

TGF- β GENET VED PRIMÆR SKLEROSERENDE CHOLANGITT

STUDENTOPPGAVE SKREVET AV

Studmed Magne Christoffer Sandmark

BAKGRUNN

Primær skleroserende cholangitt (PSC) og primær biliær cirrhose (PBC) er de viktigste årsakene til kronisk cholestatisk leversykdom. Galle dannes av hepatocytter og består blant annet av bilirubin, gallesalter og kolesterol. Galle er en eksreksjonsrute for hydrofobe molekyler og har en rolle i fettfordøyelse og -absorpsjon. Ved cholestase foreligger det en vevsakkumulering av galle sekundært til stase og hemmet utskillelse av gallesyrer (1). PSC og PBC skilles ved at PSC primært affiserer store og intermediære galleganger både intra og ekstrahepatisk, mens PBC affiserer de minste galleganger(2). PSC fører til en uttalt fibrose allerede ved diagnosetidspunktet (3) med progredierende gallegangsstrikturer og levercirrhose(4). Det finnes i dag ingen effektiv behandling (5), og tilstanden er den hyppigste årsaken til levertransplantasjon i Norge (6). PSC er derfor en viktig sykdom selv om forekomsten er lav (8.5/100000) (7).

Sykdommen forekommer hyppigere hos personer av nordeuropeisk opprinnelse enn ellers i verden, og er vanligere hos menn enn hos kvinner (2:1) (8). De fleste av pasientene med PSC har en inflammatorisk tarmsykdom (IBD) (80%), vanligvis ulcerøs colitt, men også colitt som ledd i Crohns sykdom forekommer (9, 10). Studier om inflammatorisk tarmsykdom ved PSC har antydnet at den kan representerer en tredje type IBD (10). En rekke autoimmune sykdommer er overrepresentert hos pasienter med PSC (11). Opptil 13% av pasientene utvikler gallegangskreft, og i tillegg er det funnet økt forekomst av kreft i kolon og pankreas hos PSC pasienter (12).

Årsaken til PSC er ikke kjent, men genetiske faktorer spiller sannsynligvis en sentral rolle i patogenesen (13). Den regnes innen genetisk terminologi for å være en kompleks sykdom, det vil si at variasjon i flere ulike gener i samspill med miljøfaktorer er nødvendig for sykdomsutvikling (14).

Et gjentatt funn er imidlertid at en eller flere genetiske varianter i human leukocyte antigen (HLA) komplekset på kromosom 6 bidrar til sykdomsrisiko (14-18). Funn av assosiasjon til variasjon i gener utenfor HLA-komplekset har så langt ikke vist seg robuste ved forsøk på reproduksjon i uavhengige populasjoner (19). Tidligere har letingen etter sårbarhetsgener for PSC vært knyttet til plausible kandidater med hensyn til funksjon i fravær av store familiematerialer for posisjonelle studier. I dag benyttes helgenomsstudier (genome wide

association studies, GWAS) der hele genomet kan undersøkes for genetiske markører som disponerer for sykdom.

I fravær av muligheten til å drive posisjonelle studier over flere kromosomer i store familiematerialer, fokuserer letingen etter sårbarhetsgener for PSC på plausible kandidater med hensyn til funksjon.

Gallesyrer som akkumuleres i leveren pga. gallegangstrikturene er toksiske både for hepatocytter og gallegangsepitel og kan medføre celledød og inflammasjon. Skaden på leverparenkymet forsterker prosessen og leder til kronisk inflammasjon og gallestase. Resultatet er fibrose og cirrhose sekundært til biliære forandringer og ascenderende cholangitt. Gallegangsepitelet er de første cellene som rammes av gallesyre akkumulasjonen (2). Dette er sannsynligvis av betydning for levercirrhosen som opptrer i forløpet av PSC og andre leversykdommer med gallestase (20). For PSC har studier vist at variasjon i gener knyttet til adaptasjonsmekanismene som inntreffer ved cholestase er av betydning for sykdomsprogresjonen (21). Disse adaptasjonsmekanismene er også knyttet til reguleringen av fibrosedannelse i leveren (22, 23).

FIBROSE

En rekke sykdommer har fibrose som ett av sine histologiske kjennetegn; blant disse finner vi interstitielle lungesykdommer og levercirrhose (24). Leveren er et organ med god evne til å regenerere skadet vev. Den kan gjenopprette funksjonelt vev selv etter uttalt skade, enten via økt celledeling av hepatocytter eller ved økt proliferasjon av stamceller. Denne prosessen opphører når organet er fullt regenerert, og er regulert av en rekke vekstfaktorer samt cytokiner som kan virke hemmende eller modulerende på prosessen (25). Arrdannelse er en normal reaksjon på akutt vevsskade og involverer blant annet nydannelse av kollagen. Leverfibrose er en respons på kronisk leversykdom, og den er lik uavhengig av utløsende årsak. Fibrosen har en klinisk effekt både i form av tapt funksjon og rent mekanisk ved å øke motstanden i portakretsløpet. Fibrose i leveren har vist seg å være en reversibel prosess, selv ved kronisk skade (26), og det er videre tegn til reversibilitet av cirrhose når inflammasjonen i leveren opphører.

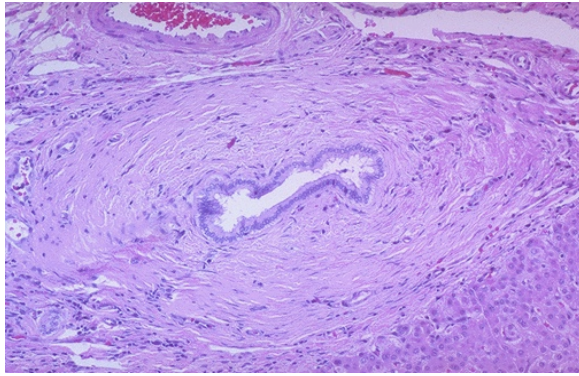
Fibrose oppstår når balansen mellom nydannelse og nedbrytning av kollagen og andre bindevevskomponenter forrykkes. Prosessen karakteriseres ved økt produksjon av ekstracellulær matriks (ECM) og er primært en tilhelingsprosess. Den økte ECM mengden er en konsekvens av ubalansen mellom nysyntese, avleiring og nedbrytning (25). Denne

prosessen påvirkes av cellene i vevet, inflammatoriske celler samt en rekke cytokiner (27, 28). Sentralt i prosessen er aktivering av stellatceller, oftest ved parakrin stimulering. Disse cellene produserer en vesentlig del av ECM i leveren.

ECM består av en rekke makromolekyler som kollagen, glukosaminoglykaner, proteoglykaner og non-kollagene glykoproteiner. Sammensetning og mengden av disse endres ved fibrose. Syntese og nedbrytning av kollagen er tett knyttet til ulike betennelsesprosesser (29). Syntese fremmes av bla TGF β , IL-13 og tissue inhibitor of matrix metalloproteinaser (TIMP) mens nedbrytning fremmes av IFN γ og matrix metalloproteinaser (MMP) (24). Endringer i nedbrytningen er sentral i fibroseprosessen og proteaser i matrix, f.eks. kollagenase eller MMP, er ansvarlige for dette. Disse foreligger inaktive i matrix og aktiveres ved proteolytisk spaltning med plasmin. Plasminaktivitet stimuleres blant annet av TGF- β (26).

Ved leverskade øker mengden Kupffer celler(KC) som er hepatiske makrofager fra den hematopoetiske cellerekken. De sørger for fagocytose og befinner seg i leversinus lumen. KC er en kilde til økt TGF- β produksjon (25, 30). De nevnte stellatcellene er perisinoidal celler. De utgjør en heterogen gruppe som kan aktiveres av KC. Ved aktivering omdannes disse til myofibroblast likende celler med økt ECM dannelse i form av økt kollagen-1, fibronectin og proteoglykaner (26). Den kontraktile evnen til stellatcellene påvirker leverens blodkar og gir økt portaltrykk. I tillegg til å danne ECM, lagrer stellatcellene vitamin A og er viktig i forbindelse med vevstraume (30). Cameron et al har undersøkt stellatcellenes rolle hos PBC og PSC pasienter både med og uten cirrhose. Det ble funnet en akkumulering av KC uten at det var assosiert med nekrose, men pasienter med etablert cirrhose hadde signifikant økt mengde TGF β . Konklusjonen var at vedvarende makrofagaktivering medførte kronisk TGF β sekresjon som bidrar til den fibrotiske prosessen.

Ved PSC sees det typiske radiologiske endringer av gallegangene med strikturer og proksimal dilatasjon av gangene. Det foreligger også beading, et fenomen med strikturer og dilatasjoner. Mikroskopisk sees fortykning av galleganger med infiltrasjon av inflammatoriske celler. Galleganglesjonen er typisk med konsentrisk fibrose rundt gallegangene (bilde 1). Graden av sykdom bestemmes etter histologiske forandringer og kriterier ifra 1-4 stadier, der stadium 4 utgjør cirrhose (31).



Bilde 1 Fortykket gallevegg med økt kollagen deponering, bilde fra University of Utah (32)

CYTOKINER OG FIBROTISKE MEKANISMER VED PSC OG LEVERCIRRHOSE

Studier av pasienter med inflammatorisk tarmsykdom har tradisjonelt sett fokusert på forskjellene mellom type 1 T-hjelpecelle (Th1) respons med høye nivåer av interferon gamma (IFN- γ) og interleukin (IL) 12 (typisk for Crohn's sykdom), og Th2 respons med IL-4, IL-5 og IL-13 (typisk for ulcerøs colitt) (33). Selv om musemodeller for PSC fremviser en Th1-lignende cytokinprofil (34), finnes det lite kvalitetsdata for cytokinprofilen ved human PSC og det er ikke holdepunkter for å kalle PSC verken en Th1 eller Th2 drevet sykdom (35-37), (38) for eksempel er det ingen økning av IFN- γ (39). Det mest konsistente funnet når det gjelder cytokiner ved PSC er et økt nivå av tumor nekrose faktor alfa (TNF α) (36, 38, 40, 41). Kilden for TNF α ved PSC er ikke bestemt, siden både natural killer (NK) celler, makrofager og T-lymfocytter kan produsere dette cytokinet (42). En genetisk variant assosiert med økt risiko for PSC, TNF α promotor -308 A varianten (43), er kjent for å gi spesielt høy produksjon av TNF α (44).

TRANSFORMING GROWTH FACTOR β

En rekke former for leverskade, inkludert gallestase, fører til aktivering av pro-fibrotiske systemer, hovedsakelig via økt produksjon av transforming growth factor beta (TGF β) (45, 46). I dyremodeller for PSC finner man en massiv oppregulering av TGF β og en rekke andre pro-fibrotiske gener som styres av TGF β (47). Det er vist at eksogent tilført TGF β fører til fibrose i disse organene, uavhengig av om det foreligger vevstraume. TGF β er en antiproliferativ faktor og kan lede til apoptose eller stans av cellesyklus G1/S-fase (25). Makrofager og andre celler som produserer TGF β kan således tenkes å bidra til fibrosen som observeres omkring gallegangene ved langtkommet PSC gjennom dette cytokinet (48). Spesielt har man i det siste blitt klar over at også gallegangsepitelet selv er i stand til å produsere TGF β under betingelser som opptrer ved PSC (49). Det finnes holdepunkter for at

TGF β spiller en nøkkelrolle for fibrosen ved levercirrhose (50, 51), og det spekuleres i om anti-TGF β behandling kan få en plass i håndteringen av cirrhosetilstander i fremtiden (52, 53).

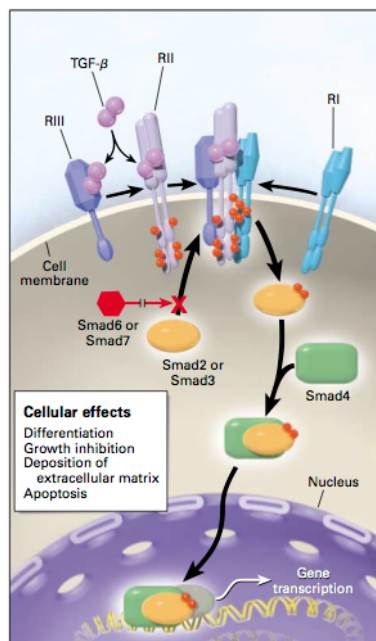
TGF β er et cytokin knyttet til en rekke prosesser og celler. Reseptorer for peptidet finnes i de fleste celler og vev, og det kan virke inn på cellesyklus, proliferasjon og differensiering. TGF β er viktig for embryologisk utvikling, sårtilheling og angiogenese (54, 55).

TGF β foreligger i 3 isoformer som kodes i hvert sitt gen: *TGF β 1*, *TGF β 2* og *TGF β 3*. *TGF β 1* knock-out mus kjennetegnes med en høy dødlighet og massive inflammasjonsprosesser. *TGF β 2* knockout mus viser en embryologiske avvik og later til å være viktig for normal fosterutvikling. *TGF β 3* har ganske lik funksjon som *TGF β 1* men er i tillegg sentral i den embryologiske utviklingen. Dette viser seg i form av økt mengde fødselsdefekter og perinatal dødlighet hos slike knock-out mus. Vår studie tar for seg *TGF β 1*, heretter omtalt som TGF β (55, 56). *TGF β 1* er lokalisert på kromosom 19s korte arm, 19q13.2c i det humane genomet.

Overproduksjon i forbindelse med tilheling kan lede til fibrose og arr. Dette kommer til uttrykk ved økt produksjon av ekstracellulær matriksproteiner (kollagen, fibronectin og integriner) samtidig som ekspresjonen av nedbrytende enzymer reduseres (kollagenase, heparinase, stomelysin). Det dannes også hemmere av nedbrytningsenzymene, TIMP (55). TGF β dannes primært av hematopoetiske celler, og kan virke autokrint og parakrint på leukocytter ved å hemme deres proliferasjon og aktivering (57). TGF β virker videre kjemotaktisk på T-celler, monocytter og nøytrofile granulocytter (56).

TGF β foreligger bundet non-kovalent til latency associated polypeptide (LAP) som hindrer TGF-reseptor binding. Ved spalting ifra LAP dannes en homodimer vha hydrofobe interaksjoner som kan binde seg til reseptorer (55, 57). Alle TGF β isoformene binder seg til de samme reseptorene. Det finnes 3 ulike høyaffinitetsreseptorer, hhv transforming growth factor beta receptor I (TGF β RI), -II og -III. Type III er den mest utbredte av disse og binder signalstoffet, som overføres til type I eller II reseptorer, som sørger for en intracellulær signaltransduksjon (56). De har et intracellulært serine-threonin protein kinase domene som kan fosforilere proteinene Smad 2 eller 3. Fosforylert Smad 2/3 danner en dimer med Smad 4 og transporteres inn i målcellens kjerne (55). SMAD2/3-4 komplekset binder seg til SMAD bindende motiver (CAGAC) som en transkripsjonsfaktor. Komplekset har en lav bindingsaffinitet og derfor må det rekrutteres ytterligere transkripsjonsfaktorer. Interaksjonen

mellom Smad komplekset og de andre transkripsjonsfaktorer gir en høy affinitet og spesifisitet for de områdene av DNA som skal transkriberes (57). Smad 2 og 3 signalkaskaden er sentrale i stellatcellenes aktivering og gir økt fibrogenese (26). Signaltransduksjonen etter TGF β binding kan imidlertid moduleres. Det finnes inhibitoriske Smad proteiner, som Smad 6 og 7. Disse proteinene virker signaldempende ved å hindre fosforylering av Smad 2/3 (se figur 1). (55)



Figur 1 TGF β s signal transduksjon hentet ifra Blobe et al. 2004 (55)

Reguleringen av *TGF β 1* er ikke fullstendig kartlagt, men promotor regionen har bindesete for kjernefaktor κ b (NF κ b, kappa) og activator protein 1 (AP-1). NF κ b familien er protein dimerer som fungerer som transkripsjonsfaktorer i cellekjernen. De regulerer proinflammatoriske cytokiner, reseptorer, og andre proteiner ved inflammasjon i blant annet GI(58). TGF β stimulerer til økt egen-produksjon i T-celler ved reseptor aktivering. Denne autokrine funksjonen gjør at TGF β 1 i seg selv kan indusere økt transkripsjon (57). AP-1 er også en transkripsjonsfaktor og kan i seg selv aktivere NF- κ B responsen i en organisme, men virker også antiinflammatoriske ved å hemme NF- κ B ekspresjon av målgener via negative tilbakekoblingsmekanismer (59).

GENETISKE VARIANTER AV *TGFB* OG FIBROSEDANNELSE

Det er økende interesse for studier av såkalte "modifier genes", dvs. gener som påvirker hvordan en sykdom oppfører seg hos den enkelte pasient. Ikke minst kan varianter av "modifier genes" føre til at en og samme sykdom har ulik alvorlighetsgrad hos ulike individer. Dette til sammenligning med "susceptibility genes", dvs. gener som påvirker

risikoen for å i det hele tatt få en bestemt sykdom. Selv i monogene sykdommer (sykdommer som oppstår pga. mutasjon i ett enkelt gen) som cystisk fibrose og hemokromatose påvirkes sykdomsuttrykket av ”modifier genes” (60-62). Studiene av pasienter med cystisk fibrose er spesielt interessante, både fordi disse pasientene kan ha PSC-lignende forandringer i galleveiene (63), samt at det er variasjon nettopp i $TGF\beta$ genet som har pekt seg ut som viktigst for alvorligheten av lungeaffeksjonen (60, 64). En rekke andre sykdommer, for eksempel levercirrhose der fibrose er involvert har også vist seg å bli påvirket av variasjon i $TGF\beta$ genet (65).

Det finnes mange ulike varianter av $TGF\beta$ (66, 67). Tre av disse genvariantene har vist seg å være av betydning når det gjelder $TGF\beta$ nivået hos et individ (68-71). Disse genvariantene (polymorfismene) sitter i -509 posisjonen i promotorområdet på genet (rs1800469), i kodon 10 (rs1982073) og i kodon 25 (rs1800471). Det hersker fortsatt en viss usikkerhet ifht. hvilken av disse polymorfismene som er viktigst, en situasjon som ikke er uvanlig i genetikken pga. såkalt ”koblingsulikevekt”. Det som går igjen er at pasientene må være homozygote for ”høy $TGF\beta$ -produksjon” variantene for å påvirkes, spesielt for -509 promoter T varianten som gir økt binding av transkripsjonsfaktoren ”yinyang1” (-509 TT homozygote) og kodon 10 C varianten som gir aminosyren leucin istedenfor prolin (kodon 10 CC homozygote) (60).

HYPOTESE

Genetisk variasjon i $TGF\beta$ påvirker sykdomsrisiko eller sykdomsprogresjonen hos pasienter med PSC.

MÅLSETTING OG HENSIKT

Hensikten med forsøket var å undersøke om genetisk variasjon i $TGF\beta$ er av betydning for sykdom og sykdomsprogresjonen ved PSC. Tidligere studier i gruppen ved Rikshospitalet har fokusert på matrix metalloproteinasegen ved PSC (72), og studien førte dermed tidligere arbeid videre. Den generelle betydning av $TGF\beta$ i sykdommer med fibrose gjorde at funn i $TGF\beta$ genvariasjon kunne ha betydning for andre fibrotiske sykdommer.

STUDIEPOPULASJON

PSC: Studien inkluderte DNA fra 365 klinisk velkarakteriserte PSC pasienter av skandinavisk opprinnelse (fra Rikshospitalet, Oslo, og Huddinge Universitetssykehus, Stockholm).

Gruppen bestod av 70% menn (n=259) med en median alder ved diagnose på 34,3år. 13% har utviklet cholangiocarcinom (n=49) og 80% av pasientene har IBD (n=290). Tidligere studier har vist genetisk homogenitet for disse populasjonene (15). Diagnosen var basert på standard kriterier og typiske funn ved cholangiografi (både magnetisk resonans cholangiografi og endoskopisk retrograd cholangiografi er benyttet) (4).

Frisk kontrollgruppe: Studien inkluderte et kjønns-matchet (70% menn) tilfeldig utvalg av friske personer fra Det Norske Benmargsgiverregister ved Institutt for Immunologi, Rikshospitalet, Oslo (n=368). De strenge kriteriene for inklusjon i benmargsgiverregisteret (spesielt i forhold til fravær av autoimmune sykdommer), sammen med den lave forekomsten av PSC, sikret korrekt klassifisering av kontrollene som friske.

Når det gjelder overlevelsesdataene ble totalt ble 325 pasienter inkludert i analysene. Med en median oppfølging på 9,2år. Overlevelsesdataene for de norske pasientene (n=228) ble oppdatert januar 2008, for den svenske pasientgruppen ble eldre data benyttet (n=97). Endepunktet i studien var definert som transplantasjon eller død (n=141). 57% av pasientene (n=184) hadde ikke nådd endepunktet på studien.

GENETIKK OG METODE

Studien planlegges gjennomført med såkalt TaqMan teknologi (73). Tabell 1 angir de ulike polymorfismene som ble undersøkt.

DNA

Single nucleotide polymorphisms (SNP) er en DNA sekvens variasjon der en enkelt nukleotide – A, T, C eller G – er blitt endret (74). Slike variasjoner i genene utgjør en polymorfisme hvis de forekommer med en hyppighet >1%. Polymorfismene kan, avhengig av posisjonen, påvirke ekspresjonen eller funksjonen til et gen. (75, 76)

En menneskelig diploid celle har 23 par kromosomer, med 2 utgaver av hvert av de 22 autosomene samt 2 kjønnskromosomer. Et locus er en unik kromosomal posisjon som definerer posisjon til en DNA sekvens. En variant i et gitt locus kalles et allele. For et hvert

autosomalt locus er det 2 alleler og disse kan være forskjellige. I en befolkningsgruppe har de ulike allelene en fordeling med en frekvens, og den minste utbredte kalles minor allele frekvens (MAF) (76).

TAQMAN

6 SNPer var planlagt analysert med TaqMan. Teknologien ble levert av Applied Biosystems og er basert på fluorescerende merking av de ulike allelene for en gitt SNP.

Polymerase kjede reaksjon, PCR, er en metode for amplifisering av utvalgte DNA sekvenser. Det ble benyttet to oligonukleotide primere spesifikke for den målsekvensen man ønsket å amplifisere. Disse primerene binder seg til DNA sekvensen man ønsker å undersøke, ved at de er komplementære til sekvensen. Varmestabil DNA-polymerase samt varmestabile nukleotider (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) er også tilsatt. Dette er en syklisk prosess for amplifisering der de ulike prosessene settes i gang ved ulike temperaturer. I løpet av multiple sykluser blir mengden DNA sekvensen eksponentielt økt (75).

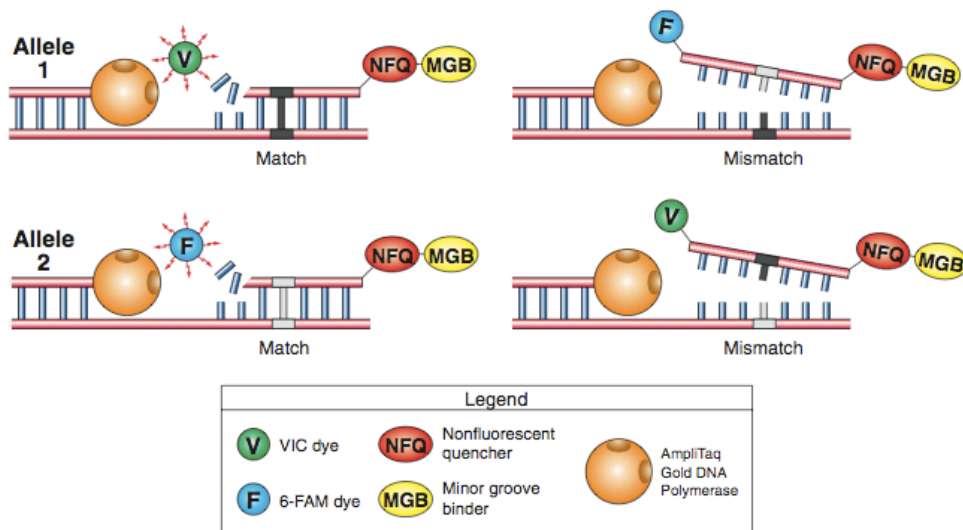
- Denaturering av DNA ved høy temperatur, f.eks. 93-95°C
- Rekombinering av DNA ved nedkjøling for feste av primer
- DNA syntese, f.eks. ved 70-75°C

GAGGAGGGGGCAACAGGACACCTGA[A/G]GGATGGAAGGGTCAGGAGGCAGACA

Figur 2 Eksempel på målsekvens for en probe, SNP er angitt i fet skrift med / mellom for de ulike variantene av rs1800469

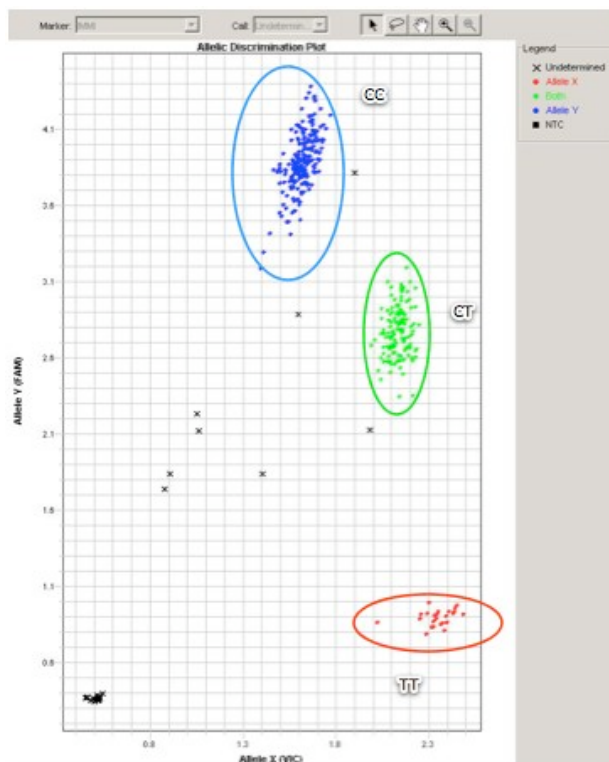
Metoden benytter seg av prober for de 2 ulike allelene som har knyttet til seg ulike fluorescerende fargestoffer, dyes. Disse blir kalt henholdsvis VIC og FAM (se figur 3) og var fluoriserende når de ikke er bundet til en DNA probe. Ved PCR frigis fargestoffet knyttet til en gitt probe hvis proben binder seg til en mål sekvens.

Ettersom PCR reaksjonen amplifiserer en gitt sekvens vil det frigis økte mengder fargestoff. Hvis en prøve inneholder begge alleler så vil både VIC og FAM mengden øke i prøven. Ved avlesning har man da 4 ulike utfall når man analyserer: Kun VIC, kun FAM, både VIC og FAM og non-konklusivt resultat. Disse utfallene gjenspeiler homozygot for allele 1, homozygot for allele 2, heterozygot og ikke-avklart resultat (bilde 2).



Figur 3 Binding av primer til alleler med fargestoff, hentet ifra TaqMan Protokoll (75)

PCR amplifisering ble utført for en SNP av gangen på plater med 384 brønner med 2-5µg tørket DNA. Det ble benyttet 1 plate for pasientene og 1 plate for kontrollene. Fluorescensen ble registrert ved hjelp av ABIs detektor ABI7900 og den medfølgende programvaren SDS. Signalene ble lest av samlet og dannet clusterer langs x og y aksene for homozygote av henholdsvis VIC og FAM proben for en gitt SNP amplifisering. For heterozygote prøver samlet signalet seg midt i mellom de to aksene (bilde 2). Informasjonsfilen ifra ABI anga hvilket alleler VIC og FAM representerte for de ulike SNP probene.



Bilde 2 Skjerm bilde utklipp ifra SDS analyse av 384brønner testet for rs8179181

UTVALG AV SNP

I tillegg til de tre viktigste genvariantene (rs1800469, rs1982073 og rs1800471) ble det valgt ut 3 andre SNPer ved hjelp av HapMap og Haploview for å sikre at *TGFβ* var dekket.

HapMap er en åpen internasjonal databasen over genetisk variasjon hos mennesket(77).

SNPene ble valgt ut ifra forekomst i europeisk avstammet befolkning, posisjonen i genet, samt om de tidligere har vært knyttet til endret genekspressjon eller var lokalisert til kodende områder av genet.

En av SNPene som var utvalgt, rs1800471, ble ikke analysert i studien fordi det ikke var mulig å få designet et TaqMan assay. Denne SNPen er lokalisert i en kodende del av genomet, kodon-25, og leder til en endret aminosyresekvens i proteinet. Kodon-25 varianten kan derfor potensielt ha en biologisk effekt (tabell 1).

SNP	Posisjon	Avstand i bp	Region	Minor allele og frekvens	Endring av aminosyresekvens
rs1800469	46552136	0	5'	0,300 T	
rs1982073	46550761	-1375	exon 1	0,375 C	Leucin ->Prolin
rs1800471	46550716	-1420	exon 1	0,075 C	Arginin-> Prolin
rs1800472	46539700	-12436	exon 5	0,050 T	Threonin ->Isoleucin
rs8179181	46530046	-22090	intron 5	0,325 T	
rs6957	46522446	-29690	3'	0,160 G	

Tabell 1 Oversikt over SNPer i *TGFβ*genet som skulle undersøkes

KOBLINGSULIKEVEKT - LD

Allele assosiasjon, også kalt Koblingsulikevekt (linkage disequilibrium - LD), uttrykker tilstedeværelsen av statistisk assosiasjon av alleler som forekommer på samme kromosom. Ved LD forekommer to alleler sammen oftere enn det som er forventet utifra deres individuelle frekvenser i befolkningen. Ved koblingsulikevekt har allelene ikke blitt skilt ved rekombinasjon. Rekombinasjon forekommer ved meiose og er en utveksling av genetisk materiale mellom homologe kromosomer, og gir opphav til genetisk variasjon. Haplotype er en serie koblede alleler ved et locus. Ulike kombinasjoner av allelene gir opphav til forskjellige haplotyper. De 5 ulike SNPene som ble kodet ble analysert for å se om noen haplotyper forekom hyppigere enn det som kunne forventes ut ifra en randomisert fordeling av det genetiske materialet (76, 77).

Graden av ikke LD ble beregnet og målt med D' (D prime) og r^2 . D' lik 1 er komplett LD og indikerer at et av allelene alltid forekommer på samme haplotype. Det betyr at det ikke har

forekommet en rekombinasjon som har skilt disse allelene. r^2 lik 1 kalles perfekt LD. Ved perfekt LD forekommer begge allelene alltid på samme haplotype. Da trenger man kun å bestemme det ene allelet for å type haplotypen. Hvis LD er 0 vil det si at allelene er i perfekt koblingslikevekt, svarende til en helt tilfeldig assosiering av alleler (77).

Haploview ble benyttet for å estimere de ulike haplotypene basert på frekvensen til den enkelte allele.

STATISTIKK

Det ble benyttet SPSS og haploview i den statistiske analysen. Signifikante funn ble satt ved p -verdi $< 0,05$. Sykdomsassosiasjon ble evaluert ved å beregne odds ratio (OR). Signifikans ble vurdert med chi-kvadrat test. Sykdomsprogresjon ble vurdert med 2 time-to-event analyser; Kaplan-Meier (KM) overlevelsesanalyse med Log-rank test og Cox regresjonsanalyse for aldersjustert analyse. Sykdomsprogresjon ble videre analysert ut ifra om SNPene utøvet effekt som en recessiv og dominant modell.

RESULTATER

Bestemmelsesraten for allelene til de ulike SNPene var god med en spredning ifra 96,7% til 99,7%. Gjennomsnittlig suksesserate for genotypingen var 98,3% for både kasus og kontroll (tabell 2). For reliable resultater er det vanlig å kreve en suksesserate over 95%.

SNP	Typet		Manglende	
	n=	%	n=	%
rs1800469	713	97,3	20	2,7
rs1982073	714	97,4	19	2,6
rs1800472	726	99,0	7	1,0
rs8179181	723	98,6	10	1,4
rs6957	720	98,2	13	1,8

Tabell 2 Oversikt over samlet kasus og kontroll callrate for allelene med TaqMan (n= 733)

SYKDOMSASSOSIASJON

Det var ingen assosiasjon mellom de undersøkte polymorfismene i studien og risiko for utvikling av PSC (tabell 3). OR varierte ifra 0,96 til 1,29 for de ulike SNP, med laveste p -verdi=0,30, og var ikke signifikant (tabell 3). MAF lå tett opp mot den rapporterte populasjonsfrekvensen hos både kasus og kontroll.

SNP	MAF			OR	95% kofidens-intervall		P-verdi
	Rapportert	Kasus	Kontroll				
rs1800469	0,300	0,284	0,277	1,0	0,82	1,30	0,80
rs1982073	0,375	0,366	0,376	1,0	0,77	1,19	0,68
rs1800472	0,050	0,025	0,019	1,3	0,65	2,56	0,47
rs8179181	0,325	0,251	0,248	1,0	0,82	1,31	0,79
rs6957	0,160	0,180	0,159	1,2	0,88	1,52	0,30

Tabell 3 Allefrekvens av SNP med OR for utvikling av PSC

Analyser gjort i Haploview utledet ulike blokker for *TGFβ* (figur 4). Det var ingen signifikant forskjell i fordelingen av de ulike haplotypene mellom kasus og kontrollgruppen.

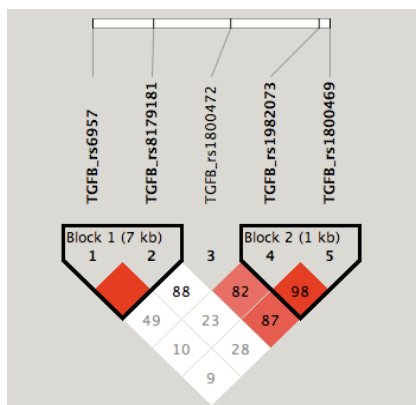
Haplotypene ble statistisk estimert ut ifra forekomstene av de ulike SNPene (tabell 4).

Haplotyper*	PSC		Kontroll		OR	Konfidens intervall (KI)
	Antall	Frekvens	Antall	Frekvens		
CTCCA	238	0,331	246	0,339	0,96	0,77-1,19
CTCTA	126	0,176	129	0,177	0,99	0,75-1,29
TCCCA	108	0,150	122	0,168	0,87	0,66-1,15
CTCCG	91	0,126	76	0,105	1,22	0,89-1,69
CCCCA	55	0,076	58	0,080	0,94	0,64-1,38
TCCTA	47	0,066	36	0,050	1,33	0,86-2,07
TCCCG	31	0,043	31	0,042	1,02	0,62-1,69
CCCTA	0	0,000	12	0,016	0,04	0,01-0,31
TCTCG	9	0,013	0	0,000	20,07	2,57-156,74

Tabell 4 Estimerte haplotyper med frekvens og OR for kasus og kontroll

* rekkefølge ihht posisjoner i tabell 1

Haploview beregnet LD for de ulike SNP, både D' og r^2 . For rs6957 og rs8179181 var $D' = 1$ og for rs1982073 og rs1800469 var $D' = 0,98$. Høyeste r^2 verdi var 0,65 mellom rs1982073 og rs1800469, de resterende var nær 0 (figur 4).



Figur 4 Hapmap blokker for *TGFβ* i Haploview med D' verdier

SYKDOMSPROGRESJON

Gjennomsnittlig overlevelse hos PSC pasientene i studien var 14 år (95% KI= 11,3-16,4). Kaplan-Meier analysen viste ingen signifikant endring i sykdomsprogressjon/overlevelse basert på de ulike genotypene (tabell 5). Ingen av pasientene hadde homozygot rs1800472 TT(minor) varianten og SNPen ble derfor ikke inkludert i de recessive-/dominant-modellanalysene. Det var ingen signifikant påvirkning av sykdomsprogressjon i henholdsvis recessiv- (tabell 6) og dominantmodell (tabell 7) med laveste p-verdier = 0,19 og 0,17

SNP	Allel	Median survival	95% KI	Log rank P-verdi
rs1800469	CC	15,5	12,3-18,6	0,95
	CT	13,3	9,2-17,5	
	TT(minor)	12,5	7,5-17,6	
rs1982073	TT	13,5	9,9-17,1	0,33
	TC	16,7	12,7-20,8	
	CC(minor)	10,9	6,7-15,3	
rs1800472	CC	13,8	11,0-16,7	0,77
	TC	14,4	9,2-19,7	
	TT(minor)			
rs8179181	CC	14,4	11,0-17,8	0,31
	CT	14,0	10,0-18,0	
	TT(minor)	10,9	6,0-15,8	
rs6957	AA	13,1	10,2-15,9	0,32
	GA	16,7	9,5-24,0	
	GG(minor)	19,9		

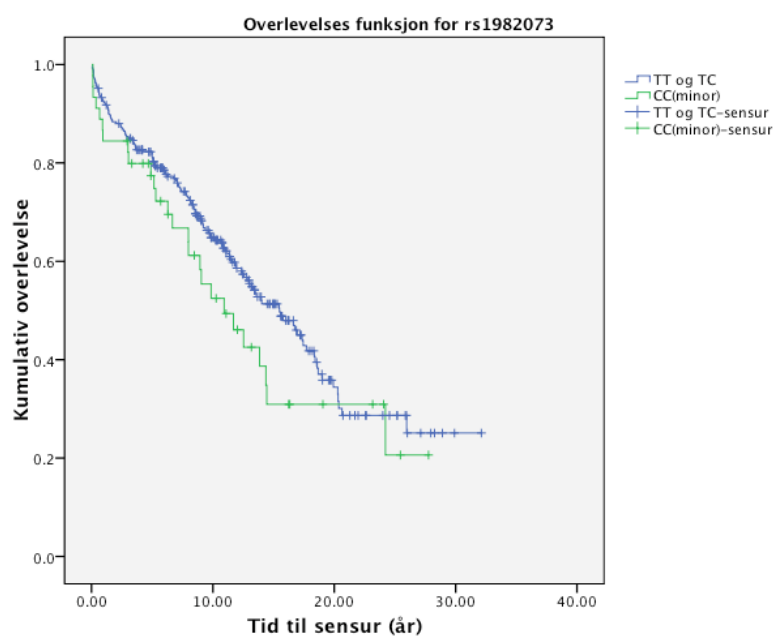
Tabell 5 Kaplan-Meier overlevelsesanalyse

SNP	Allel	Median survival	95% KI	Log rank P-verdi
rs1800469	CC og CT	14,4	11,7-17,1	0,76
	TT(minor)	12,5	7,5-17,6	
rs1982073	TT og TC	15,5	12,8-18,2	0,19
	CC(minor)	10,9	6,6-15,3	
rs1800472	CC og CT TT(minor)			n/a
rs8179181	CC og CT	14,4	11,9-16,8	0,31
	TT(minor)	10,9	6,0-15,8	
rs6957	AA og AG	13,6	10,6-16,6	0,31
	GG(minor)	19,9	-	

Tabell 6 Kaplan-Meier overlevelsesanalyse, recessiv modell

SNP	Allel	Median survival	95% KI	Log rank P-verdi
rs1800469	CC	15,5	12,3-18,6	0,86
	TT(minor) og CT	13,3	10,3-16,4	
rs1982073	TT	13,5	9,9-17,1	0,80
	CC(minor) og TC	14,4	11,2-17,6	
rs1800472	CC			n/a
	TT(minor) og CT			
rs8179181	CC	14,4	11,0-17,8	0,17
	TT(minor) og CT	12,9	9,1-16,7	
rs6957	AA	13,1	10,2-15,9	0,17
	GG(minor) og AG	16,7	11,0-22,4	

Tabell 7 Kaplan-Meier overlevelsesanalyse, dominant modell



Figur 5 Kaplan-Meier overlevelsesgraf for rs1982073, recessiv modell

ALDERSJUSTERT OVERLEVELSE

Det var ingen signifikant endring i overlevelse hos de ulike gruppene etter aldersjustering for de ulike polymorfismene. Alder er en tidligere veldokumentert egen risikofaktor som ble funnet signifikant i analysen med $p < 0,001$.

Ved aldersjusteringen ble trenden for kodon 10 CC mer fremtredende. Med OR= 1,04 (KI 1,0-1,1) og p-verdi 0,09 (tabell 8) og for den recessive modellen (tabell 9) OR=1,47 (KI 0,96-2,5) og p-verdi 0,074.

SNP	Exp(B) / OR	95% CI		P-verdi
rs1800469	0,99	0,96	1,0	0,65
rs1982073	1,04	1,0	1,1	0,09
rs1800472	1,00	0,93	1,1	1,0
rs8179181	0,97	0,94	1,0	0,09
rs6957	1,01	0,98	1,1	0,45
Alder ved diagnose	1,04	1,0	1,1	9,7E-10

Tabell 8 Aldersjustert Cox analyse

SNP	Exp(B) / OR	95% KI		P-verdi
rs1800469	1,15	0,67	2,0	0,61
rs1982073	1,47	0,96	2,5	7,4E-2
rs1800472				n/a
rs8179181	1,28	0,71	2,3	0,41
rs6957	1,04	0,95	1,1	0,37
Alder ved diagnose	1,04	1,0	1,1	1,5E-11

Tabell 9 Aldersjustert Cox analyse, recessiv modell

DISKUSJON

Genotypingen med TaqMan egnet seg godt for analysen. Det var en hurtig og effektiv metode med god suksessrate. Det manglet verdier for 0,3-3,3% av datasettene. Årsaken til dette kan skyldes ulike faktorer ved metodevalget og utførelsen.

- For lite reagens i brønn
- Forurensing av brønn
- Støv
- Fremmed DNA
- Luftbobler i brønnen ved analyse/avlesing
- Henfall av DNA i brønner

Prøver ytterst i brønnene kunne være utsatt for luft i perioden fra produksjon til analyse.

TaqMan teknologien er en såkalt cluster teknologi, og er følsom for variasjoner i DNA konsentrasjon og mengde. Dette vanskeliggjør bestemmelse av prøver som ligger utenfor disse clusterene, selv om en reaksjon har forekommet er bestemmelsen ikke entydig. Bilde 1 viser slike verdier angitt som kryss (x). Bestemmelsen hadde likevel en såpass høy suksessrate at resultatene anses som valide og representative.

Noen av individene (n=9) ble ekskludert ifra haploview analysen pga lav suksessrate, definert som <60% suksess for samtlige SNP'er. Et individ hadde 0% suksessrate.

På grunn av lav r^2 verdi var det nødvendig å kode for alle SNPene som var utvalgt. Ved en perfekt LD kunne arbeidet blitt forenklet ved å kun kode for enkelte av SNPene. D' var nær 1 for 2 par av de 5 SNPene som ble kodet, mellom rs6957 og rs8179181 samt rs1982073 og rs1800469. Dette indikerer enn komplett LD. Det betyr at ett av allelene alltid forekommer å samme haplotype og at disse ikke har blitt skilt ved rekombinasjon.

ASSOSIASJON

Det er ingen signifikant sykdomsassosiasjon for noen av de undersøkte SNPene. 2 av de hadde en lavere allelefrequens enn det som var forventet i befolkningen, rs1800472 hadde forventet MAF på 0,05 og det ble funnet en halvering av allelefrequensen i gruppene, henholdsvis 0,025 og 0,019 for kasus og kontroll. For rs8179181 var MAF i gruppene 7,5% lavere enn den forventede frekvensen. Dette ble gjenfunnet hos både kasus og kontroll og utgjør dermed en populasjon på 733 individer. Bakgrunnen for MAF verdiene er studier på europeisk populasjon.

En sykdomsassosiasjon består av to faktorer, nemlig effekt og signifikans. Oddsratio, OR, er et uttrykk for assosiasjonsstyrken ved å sammenlikne forekomsten i de 2 gruppene, som en retrospektiv studie. OR i kasus-kontroll studier tilsvarer relativ risiko (78). Denne studiens pasientgrunnlag gjør det sannsynlig at sykdomsassosiasjonen til alleler med svak effekt ikke ville oppdages ($OR < 1,30$). P-verdien avgjør om et funn anses som signifikant, og avhengig av hva denne velges til er det en mulighet for å forkaste falske negative resultater. P-verdien skal være lav for å unngå at man rapporterer falske positive verdier.

I noen tilfeller kan man se trender og resultater som ikke er signifikante, men som samfaller med hypotesen, problemet blir i slike tilfeller å vurdere om det er mangel på statistisk styrke i en studie eller om det er et ekte negativt funn. Statistisk styrke kan potensielt utgjøre en begrensning i analysen av sykdomsrisiko og ulike genvarianter. PSC er en sykdom med lav prevalens som gjør at det er vanskelig å samle store nok populasjoner for å påvise svake effekter for mistenkte gen. Statistisk styrke påvirkes av antallet pasienter, frekvensen av sykdomsassosiert allele og effekten til allelet. Desto mindre påvirkning den genetiske varianten har, desto flere pasienter må studeres for å oppdage en sann effekt og unngå type 2 feil. Videre må det være en økende risiko for å kunne oppdage påvirkning til varianter med lav frekvens.

SYKDOMSPROGRESSJON

For å vurdere de ulike SNPenes innflytelse på overlevelse ble det benyttet Kaplan-Meier (KM) metode. KM-overlevelseskurven beregnes ut ifra oppfølgingstiden til det oppstår en definert hendelse (79). Sjansen for å overleve en gitt tidsperiode anses som summen av sjansen for å overleve en rekke mindre intervaller, en betinget sannsynlighet. Metoden sensurer pasienter etter hvert som oppfølgingen er for kort pga manglende overlevelsedata, dvs. en høyresidig sensur. Kurven har en trinnfordeling, som forblir uendret inntil en hendelse inntreffer, selv om det foreligger sensurert data i tidsintervallet. Etter en hendelse beregnes andelen overlevende pasienter. Med lang nok oppfølging vil alle overlevelseskurver teoretisk gå mot 0. Pasienten som ikke har nådd endepunkt er inkludert i SPSS analysene og blir sensurert ved hendelser. Dette indikeres i KM-kurven med en strekt (figur 5) (80).

Cox regresjons analyse ble benyttet å korrigere for andre faktorer som påvirker sykdomsutviklingen i studiepopulasjonen. Metoden tillater korreksjon for andre forklarende variabler for å synliggjøre den undersøkte faktorens enkelt bidrag. Kjønn, alder, eller andre relevant faktorer kan det da korrigeres for i analysen. I denne oppgaven ble det benyttet aldersjustert overlevelse i forhold til de ulike *TGFβ* alleler som et tillegg til KM analysen. (81, 82).

Overlevelsesanalysene viste ingen signifikante funn for at polymorfismer i *TGFβ* påvirker sykdomsprogressjonen ved PSC, verken som et dominant eller recessivt trekk. Det var heller ikke signifikante verdier ved aldersjustert overlevelse. I forhold til hypotesen og studien på cystisk fibrose pasienter er det verdt å merke seg at rs1982073 i den recessiv modellen viser en trend i tråd med hypotesen (tabell 6). Denne trenden er synlig i KM-kurven, gjengitt i figur 5. For CC homozygote i kodon 10 varianten var overlevelsen 10,9år (KI: 6,7-15,3) mot 15,5

år (KI: 12,8-18,2) for pasienter med TT og TC varianten. Forskjellen er ikke-signifikant med p-verdi 0,19 ved KM analysen. Ved aldersjustering blir trenden tydeligere for kodon 10 CC-varianten med OR 1,47 (KI: 0,96-2,5) og p-verdi på 0,074.

Drumm et al fant i deres studier av cystisk fibrose en assosiasjon i overlevelse hos de som var CC-homozygote i kodon 10 (rs1982073). Vår studie kunne ikke reprodusere resultatet hos pasienter med PSC, men trenden er i samme retning som studien til Drumm, med en kortere overlevelse. Hvis CC-homozygot variant har en effekt på sykdomsprogresjonen så kan det ha vært feil ved studiedesignet, enten er effekten av *TGFβ1* kodon 10 CC-homozygote for svak eller så kan det være for liten studiepopulasjon. . Kodon 10 CC-homozygote hadde en non-signifikant redusert overlevelse.

En mangel ved studien er den manglende undersøkelsen av kodon 25 varianten, rs1800471. En mulig løsning for å avklare situasjonen i forhold til kodon-25 varianten kan være å sekvensere genet i en ny studie. Videre studier er nødvendige for å avklare om polymorfismer i *TGFβ* kan påvirke sykdomsprogresjonen. Det må antas at effekten av de undersøkte polymorfismene i så fall må være små da det ikke har gjort utslag i denne studien.

KONKLUSJON

Genetisk variasjon i *TGFβ* påvirker ikke sykdomsrisiko eller sykdomsprogresjonen ved PSC. Det er ingen økt forekomst polymorfismer i *TGFβ* hos PSC pasientene i forhold til kontrollpopulasjonen. Det er heller ingen signifikant påvirkning av overlevelse for affiserte individer med de ulike polymorfismene.

Det kan være grunn til å undersøke andre gener relatert til *TGFβ*, som *SMAD 2,3,4*, eventuelt reseptorer for å kartlegge andre varianter som påvirker sykdomsprogresjonen sekundært til *TGFβ* stimulering.

REFERANSER

1. Burt AD, Portmann BC, Ferrel LD. *MaxSweens's Patohology of the Liver*. ISBN 0-433-10012-8, Elsevier; 2007:85 - 88.
2. Ludvig J BSS, LaRusso NF, Elveback LR, Wiesner RH, McCall JT. Morphological features of chronic hepatitis associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis. *Hepatology*. 1981;1:632-639.
3. Cullen S CR. Aetiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001;15:577-589.
4. Chapman RW ABA, Rhodes JM, Summerfield JA, Dick R, Scheuer PJ, Sherlock S. Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology. *Gut*. 1980;21:870-877.
5. Cullen SN CRW. Review article: current management of primary sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;21:933-948.
6. Brandsaeter B FS, Broome U, Isoniemi H, Olausson M, Backman L, Hansen B, Schrupf E, Oksanen A, Ericzon BG, Hockerstedt K, Makisalo H, Kirkegaard P, Bjoro K. Outcome following liver transplantation for primary sclerosing cholangitis in the Nordic countries. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38:1176-1183.
7. Boberg KM AE, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:99-103.
8. Schrupf E BKM. Epidemiology of primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001;15:553-562.
9. Fausa O SE, Elgjo K. Relationship of inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Semin Liver Dis*. 1991;11:31-39.
10. Loftus EV J, Harewood GC, Loftus CG, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Jewell DA, Sandborn WJ. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2005;54:91-96.
11. Saarinen S OO, Broome U. Increased frequency of autoimmune diseases in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:3195-3199.
12. Bergquist A EA, Olsson R, Kornfeldt D, Loof L, Danielsson A, Hultcrantz R, Lindgren S, Prytz H, Sandberg-Gertzen H, Almer S, Granath F, Broome U. Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatology*. 2002;36:321-327.
13. Bergquist A, Montgomery SM, Bahmanyar S, Olsson R, Danielsson A, Lindgren S, Prytz H, Hultcrantz R, Lööf LA, Sandberg-Gertzén H, Almer S, Askling J, Ehlin A, Ekbohm A. Increased risk of primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis in first-degree relatives of patients with primary sclerosing cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;9:939-943.
14. Donaldson PT NS. Immunogenetics in PSC. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001;15:611-627.
15. Boberg KM SA, Rocca G, Egeland T, Saarinen S, Mitchell S, Broome U, Chapman R, Olerup O, Pares A, Rosina F, Schrupf E. The HLA-DR3,DQ2 heterozygous genotype is associated with an accelerated progression of primary sclerosing cholangitis. *Scand J Gastroenterology*. 2001;36:886-890.
16. Wiencke K SA, Schrupf E, Boberg KM. Primary sclerosing cholangitis is associated to an extended B8-DR3 haplotype including particular MICA and MICB alleles. *Hepatology*. 2001;34:625-630.
17. Donaldson PT NS. Evaluation of the role of MHC class II alleles, haplotypes and selected amino acid sequences in primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity*. 2002;35:555-564.
18. Schrupf E FO, Forre O, Dobloug JH, Ritland S, Thorsby E. HLA antigens and immunoregulatory T cells in ulcerative colitis associated with hepatobiliary disease. *Scand J Gastroenterology*. 1982;17:187-191.
19. Colhoun HM MPM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*. 2003;361:865-872.
20. Guicciardi ME GGJ. Cholestatic hepatocellular injury: what do we know and how should we proceed. *J Hepatology*. 2005;42:297-300.
21. Karlsen TH LBA, Frøyslie KF, Thorsby E, Schrupf E, Boberg KM. Polymorphisms in the steroid and xenobiotic receptor gene influence survival in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. In press
22. Fiorucci S AE, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2004;127:1497-1512.
23. Wright MC. The impact of pregnane X receptor activation on liver fibrosis. *Biochem Soc Trans*. 2006;34:1119-1123.
24. TA W. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:583-594.
25. Burt AD, Portmann BC, Ferrel LD. *MaxSweens's Patohology of the Liver*. ISBN 0-433-10012-8, Elsevier; 2007:92 - 105.
26. Schiff ER, Sorrel MF, Maddry WC. *Schiff's Diseases of the Liver*. 0-781-760040-2, Lippincott Williams & Wilkins; 2007:395 411.
27. Andus T ea. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology*. 1991;13:364-375.
28. Simpson KJ ea. Cytokines in the liver. *J Hepatology*. 1997;27:1120-1132.
29. Parks WC WCL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:617-629.
30. Burt AD, Portmann BC, Ferrel LD. *MaxSweens's Patohology of the Liver*. ISBN 0-433-10012-8, Elsevier; 2007:40 - 42
31. Burt AD, Portmann BC, Ferrel LD. *MaxSweens's Patohology of the Liver*. ISBN 0-433-10012-8, Elsevier; 2007:549 - 557.
32. Medical Library, University of Utah. *Microscopy picture of sclerosing cholangitis*. 2008
33. Bouma G SW. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunology*. 2003;3:521-533.
34. Tjandra K SKA, Swain MG. Progressive development of a Th1-type hepatic cytokine profile in rats with experimental cholangitis. *Hepatology*. 2000;31:280-290.
35. Cullen S CR. Primary sclerosing cholangitis. *Autoimmun Rev*. 2003;2:305-312.
36. Berg PA KR, Rocken M. Cytokines in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 1997;17:115-123.
37. Mitchell S CR, Fleming K. Enhanced cytokine mRNA expression in primary sclerosing cholangitis and autoimmune liver disease. *Gastroenterology*. 1997;112:A757 (Abstract).
38. Aoki CA DK, Kenny TP, Gershwin ME, Bowlus CL. Gene expression by PBMC in primary sclerosing cholangitis: evidence for dysregulation of immune mediated genes. *Clin Dev Immunol*. 2006;13:265-271.

39. Bansal AS TA, Steadman C, Le Gros G, Hogan PG, Kerlin P, Lynch S, Strong R. Serum levels of interleukins 8 and 10, interferon gamma, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and soluble CD23 in patients with primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity*. 1997;26:223-229.
40. Bo X BU, Remberger M, Sumitran-Holgersson S. Tumour necrosis factor alpha impairs function of liver derived T lymphocytes and natural killer cells in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2001;49:131-141.
41. Spengler U MA, Jung MC, Messer G, Zchoval R, Hoffmann RM, Eisenburg J, Paumgartner G, Riethmuller G, Weiss EH, et al. T lymphocytes from patients with primary biliary cirrhosis produce reduced amounts of lymphotoxin, tumor necrosis factor and interferon-gamma upon mitogen stimulation. *J Hepatology*. 1992;15:129-135.
42. Smyth MJ JRW. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech*. 2000;50:196-208.
43. Mitchell SA GJ, Spurkland A, Boberg KM, Fleming KA, Day CP, Schrupf E, Chapman RW. Association of the tumour necrosis factor alpha -308 but not the interleukin 10 -627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gut*. 2001;49:288-294.
44. Candore G LD, Colonna Romano G, Caruso C. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmun Rev*. 2002;1:29-35.
45. Seyhan H HJ, Wiercinska E, Gressner AM, Mertens PR, Kopp J, Horch RE, Breitkopf K, Dooley S. Liver fibrogenesis due to cholestasis is associated with increased Smad7 expression and Smad3 signaling. *J Cell Mol Med*. 2006;10:922-932.
46. Breitkopf K GP, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGFbeta/Smad signaling in the injured liver. *Gastroenterology*. 2006;44:57-66.
47. Popov Y PE, Fickert P, Trauner M, Schuppan D. Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatology*. 2005;43:1045-1054.
48. Cameron RG BLM, Neuman MG. Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis. *Clin Biochem*. 2001;34:195-201.
49. Karrar A BU, Sodergren T, Jaksch M, Bergquist A, Bjornstedt M, Sumitran-Holgersson S. Biliary Epithelial Cell Antibodies Link Adaptive and Innate Immune Responses in Primary Sclerosing Cholangitis. *Gastroenterology*. 2007
50. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115:209-218.
51. Gressner AM WR. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGFbeta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*. 2006;10:76-99.
52. Breitkopf K HS, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGFbeta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29:121S-131S.
53. Liu X HH, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGFbeta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int*. 2006;26:8-22.
54. RJ A. TGF beta signaling in health and disease. *Nat Genet*. 2004;36:790-792.
55. Blobel GC, Scgiemann WP, HF L. Role of Transforming Growth Factor B in Human Disease. *New England Journal of Medicine*. 2004;342:1350-1358.
56. Mak TW, Saunders M. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*. Elsevier; 2006:501, 502.
57. Rubstov YP, Rudensky AY. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7:443-453.
58. Neurath MF, Becker C, Barbutescu K. Role of NF-kB in immune and inflammatory responses in the gut. *PLOS Biology*. 2007;43:856-860.
59. Kim LK, et al. Down-Regulation of NF-kB Target Genes by the AP-1 and STAT Complex during the Innate Immune Response in *Drosophila*. *PLOS Biology*. 2007;5:e247.
60. Drumm ML KMW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1443-1453.
61. Jacolot S LGG, Scotet V, Quere I, Mura C, Ferec C. HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood*. 2004;103:2835-2840.
62. Le Gac G SV, Ka C, Gourlaouen I, Bryckaert L, Jacolot S, Mura C, Ferec C. The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Hum Mol Genet*. 2004;13:1913-1918.
63. Abdalian R HEJ. Sclerosing cholangitis: a focus on secondary causes. *Hepatology*. 2006;44:1063-1074.
64. Brazova J SK, Vavrova V, Bartosova J, Macek M, Jr., Lauschman H, Sediva A. Polymorphisms of TGFbeta1 in cystic fibrosis patients. *Clin Immunol*. 2006;121:350-357.
65. Osterreicher CH SF, Brenner DA. Genomics of liver fibrosis and cirrhosis. *Semin Liver Dis*. 2007;27:28-43.
66. Watanabe Y KA, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Ishikawa M, Niikawa N, Yoshiura K. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1) and its signaling pathway. *J Hum Genet*. 2002;47:478-483.
67. Shah R RB, Hurley CK, Posch PE. Allelic diversity in the TGFbeta1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. *Hum Genet*. 2006;119:61-74.
68. Grainger DJ HK, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 1999;8:93-97.
69. Yamada Y MA, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*. 1998;13:1569-1576.
70. Suthanthiran M LB, Song JO, Ding R, Sharma VK, Schwartz JE, August P. Transforming growth factor-beta 1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3479-3484.
71. Dunning AM EPD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, Luben RN, Chang-Claude J, Mannermaa A, Kataja V, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Metcalfe JC. A transforming growth factor-beta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2003;63:2610-2615.
72. Wiencke K LAS, Spurkland A, Vatn M, Schrupf E, Boberg KM. Association of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter polymorphisms with clinical subsets of Norwegian primary sclerosing cholangitis patients. *J Hepatol*. 2004;41:209-214.

73. De la Vega FM LKD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNplex Genotyping System. *Mutat Res.* 2005;573:111-135.
74. Kruglyak L NDA. Variation is the spice of life. *Nat Genet.* 2001;27:234-236.
75. ABI. TaqMan® SNP Genotyping Assays - Protocol. Applied Biosystems; 2004
76. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. ISBN 0-471-38415-1, BIOS Scientific Publishers Ltd; 2001:545, 549, 551, 553.
77. Consortium TIH. A Haplotype of the Human Genome. *Nature.* 2005;437:1299-1320.
78. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. ISBN 0-412-27630-5, Chapman & Hall/CRC;1991;268.
79. DG Kleinbaum MK. *Survival analysis: A self-learning text*. ISBN 0-387-23918-9, Springer; 2005:48 68.
80. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. ISBN 0-412-27630-5, Chapman & Hall/CRC; 1991:368 to 371.
81. RN Forthofer ESL, M Hernandez. *Biostatistics: A guide to Design, Analysis, and Discovery*. ISBN 0-123-69492-2 Elsevier; 2007:414.
82. DG Kleinbaum MK. *Survival analysis: A self-learning text*. ISBN 0-387-23918-9, Springer; 2005:103 107.