

- 33 Grohmann U, Bianchi R, Ayroldi E, Belladonna ML, Surace D, Fioretti MC, et al. A tumor-associated and self antigen peptide presented by dendritic cells may induce T cell anergy in vivo, but IL-12 can prevent or revert the anergic state. *J Immunol* 1997;158:3593-602.
- 34 Buelens C, Willems F, Delvaux A, Pierard G, Delville JP, Velu T, et al. Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 1995;25:2668-72.
- 35 Savary CA, Graziutti ML, Melichar B, Przepiorka D, Freedman RS, Corvart RE, et al. Multidimensional flow-cytometric analysis of dendritic cells in peripheral blood of normal donors and cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 1998;45:234-40.
- 36 Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:483-90.
- 37 Gilboa E, Nair SK, Lysterly HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46:82-7.
- 38 Mulders P, Tso CL, Gitlitz B, Kaboo R, Hinkel A, Frand S, et al. Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines. *Clin Cancer Res* 1999;5:445-54.
- 39 Boon T, Bruggen P van der. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183:725-9.
- 40 Bakker ABH, Schreurs MWJ, Boer AJ de, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ, et al. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1994;179:1005-9.
- 41 Brichard V, Pel A van, Wölfel T, Wölfel C, Plaen E de, Lehte B, et al. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993;178:489-95.
- 42 Bakker ABH, Burg SH van der, Huijbens RJF, Drijfhout JW, Melief CJ, Adema GJ, et al. Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild-type epitope. *Int J Cancer* 1997;70:302-9.
- 43 Ludewig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med* 1998;188:1493-501.
- 44 Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 1999;59:56-8.
- 45 Eggert AAO, Schreurs MWJ, Boerman PC, Oyen WJC, Boer AJ de, Punt CJA, et al. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res* 1999;59:3340-5.
- 46 Mukherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, Okino T, Yamase H, Sporn JR, et al. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8078-82.
- 47 Chakraborty NG, Sporn JR, Tortora AF, Kurtzman SH, Yamase H, Ergin MT, et al. Immunization with a tumor-cell-lysate-loaded autologous-antigen-presenting-cell-based vaccine in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 1998;47:58-64.
- 48 Gjertsen MK, Bakka A, Breivik J, Saeterdal I, Gedde-Dahl 3rd T, Stokke KT, et al. Ex vivo ras peptide vaccination in patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase I/II study. *Int J Cancer* 1996;65:450-3.
- 49 Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996;29:371-80.
- 50 Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-8.
- 51 Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-32.
- 52 Holtl L, Rieser C, Papesch C, Ramoner R, Bartsch G, Thurnher M. CD83+ blood dendritic cells as a vaccine for immunotherapy of metastatic renal-cell cancer [letter]. *Lancet* 1998;352:1358.
- 53 Punt CJA, Vries IJM de, Eggert AAO, Schreurs MWJ, Scharenborg NH, Verstraten HGG, et al. Immunization with dendritic cells pulsed with synthetic peptides, murine and clinical studies [abstract]. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999;40:312.
- 54 Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;184:1953-62.
- 55 Toes REM, Voort EIH van der, Schoenberger SP, Drijfhout JW, Bloois L van, Storm G, et al. Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol* 1998;160:4449-56.
- 56 Marchand M, Baren N van, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80:219-30.
- 57 Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998;4:321-7.

Aanvaard op 6 augustus 1999

Immunologie in de medische praktijk. XXVI. Immunogenetica van chronische inflammatoire darmziekten

G. BOUMA EN A.S. PEÑA

De chronische inflammatoire darmziekten (CIDZ) zijn chronische ontstekingsziekten van de tractus digestivus en worden klinisch onderverdeeld in twee vormen: coli-

Samenvatting: zie volgende bladzijde.

Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, afd. Gastro-enterologie, Laboratorium voor Gastro-intestinale Immunogenetica, Van der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam.

Dr.G.Bouma, arts-medisch bioloog (thans: National Institutes of Health, Mucosal Immunity Section, Bethesda, MD, VS); prof.dr.A.S. Peña, gastro-enteroloog.

Correspondentieadres: dr.G.Bouma (e-mail gbouma@atlas.niaid.nih.gov).

tis ulcerosa en de ziekte van Crohn. De etiologie van deze darmziekten is nog altijd niet geheel opgehelderd. Men neemt thans aan dat, op basis van een erfelijke gevoeligheid, een ongecontroleerde immuunreactie ontstaat tegen een nog onbekende factor.

Epidemiologische onderzoeken en familieonderzoeken hebben aangetoond dat erfelijke factoren een sleu-

SAMENVATTING

- Epidemiologische onderzoeken en familieonderzoeken hebben aangetoond dat genetische factoren een belangrijke rol spelen in de pathogenese van de chronische inflammatoire darmziekten (CIDZ): colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn.
- De genetische gevoeligheid voor CIDZ is complex, en volgt niet de Mendeliaanse wetten. Het onderzoek naar de betrokken genen wordt verder bemoeilijkt door klinische en genetische heterogeniteit.
- Met moderne molecuair-biologische technieken is het mogelijk de chromosomale locaties en genen van complexe, immuungemedieerde ziekten, waaronder CIDZ, daadwerkelijk te identificeren.
- Door genetisch associatieonderzoek is een rol vastgesteld van de genen van het humaan leukocytenantigeen (HLA)-systeem en van polymorfismen in de cytokinegenen in de pathogenese van CIDZ.
- Een andere onderzoeksmethode betreft screening van het gehele genoom met gebruikmaking van microsatellietmarkers en zogenaamd 'affected sib-pair'-onderzoek. Hiermee zijn inmiddels 2 chromosomale locaties geïdentificeerd (*IBD1* op chromosoom 16 en *IBD2* op chromosoom 12) die met CIDZ samenhangen.
- De bevindingen voor CIDZ kunnen worden geëxtrapoleerd naar andere immuungemedieerde ziekten waaraan een genetische gevoeligheid ten grondslag ligt. Bepaalde chromosomale locaties blijken geassocieerd te zijn met meerdere auto-immuunziekten. Dit suggereert dat er twee soorten genen betrokken zijn bij deze ziekten: genen die coderen voor eiwitten die een sleutelrol spelen in de immuunrespons en predisponeren voor auto-immuunziekten in het algemeen, en ziektespecifieke genen die verantwoordelijk zijn voor het fenotype en de ernst van de ziekte.

telrol spelen in de gevoeligheid voor CIDZ. Met de recente ontwikkelingen in de moleculaire biologie is belangrijke vooruitgang geboekt in het daadwerkelijk identificeren van chromosomale locaties en genen die ten grondslag liggen aan CIDZ. Deze benaderingswijze is niet uniek voor CIDZ. De afgelopen jaren zijn vergelijkbare onderzoeken gedaan naar diabetes mellitus type 1, reumatoïde artritis, multiple sclerose en andere immuungemedieerde aandoeningen waaraan een genetische gevoeligheid ten grondslag ligt.

In dit artikel willen wij aan de hand van CIDZ inzicht geven in de manier waarop de genetische predispositie voor auto-immuunziekten momenteel onderzocht wordt.

EPIDEMIOLOGISCHE AANWIJZINGEN VOOR EEN GENETISCHE PREDISPOSITIE TOT CHRONISCHE INFLAMMATOIRE DARMZIEKTEN

Familieonderzoeken. Zowel colitis ulcerosa als de ziekte van Crohn komt frequent familiair voor. Het percentage patiënten met een positieve familieanamnese varieert in het algemeen tussen 10 en 20.¹ De percentages zijn meestal iets hoger voor patiënten met de ziekte van Crohn dan voor die met colitis ulcerosa. Het regelmatig voorkomen van zowel colitis ulcerosa als de ziekte van Crohn binnen families suggereert bovendien een etiologische relatie tussen beide aandoeningen. Met de zoge-

naamde λ_s -ratio kan men goed de mate van clustering van de ziekte binnen families bepalen. Deze ratio wordt verkregen door het risico voor broers en zussen ('siblings') van patiënten op het krijgen van de ziekte te delen door de prevalentie van de ziekte. Voor de ziekte van Crohn bedraagt λ_s 20 en voor colitis ulcerosa 12.² Deze waarden zijn vergelijkbaar met die voor diabetes mellitus type 1 ($\lambda_s = 15$), multiple sclerose ($\lambda_s = 20$), lupus erythematosus disseminatus (SLE; $\lambda_s = 20$), en zijn iets hoger dan die voor reumatoïde artritis ($\lambda_s = 8$).³

Tweelingonderzoeken. Een van de overtuigendste aanwijzingen voor een genetische predispositie tot CIDZ komt van onderzoek onder tweelingen. Monozygote tweelingen zijn genetisch identiek, terwijl dizygote tweelingen gemiddeld een 50% gelijke genetische achtergrond hebben. Wanneer genetische factoren een belangrijke rol spelen, zullen monozygote tweelingen vaker allebei de ziekte hebben dan dizygote tweelingen. In een Zweeds onderzoek onder tweelingen waarvan tenminste één lid CIDZ had, waren 8 van de 18 (44%) monozygote tweelingen concordant voor de ziekte van Crohn (dat wil zeggen dat beide leden de ziekte hadden), en daarentegen slechts 1 van de 26 (4%) dizygote tweelingen.⁴ Bij colitis ulcerosa was 1 van de 16 monozygote paren concordant voor de ziekte en geen van de 20 dizygote.⁴ Een Brits onderzoek bevestigde deze resultaten, maar vond geen verschil in concordantie tussen tweelingen met colitis ulcerosa en tweelingen met de ziekte van Crohn.⁵ Onlangs werd voor het eerst een monozygote tweeling beschreven waarvan het ene lid aan de ziekte van Crohn en de andere aan colitis ulcerosa leed.⁶

Deze bevindingen ondersteunen de hypothese dat erfelijke factoren van belang zijn voor CIDZ, in het bijzonder voor de ziekte van Crohn. De observatie dat niet alle monozygote tweelingen allebei de ziekte hadden, impliceert dat niet-genetische factoren eveneens een belangrijke rol spelen.

Onderzoek onder echtgenoten. Echtgenoten zijn in het algemeen genetisch niet verwant. Wanneer erfelijke factoren van belang zijn, zal het voorkomen van CIDZ onder partners van patiënten niet hoger zijn dan in de algemene populatie. Inderdaad bleek dat de frequentie van CIDZ onder echtgenoten niet verhoogd is ten opzichte van de gezonde bevolking, en veel lager is dan die onder genetisch verwante familieleden.⁷

Onderzoeken in verschillende etnische bevolkingsgroepen. De incidentie van CIDZ is het hoogst onder blanken, lager onder de negroïde bevolking, en het laagst onder Aziaten.⁸ Onder blanken komt de ziekte het frequentst voor bij joodse personen.⁹

IDENTIFICATIE VAN DE BETROKKEN GENEN

Hoewel de genoemde observaties sterk pleiten voor een genetische gevoeligheid voor CIDZ, is tevens duidelijk dat de CIDZ geen monogene ziekten met een mendeliaans overervingspatroon zijn. Waarschijnlijk spelen meerdere genen een rol, die ieder een gering effect hebben. De lokalisatie van genen die ten grondslag liggen aan monogene aandoeningen, zoals cystische fibrose en

de ziekte van Huntington, is tegenwoordig relatief eenvoudig. Veel moeilijker is het voor complexe ziekten die niet de klassieke Mendel-wetten volgen, zoals CIDZ en andere immuungemedieerde ziekten. Tegenwoordig zijn er verschillende benaderingswijzen om de genetische gevoeligheid voor deze ziekten te onderzoeken: associatieonderzoek, screening van het totale genoom en proefdieronderzoek.

Associatieonderzoek

In associatieonderzoeken worden die genen onderzocht waarvan a priori wordt verondersteld dat ze een rol spelen in het ontstaan van de ziekte. De frequenties van genetische varianten (allelen) van een te onderzoeken gen worden onderzocht in grote groepen van patiënten en van gezonde controlepersonen. Als een associatie wordt gevonden tussen de aandoening en een bepaald allel, kan dit betekenen dat er een causale relatie bestaat, of het allel kan in zogenaamde onevenwichtige koppeling ('linkage disequilibrium') zijn met een nabijgelegen gen. Linkage disequilibrium wil zeggen dat allelen van twee nabij gelegen genen op hetzelfde chromosoom vaker samen voorkomen dan op grond van hun individuele frequenties verwacht wordt. Bij een dergelijk disequilibrium kan een associatie worden gevonden tussen de ziekte en een allel van een gen (en kan dus gedacht worden aan een causaal verband), terwijl dit allel slechts een marker is voor een nabijgelegen gen dat wél verantwoordelijk is voor de ziekte. Het verschijnsel van onevenwichtige koppeling is vooral van belang in het onderzoek naar de genen van het humaan leukocytenantigeen (HLA)-systeem. Een associatieonderzoek kan verder worden verfijnd door het uit te voeren binnen families met behulp van de transmissiedisequilibriumtest. Hierbij wordt niet alleen het aangedane individu voor het allel getypeerd, maar tevens diens ouders.¹⁰

Resultaten van associatieonderzoek. Gezien de centrale rol van het immuunsysteem in de pathogenese van CIDZ heeft men de meeste associatieonderzoeken gericht op genen die een rol spelen in de initiatie en de regulatie van de immuunrespons. Vooral de genen die coderen voor HLA-eiwitten en voor cytokinen zijn de laatste jaren intensief onderzocht. Er zijn talloze aandoeningen beschreven die geassocieerd zijn met één of meer allelen in het HLA-complex. De bekendste zijn de associatie tussen HLA-B27 en de ziekte van Bechterew en die tussen HLA-DQ2 en coeliakie.

De resultaten van onderzoek naar de rol van HLA in CIDZ zijn niet eensluidend. De meest gereproduceerde bevinding is de associatie tussen colitis ulcerosa en HLA-DR2 (ook wel weergegeven als HLA-DRB1*15). Deze associatie werd aanvankelijk beschreven in een onderzoek uit Japan,¹¹ en is later in diverse andere onderzoeken uit Japan alsmede de VS,¹² bevestigd. Resultaten van onderzoeken in andere populaties zijn echter wisselend. Het is vooralsnog niet duidelijk of HLA-DR2 zelf het gen is dat verantwoordelijk is voor de gevonden associatie met colitis ulcerosa of dat het in linkage disequilibrium is met een ander gen. Wij vonden bij een grote groep Nederlandse patiënten eveneens dat

HLA-DRB1*15 significant vaker voorkomt bij patiënten met colitis ulcerosa dan bij controlepersonen (42 versus 26%).¹³

Er is ook een sterke associatie beschreven tussen colitis ulcerosa en HLA-DRB1*0103.² Dit allel komt zeer zelden voor in de algemene bevolking, maar kwam significant vaker voor in onze populatie patiënten met colitis ulcerosa: 6% versus 0,2%.¹³

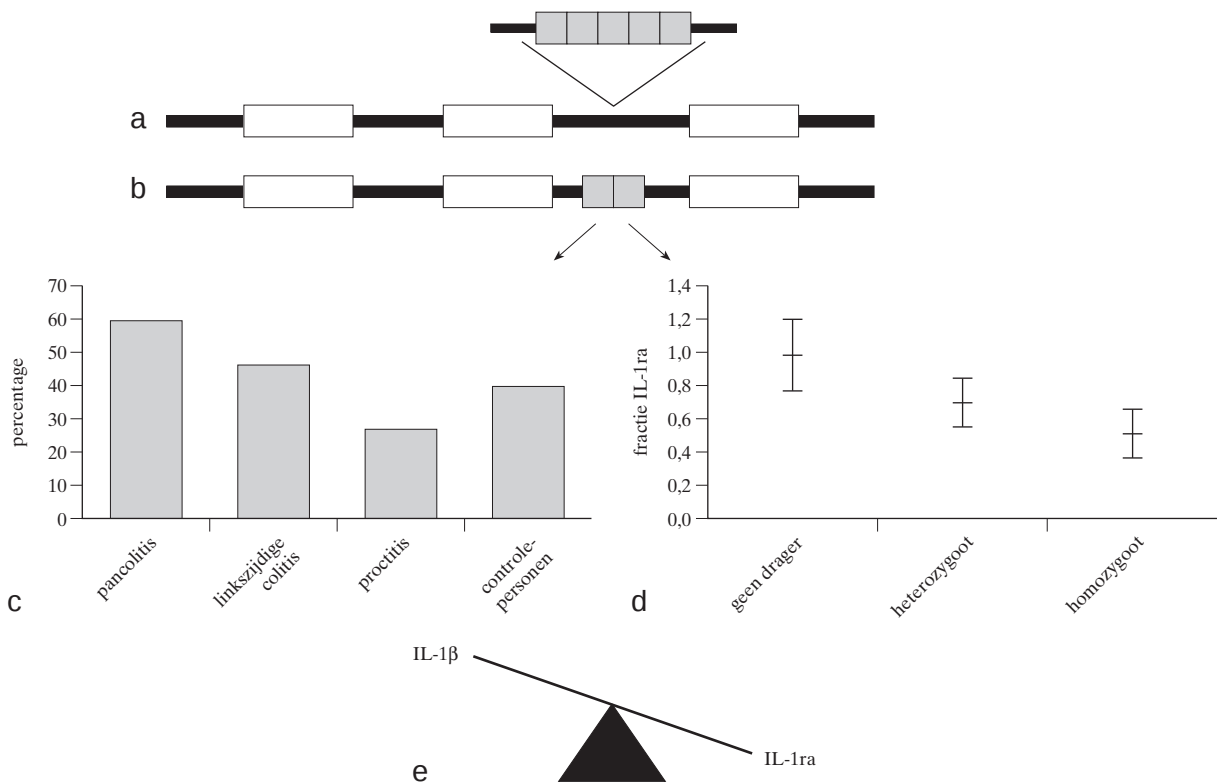
Voor de ziekte van Crohn zijn de resultaten veel minder duidelijk. Positieve associaties zijn gevonden met zowel HLA-DR1,^{12, 14} HLA-DR4,¹⁵ en HLA-DR7.^{14, 16} Daarnaast lijkt HLA-DR3 minder vaak voor te komen bij Crohn-patiënten.^{14, 16} In een ongeselecteerde Nederlandse populatie patiënten vonden wij geen associatie met de HLA-DR-allelen.¹⁷

Een andere categorie genen die de laatste jaren intensief is onderzocht, bestaat uit de cytokinegenen. Cytokinen zijn kleine polypeptiden die een essentiële rol spelen in de communicatie tussen de cellen van het immuunsysteem en daarmee van groot belang voor de regulatie van de immuunrespons. Enkele tientallen cytokinen zijn inmiddels geïdentificeerd. In een aantal van de voor cytokinen coderende genen zijn polymorfismen gevonden. Sommige van deze polymorfe varianten zijn geassocieerd met een veranderde secretie van het eiwit in vitro. De hypothese is dat op basis van deze genetische predispositie de regulatie van de immuunrespons verstoord zal verlopen wanneer het immuunsysteem wordt geactiveerd, wat kan bijdragen aan het ontstaan of de ernst van de ziekte.

De meeste onderzoeken waarin de frequentie van polymorfe varianten in cytokinegenen bij CIDZ-patiënten werd onderzocht, lieten echter geen verschillen zien tussen patiënten en controlepersonen. Een uitzondering is de interleukine-1-receptorantagonist (IL-1ra). Dit eiwit antagoniseert de werking van het pro-inflammatoire IL-1 door binding en blokkade van de IL-1-receptor. Allel 2 van een polymorfisme in het gen van IL-1ra bleek significant vaker voor te komen bij patiënten met colitis ulcerosa dan bij gezonde controlepersonen, in het bijzonder bij patiënten bij wie het hele colon was aangedaan.¹⁸ Deze en andere onderzoeken suggereren dat patiënten met colitis ulcerosa een genetisch bepaalde stoornis hebben in de secretie van IL-1ra, waardoor de balans tussen het pro-inflammatoire IL-1β en anti-inflammatoire IL-1ra in de darm verstoord is (figuur 1). In andere onderzoeken heeft men echter geen aanwijzingen gevonden voor een rol van dit polymorfisme in CIDZ. Hoewel in de Nederlandse populatie allel 2 van dit polymorfisme niet significant vaker voorkwam bij patiënten met colitis ulcerosa dan bij controlepersonen, bleek dit allel wel vaker voor te komen bij patiënten met pancolitis, conform de Britse onderzoeksresultaten (zie figuur 1).^{19, 22} Dit suggereert dat dit allel niet zozeer de gevoeligheid bepaalt voor colitis ulcerosa, als wel een rol speelt in de ernst van de ontsteking.

Screening van het totale genoom

In een onderzoek waarbij het totale genoom wordt gescreend wordt niet een specifiek gen onderzocht, maar



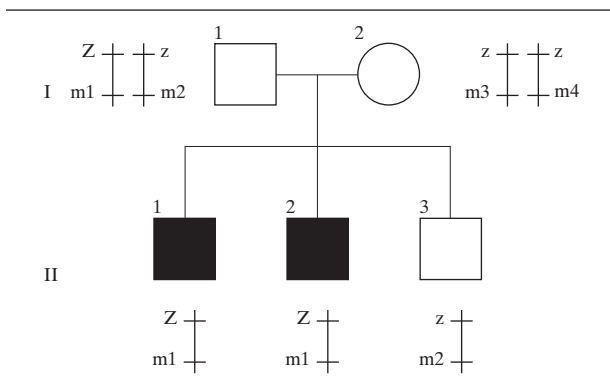
FIGUUR 1. Genetisch bepaalde stoornis bij patiënten met colitis ulcerosa. Een sequentie van 86 basenparen in het gen voor de interleukine-1-receptorantagonist (IL-1ra) komt voor in 1, 2, 3, 4, of 5 kopieën (a). Allel 2 (met 2 kopieën) wordt vaker gevonden bij patiënten met colitis ulcerosa (b) dan bij gezonde controlepersonen, bij wie allel 1 (met 1 kopie) het frequentst is. Allel 2 wordt vooral gevonden bij patiënten bij wie het hele colon is aangedaan (c).¹⁹ Tevens is gebleken dat personen die homozygoot zijn voor allel 2 minder IL-1ra produceren dan degenen die heterozygoot zijn, en veel minder dan personen die geen drager zijn van allel 2 (d) (tekening gebaseerd op een eerdere publicatie).²⁰ De hypothese is dat deze genetische predispositie verantwoordelijk is voor de gevonden verstoorde IL-1 β /IL-1ra-ratio in het colon van patiënten met chronische inflammatoire darmziekte,²¹ die kan bijdragen aan het ontstaan of de ernst van de ziekte (e).

worden alle chromosomen onderzocht zonder a-priori-hypothese. Hierbij wordt gebruikgemaakt van microsatellieten. Dit zijn kleine nucleotidesequenties, veelal dinucleotiden, die verspreid over het genoom voorkomen en variëren van persoon tot persoon in het aantal kopieën waarin ze voorkomen. Door families te onderzoeken waarin meerdere personen aan CIDZ lijden, kan met behulp van de polymerasekettingreactie (PCR) en gelelektroforese onderzocht worden welke microsatellieten met de ziekte co-segregeren (dat is: mee worden overgeërfd). Voor complexe ziekten als CIDZ, waarvan het overervingspatroon onbekend is, wordt gebruikgemaakt van de zogenaamde 'affected sib-pair'-methode die wordt uitgelegd in figuur 2. Teneinde het hele genoom te onderzoeken worden microsatellieten op regelmatige afstand van elkaar bepaald, zodat tientallen tot honderden microsatellieten per persoon worden onderzocht. Om een statistisch significante associatie te kunnen vinden, dient een groot aantal families onderzocht te worden, waardoor deze benaderingswijze zowel logistieke als financiële beperkingen kent. Bij deze onderzoeken wordt uitgegaan van het principe van koppeling ('linkage'). Wanneer koppeling tussen een bepaald

de microsatellietmarker en de ziekte gevonden wordt, wil dit slechts zeggen dat ergens in het gebied van de marker een gen ligt dat betrokken is bij de ziekte. Het gebied tussen twee microsatellieten omvat veelal vele honderden genen; door vervolgens extra markers in dit gebied te onderzoeken, kan het gebied verkleind worden.

Het is van belang op te merken dat bij deze genomische screening tot nu toe uitsluitend families worden onderzocht waarin meerdere personen de ziekte hebben. Daar de etiologie van de familiale vorm van CIDZ mogelijk verschilt van die van de niet-familiaire vorm, is dit een belangrijke potentiële vorm van bias.

Resultaten van screening van het gehele genoom. Screening van het hele genoom heeft tot nu toe twee chromosomale locaties geïdentificeerd die bevestigd zijn in onafhankelijke onderzoeken. Bij patiënten met de ziekte van Crohn werd koppeling vastgesteld met de regio rond de centromeer op chromosoom 16. Dit locus werd *IBD1* genoemd.²³ De koppeling met *IBD1* is inmiddels bevestigd in meer dan 5 onderzoeken, hoewel in 2 andere geen aanwijzing voor koppeling werd gevonden. Het is vooralsnog niet duidelijk of *IBD1* uniek is



FIGUUR 2. Het principe van genetisch koppelingsonderzoek met de zogenaamde 'affected sib-pair'-methode. De verticale lijnstukken geven een stukje DNA weer waarop een locus ligt dat kan worden ingenomen door een allel voor ziekte (Z) of voor gezondheid (z), en een microsatellietmarker (m). Als een microsatellietmarker (m1) zeer dicht bij een gen ligt dat een rol speelt bij de gevoeligheid voor de ziekte (Z; in dit geval bij de vader I1), zullen de zieke kinderen (hier II1 en II2) altijd deze marker samen met het predisponerende gen hebben geërfd; dit betekent dat de kinderen altijd tenminste 1 marker gemeen hebben (m1). Bij 50% van de nakomelingen zal ook de maternale marker (m3 of m4) hetzelfde zijn (beide kinderen hebben dan m1-m3 of beide m1-m4), en bij 50% zal de maternale marker verschillen. Wanneer de microsatellietmarker ver weg ligt van het gen (geen koppeling vertoont), erven m1 en Z onafhankelijk van elkaar over en kunnen aangedane individuen ook marker m2 van de vader erven. In dat geval zullen zij in 25% van de gevallen geen enkele marker gemeen hebben (het ene individu heeft dan m1-m3, het andere m2-m4). Met de onderzoeksmethode test men nu of de aangedane kinderen meer allelen gemeen hebben van een bepaalde marker dan bij randomsegregatie van marker en ziektegen wordt verwacht. Met behulp van statistische software wordt berekend of dit verschil statistisch significant is. Wanneer de marker en het ziektegen zo ver uit elkaar liggen dat er recombinatie optreedt tijdens de meiose, is de kans dat de twee kinderen 0 allelen gemeen hebben 0-25%.

voor de ziekte van Crohn, of dat het tevens betrokken is bij de gevoeligheid voor colitis ulcerosa.^{24, 25} *IBD1* bevat waarschijnlijk vele honderden genen, waarvan een aantal inmiddels bekend is. Welk gen echter verantwoordelijk is voor de koppeling met de ziekte van Crohn, is nog onbekend.

In een tweede onderzoek beschreef men koppeling tussen CIDZ (in dit onderzoek werd geen onderscheid gemaakt tussen colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn) en een locus op chromosoom 12 (*IBD2*).²⁶ Ook de koppeling met chromosoom 12 is inmiddels in onafhankelijke onderzoeken bevestigd, maar ook voor dit locus geldt dat sommige onderzoekers de koppeling niet konden bevestigen. Onlangs zijn tevens aanwijzingen gevonden voor locaties op de chromosomen 1, 3, 4, 6, 10, 22 en het X-chromosoom.^{27, 28}

Proefdieronderzoek

Tenslotte kunnen genen geïdentificeerd worden in proefdiermodellen. Muizen- of rattenstammen die gevoelig zijn voor de te onderzoeken ziekte worden ge-

kruist met stammen die resistent ervoor zijn. De aldus verkregen F1-generatie wordt onderling gekruist, zodat er een F2-generatie ontstaat die genetisch een mengsel is van de gevoelige en de resistente stam. Vervolgens wordt door screening van het gehele genoom onderzocht welke microsatellietmarker met de ziekte co-segregeert.

BESCHOUWING

Hoe kunnen de wisselende resultaten van de diverse onderzoeken verklaard worden? De mogelijkheid dat de gevonden resultaten berusten op toeval (de zogenaamde type-I-fout in de statistiek) is onwaarschijnlijk, daar de resultaten voor alle genoemde genetische markers in onafhankelijke datasets zijn bevestigd. Het effect van een bepaald locus kan verschillen tussen etnische bevolkingsgroepen. Zo werd onder patiënten uit de VS gevonden dat de koppeling met *IBD1* alleen werd gevonden bij niet-joodse blanken.²⁵ Omdat omgevingsfactoren mogelijk een rol spelen in de pathogenese van CIDZ, is het tevens niet uitgesloten dat het belang van loci wisselt per geografisch gebied. Tenslotte kunnen de resultaten beïnvloed zijn door klinische en genetische heterogeniteit.

Heterogeniteit. Genetische heterogeniteit wil zeggen dat verschillende genen, of meer waarschijnlijk, verschillende combinaties van genen, alle kunnen leiden tot min of meer dezelfde verschijnselen van intestinale ontsteking. Deze hypothese wordt ondersteund door dierexperimentele onderzoeken. Bij genetisch gemanipuleerde muizen waarin een bepaald gen is uitgeschakeld of juist extra tot expressie wordt gebracht (zogenaamde 'knock-out'-muizen en transgene muizen) ontwikkelt zich een ziektebeeld dat gelijkenis vertoont met CIDZ. Gebleken is dat manipulatie van totaal verschillende immuunogenen kan leiden tot een min of meer identiek beeld van intestinale ontsteking. Dit demonstreert dat een verschillende genetische achtergrond kan leiden tot eenzelfde fenotype.²⁹ Wanneer dit ook voor CIDZ geldt, is het niet verwonderlijk dat de resultaten van genetische onderzoeken niet sterk zijn, omdat in dit geval een bepaald gen slechts een rol speelt bij een deel van de patiënten. Het effect van een bepaald gen kan sterker zijn in een bepaalde bevolkingsgroep; dit kan de gevonden verschillen tussen verschillende bevolkingsgroepen helpen verklaren.

Klinische heterogeniteit is de observatie dat de klinische verschijningsvormen van colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn zeer divers zijn in ernst, uitgebreidheid en type ontsteking, respons op medicatie, extra-intestinale verschijnselen en complicaties. Mogelijk liggen aan deze klinische subgroepen verschillende pathogenetische mechanismen ten grondslag. Om deze hypothese te toetsen is getracht de genetische markers te onderzoeken in klinisch homogene subgroepen van patiënten. In de afwezigheid van een rationele classificatie van subgroepen is dit echter uiterst moeilijk. Voor zowel de HLA-genen als de cytokinegenen geldt dat veelal sterkere associaties werden gevonden wanneer patiënten met een ernstiger vorm van de ziekte werden onderzocht. Zo werd allel 2

van het al eerder genoemde IL-1ra-genpolymorfisme voornamelijk gevonden bij patiënten met pancolitis (zie figuur 1).^{18,19} Hetzelfde werd gevonden voor de HLA-genen.³⁰ Wij onderzochten onlangs een groep Crohn-patiënten met perianale fistels.³¹ In deze subgroep van patiënten was het percentage patiënten dat HLA-DR3-positief was zeer sterk verlaagd, terwijl in een eerder onderzoek onder een groep ongeselecteerde patiënten met de ziekte van Crohn DR3 niet verlaagd was.¹⁷ Dit onderzoek toonde daarmee de noodzaak van patiënten-classificatie aan in genetisch onderzoeken naar complexe ziekten.

Deze bevindingen ondersteunen (a) de hypothese dat deze genen niet zozeer de gevoeligheid voor de ziekte bepalen, maar veel meer fungeren als modulatoren van de ernst en het klinisch fenotype van de ziekte, en (b) dat de samenstelling van de patiëntenpopulatie de resultaten van dergelijke onderzoeken sterk kan beïnvloeden. Bij screening van het hele genoom heeft men de patiënten tot op heden niet gestratificeerd naar klinische subgroepen. Opgemerkt dient te worden dat voor zowel de HLA-associaties als de polymorfismen in de cytokinegenen geldt dat de sensitiviteit en de specificiteit van deze markers te laag is om behulpzaam te zijn in de diagnostiek van CIDZ. Mogelijkerwijs kunnen deze markers in de toekomst wel behulpzaam zijn in het identificeren van patiënten die risico lopen op een ernstiger ziektebeloop.

Overlap in genetische gevoeligheid voor verschillende auto-immuunziekten. De beschreven benaderingswijzen zijn niet uniek voor CIDZ. In screeningsonderzoeken van het hele genoom in families van patiënten met onder meer diabetes mellitus type 1, multiple sclerose, reumatoïde artritis en astma is inmiddels een groot aantal loci geïdentificeerd die koppeling vertonen met de ziekte. Bij vergelijking van de resultaten van 23 gepubliceerde genoomscreeningsonderzoeken van auto-immune of immuungemedieerde ziekten vonden de onderzoekers een sterke overlap tussen de loci voor de verschillende ziekten; 65% van alle gevonden loci paste in 18 clusters.³² Deze intrigerende observatie suggereert dat sommige genen een rol spelen bij meerdere auto-immuunziekten en kan een verklaring geven voor het gegeven dat verschillende auto-immuunziekten regelmatig voorkomen bij een en dezelfde patiënt of binnen één familie. Dit zou kunnen betekenen dat er twee categorieën genen zijn voor immuungemedieerde aandoeningen: genen die coderen voor eiwitten die een sleutelrol spelen in de immuunrespons en predisponeren voor auto-immuunziekten in het algemeen, en ziektespecifieke genen die verantwoordelijk zijn voor het fenotype en de ernst van de ziekte.

Toekomstig genetisch onderzoek bij chronische inflammatoire darmziekte. De afgelopen jaren is grote vooruitgang geboekt in het ontrafelen van de genetische gevoeligheid voor CIDZ. Deze is complex en volgt niet de Mendel-wetten. Voor een model dat de beschreven observaties integreert, gaat men uit van een concept waarin CIDZ niet uit twee goed af te bakenen ziekten bestaat (colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn), maar

uit een complex van aandoeningen dat gekenmerkt wordt door chronische intestinale ontsteking. Hieraan kunnen verschillende pathogenetische mechanismen ten grondslag liggen. In dit model gaat men er vanuit dat verschillende (combinaties van) genetische factoren alle kunnen leiden tot de intestinale ontsteking. Bepaalde genen zijn hierbij verantwoordelijk voor een globale stoornis in de immuunrespons, terwijl andere de ernst of het fenotype (en daarmee de klinische heterogeniteit) van de ziekte bepalen. Hierbij gaat men ervan uit dat er een bepaalde 'grens' bereikt moet worden voordat zich bij iemand CIDZ ontwikkelt. Deze grens kan bereikt worden door het hebben van een combinatie van een aantal genetische factoren, mogelijkerwijs in combinatie met één of meer exogene factoren.

De komende jaren zullen de gevonden resultaten bevestigd moeten worden door meta-analysen en multicentrische onderzoeken waarin zeer grote groepen van patiënten onderzocht worden. Wanneer overtuigend bewijs is gevonden voor koppeling met een locus, zal geprobeerd worden het gebied te verkleinen door additionele markers in dit chromosoomdeel te onderzoeken. Zelfs wanneer de chromosomale locaties voldoende verkleind kunnen worden, zal echter een gebied overblijven van vele genen, waarvan de functie veelal onbekend is. De grote uitdaging is om hieruit het verantwoordelijke gen (of de verantwoordelijke genen) te isoleren. Hoewel dit voor monogene ziekten tegenwoordig mogelijk is, is dit voor complexe ziekten vooralsnog een uiterst moeilijke opgave, hoewel van nieuwe technieken om genen te kloneren, alsmede van ontwikkelingen zoals het humaan genoomproject, veel wordt verwacht. Wanneer een predisponerend gen eenmaal is geïdentificeerd, zullen functionele onderzoeken moeten uitwijzen wat het effect is op het genproduct. Welke consequenties deze genetische informatie zal hebben voor de preventie en de behandeling van CIDZ kunnen wij nog niet geheel voorzien, maar het lijkt geen twijfel dat de techniek van nu belangrijke informatie zal opleveren voor ons inzicht in en de behandeling van CIDZ in het nieuwe millennium.

Dr.G.Bouma ontving ondersteuning van de dr. Saal van Zwanenberg stichting en het dr. Hendrik Muller's Vaderlandsch Fonds.

ABSTRACT

Immunology in medical practice. XXVI. Immunogenetics of inflammatory bowel diseases

– Epidemiological and family studies have shown that the inflammatory bowel diseases (IBD), encompassing ulcerative colitis and Crohn's disease, are in large part genetically determined.

– This genetic susceptibility is complex and does not follow Mendelian inheritance patterns. The search for susceptibility genes is further complicated by genetic and clinical heterogeneity.

– Recent developments in molecular biology have enabled the identification of chromosomal regions and genes underlying IBD.

– Genetic association studies have established a role of HLA genes and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of IBD.

– Whole genome linkage analysis studies using microsatellite markers and affected sib-pair analysis have identified two chromosomal locations (*IBD1* on chromosome 16 and *IBD2* on chromosome 12) associated with IBD.

– Recent investigations have shown that some chromosomal regions play a role in several autoimmune disorders. This suggests the presence of two types of genes in these diseases: genes that encode proteins that play a key role in the immune response and predisposing for autoimmune diseases in general, and disease-specific genes that are responsible for the phenotype and the severity of the disease.

LITERATUUR

- 1 Yang H, Rotter JI. The genetics of inflammatory bowel disease. In: Targan S, Shanahan F, editors. Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 32-64.
- 2 Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996;347:1212-7.
- 3 Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996;85:311-8.
- 4 Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floreus-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.
- 5 Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;312:95-6.
- 6 Breslin NP, Todd A, Kilgallen C, O'Morain C. Monozygotic twins with Crohn's disease and ulcerative colitis: a unique case report. *Gut* 1997;41:557-60.
- 7 Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG. Familial prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *Br Med J* 1980;280:84.
- 8 Sandler RS. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Targan SR, Shanahan F, editors. Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 5-30.
- 9 Gilat T, Grossman A, Fireman Z, Rozen P. Inflammatory bowel disease in Jews. In: McConnell R, Rozen P, Langman M, Gilat T, editors. The genetics and epidemiology of inflammatory bowel disease. Basel: Karger; 1986. p. 135-40.
- 10 Spielman RC, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;52:506-16.
- 11 Asakura H, Tsuchiya M, Aiso S, Watanabe M, Kobayashi K, Hibi T, et al. Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1982;82:413-8.
- 12 Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, Redford A, Magalong D, Tian D, et al. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104:741-8.
- 13 Bouma G, Crusius JBA, Garcia-Gonzalez MA, Meijer BUGA, Hellemans HPR, Hakvoort RJ, et al. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 1999;115:294-300.
- 14 Danzé PM, Colombel JF, Jacquot S, Loste MN, Heresbach D, Ategbo S, et al. Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut* 1996;39:69-72.
- 15 Nakajima A, Matsuhashi N, Kodama T, Yazaki Y, Takazoe M, Kimura A. HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;109:1462-7.
- 16 Reinshagen M, Loeliger C, Kuehn P, Weiss U, Manfras BJ, Adler G, et al. HLA class II gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany. *Gut* 1996;38:538-42.
- 17 Bouma G, Oudkerk Pool M, Crusius JBA, Schreuder GMT, Hellemans HPR, Meijer BUGA, et al. Evidence for genetic heterogeneity in inflammatory bowel disease (IBD); HLA genes in the predisposition to suffer from ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol* 1997;109:175-9.
- 18 Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, et al. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994;106:637-42.
- 19 Bioque G, Bouma G, Crusius JBA, Koutroubakis I, Kostense PJ, Meuwissen SGM, et al. Evidence of genetic heterogeneity in IBD: 1. The interleukin-1 receptor antagonist in the predisposition to suffer from ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8:105-10.
- 20 Andus T, Daig R, Vogl D, Aschenbrenner E, Lock G, Hollerbach S, et al. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa – association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist genotype 2. *Gut* 1997;41:651-7.
- 21 Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiochi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;154:2434-40.
- 22 Stokkers PCF, Aken BE van, Basoski N, Reitsma PH, Tytgat GNJ, Deventer SJH van. Five genetic markers in the interleukin 1 family in relation to inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;43:33-9.
- 23 Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-3.
- 24 Mirza MML, Lee J, Teare JD, Hugot JP, Laurent-Puig P, Colombel JF, et al. Evidence of linkage of the inflammatory bowel disease susceptibility locus on chromosome 16 (*IBD1*) to ulcerative colitis. *J Med Genet* 1998;35:218-21.
- 25 Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, et al. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 1996;5:1679-83.
- 26 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. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
- 27 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, 3p, and 4q: evidence for epistasis between 1p and *IBD1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7502-7.
- 28 Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJS, et al. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999;64:808-16.
- 29 Ludviksson BR, Ehrhardt RO, Fuss JJ, Strober W. Mucosal and thymic dysregulation. Role in human intestinal inflammation. *The Immunologist* 1997;5:202-9.
- 30 Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, et al. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112:1845-53.
- 31 Bouma G, Poen AC, Garcia-Gonzalez MA, Schreuder GM, Felt-Bersma RJ, Meuwissen SGM, et al. HLA-DRB1*03, but not the TNFA-308 promoter gene polymorphism confers protection against fistulising Crohn's disease. *Immunogenetics* 1998;47:451-5.
- 32 Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF, et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9979-84.

Aanvaard op 20 augustus 1999