, Paco L, Lopez-Nevot MA, Hidalgo C, Jimenez-Alonso J, et al. Interleukin 12 (IL12B), interleukin 12 receptor (IL12RB1) and interleukin 23 (IL23A)

- gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2005 Sep;44(9):1136-9.
- [194] Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
- [195] Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS, Kim CE, Glessner JT, Casalunovo T, et al. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Aug;5(8):972-6.
- [196] Borgiani P, Perricone C, Ciccacci C, Romano S, Novelli G, Biancone L, et al. Interleukin-23R Arg381Gln is associated with susceptibility to Crohn's disease but not with phenotype in an Italian population. *Gastroenterology*. 2007 Sep;133(3):1049-51; author reply 51-2.
- [197] Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. 2007 Nov;39(11):1329-37.
- [198] Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*. 2007 Feb;80(2):273-90.
- [199] Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, et al. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Sep;13(9):1063-8.
- [200] Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Torok HP, Schmechel S, et al. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS ONE*. 2007;2(9):e819.

- [201] Raelson JV, Little RD, Ruether A, Fournier H, Paquin B, Van Eerdewegh P, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 11;104(37):14747-52.
- [202] Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007 May;39(5):596-604.
- [203] Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, et al. ATG16L1 and IL23R Are Associated With Inflammatory Bowel Diseases but Not With Celiac Disease in The Netherlands. *The American journal of gastroenterology*. 2007 Nov 28.
- [204] Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet*. 2007;52(7):575-83.
- [205] Duerr RH. Genome-wide association studies herald a new era of rapid discoveries in inflammatory bowel disease research. *Gastroenterology*. 2007 May;132(5):2045-9.
- [206] Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Drummond HE, Smith L, Davies G, et al. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut*. 2007 Aug;56(8):1173-4.
- [207] Wolf N, Quaranta M, Prescott N, Allen M, Smith R, Burden AD, et al. Psoriasis is associated with pleiotropic susceptibility loci identified in Type II Diabetes and Crohn's disease. *Journal of medical genetics*. 2007 Nov 9.
- [208] Orozco G, Rueda B, Robledo G, Garcia A, Martin J. Investigation of the IL23R gene in a Spanish rheumatoid arthritis cohort. *Human immunology*. 2007 Aug;68(8):681-4.

- [209] Sanchez E, Rueda B, Callejas JL, Sabio JM, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, et al. Analysis of interleukin-23 receptor (IL23R) gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*. 2007 Sep;70(3):233-7.
- [210] Wirth JA, Jensen KA, Post PL, Bement WM, Mooseker MS. Human myosin-IXb, an unconventional myosin with a chimerin-like rho/rac GTPase-activating protein domain in its tail. *Journal of cell science*. 1996 Mar;109 ( Pt 3):653-61.
- [211] Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zhernakova A, Bevova MR, Strengman E, et al. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet*. 2005 Dec;37(12):1341-4.
- [212] Nunez C, Oliver J, Mendoza JL, Gomez-Garcia M, Pinero A, Taxonera C, et al. MYO9B polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2007 Sep;56(9):1321-2.
- [213] Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, D'Inca R, Caprilli R, Cucchiara S, et al. Association of myo9b gene in Italian patients with inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Oct 17.
- [214] Van Bodegraven AA, Curley CR, Hunt KA, Monsuur AJ, Linskens RK, Onnie CM, et al. Genetic Variation in Myosin IXB Is Associated With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2006 Sep 8.
- [215] Amundsen SS, Vatn M, Wijmenga C, Sollid LM, Lie BA. Association analysis of MYO9B gene polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Norwegian cohort. *Tissue antigens*. 2006 Sep;68(3):249-52.
- [216] Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nature reviews*. 2005 May;6(5):376-88.
- [217] Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Human molecular genetics*. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R161-8.



[218] McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Human molecular genetics*. 2005 May 15;14(10):1245-50.