



Corso di aggiornamento
(21 aprile-5 maggio-19 maggio 2012)



La Celiachia nel terzo millennio: dalla diagnosi alla terapia

ASPETTI GENETICI E STRATIFICAZIONE DEL RISCHIO

GENETICO

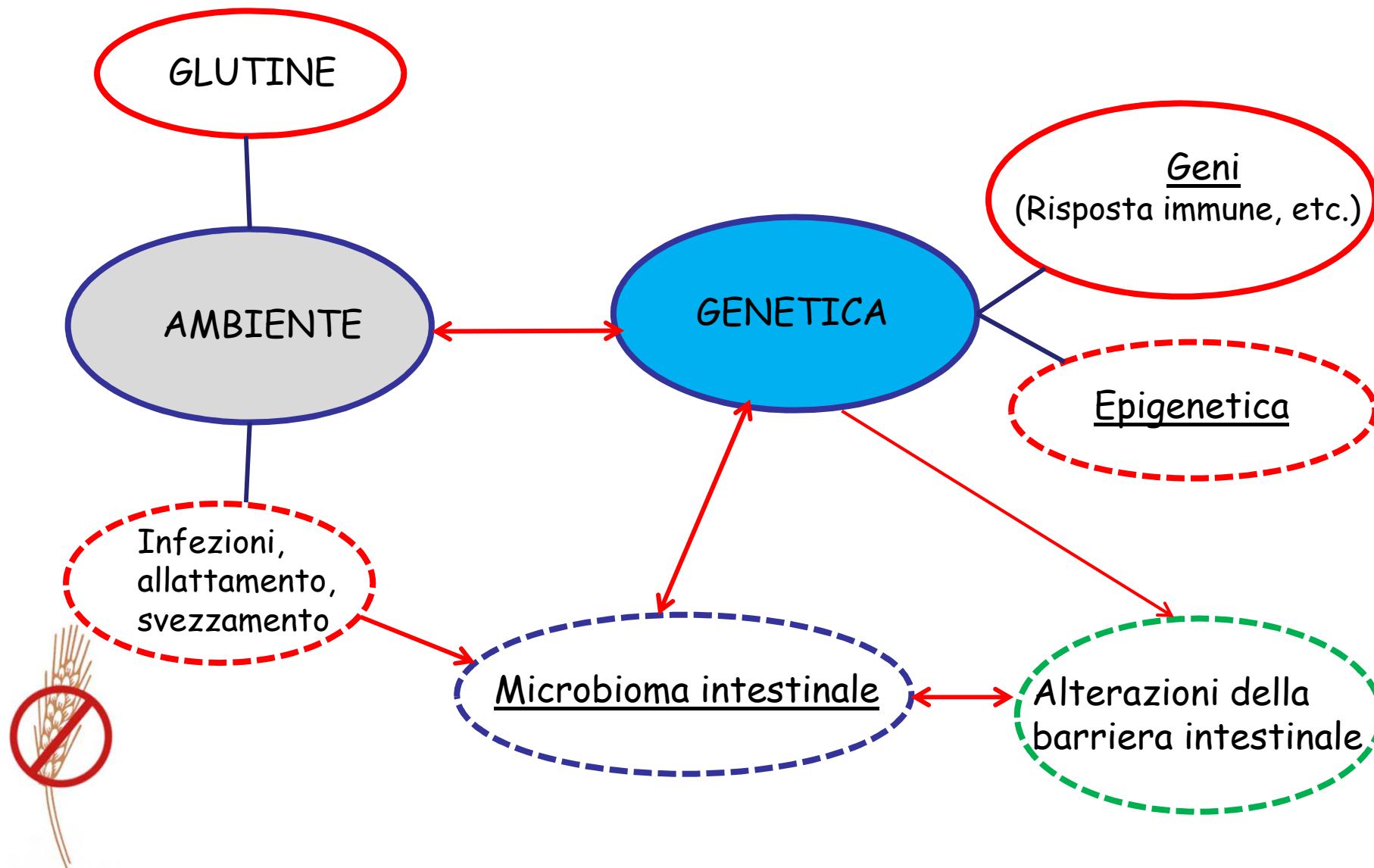
Caserta, 21 Aprile 2012

Lucia Sacchetti





Fattori di rischio per CD





Basi genetiche della malattia celiaca

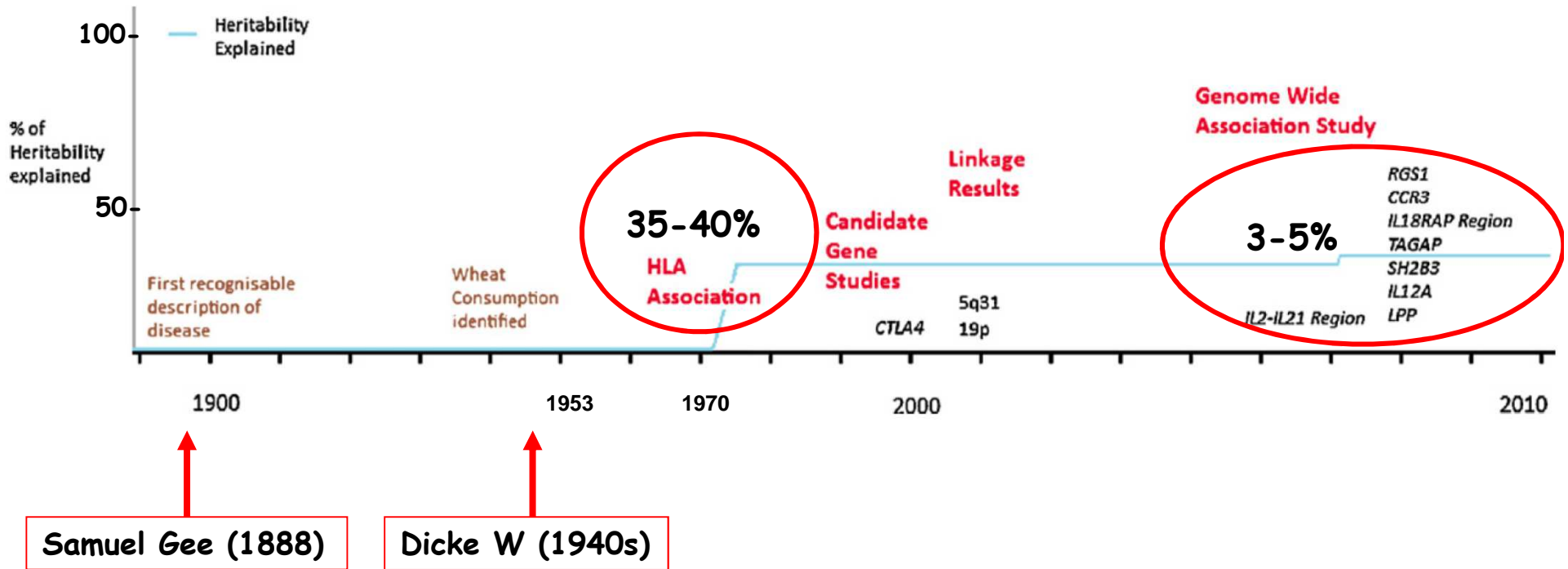
- Concordanza tra gemelli monozigoti 75-85%
- Concordanza tra gemelli dizigoti 11-16%
- Rischio di malattia nei familiari di 1° grado di un soggetto celiaco $\geq 10\%$



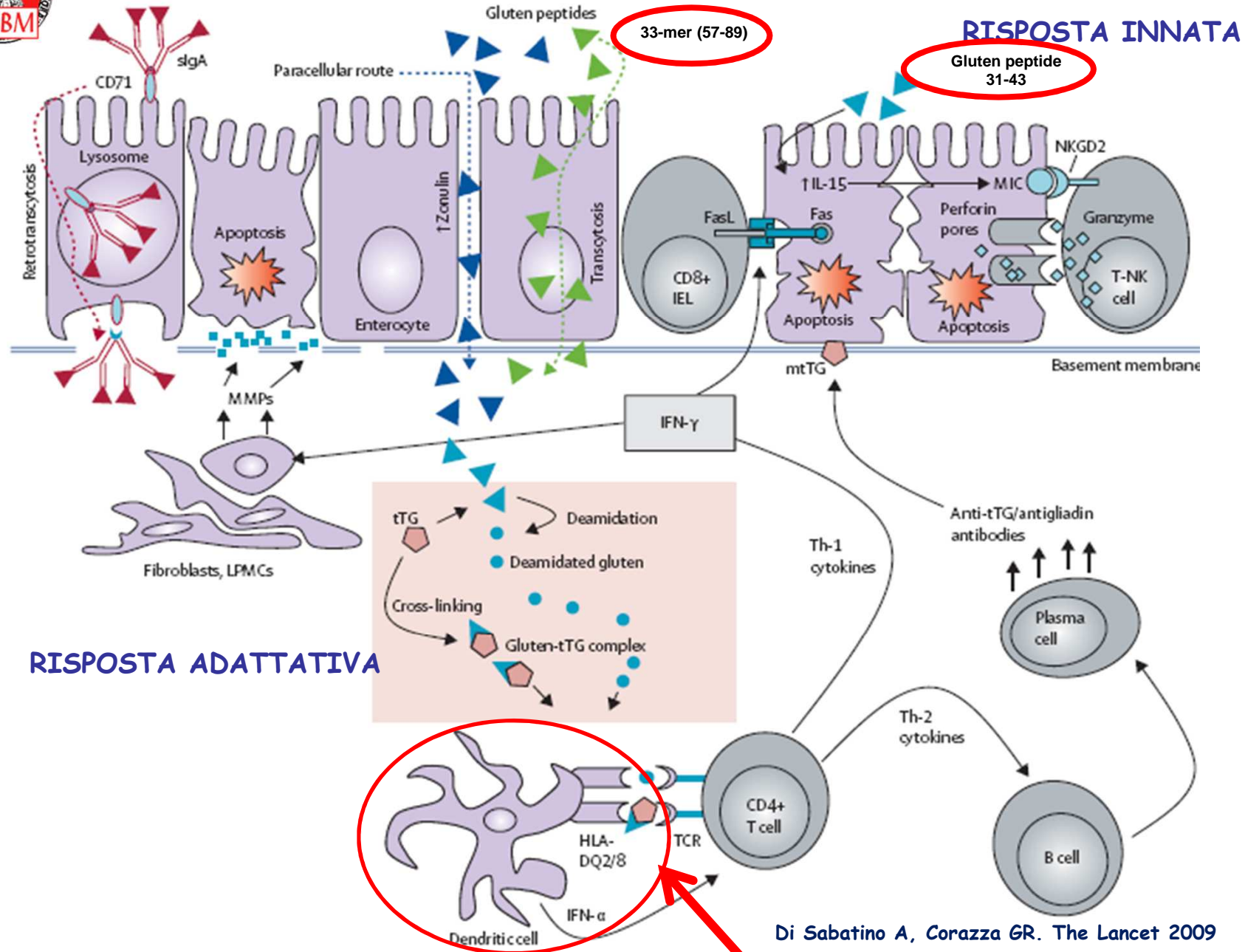
Greco L...Sacchetti...et al.Gut , 2002; Greco L...Sacchetti...et al.Gut , 2007,
Heap GA, van Heel DA. Seminars in Immunology , 2009



Coeliac disease heritability explained over the past 100 years



PATOGENESI DELLA CELIACHIA

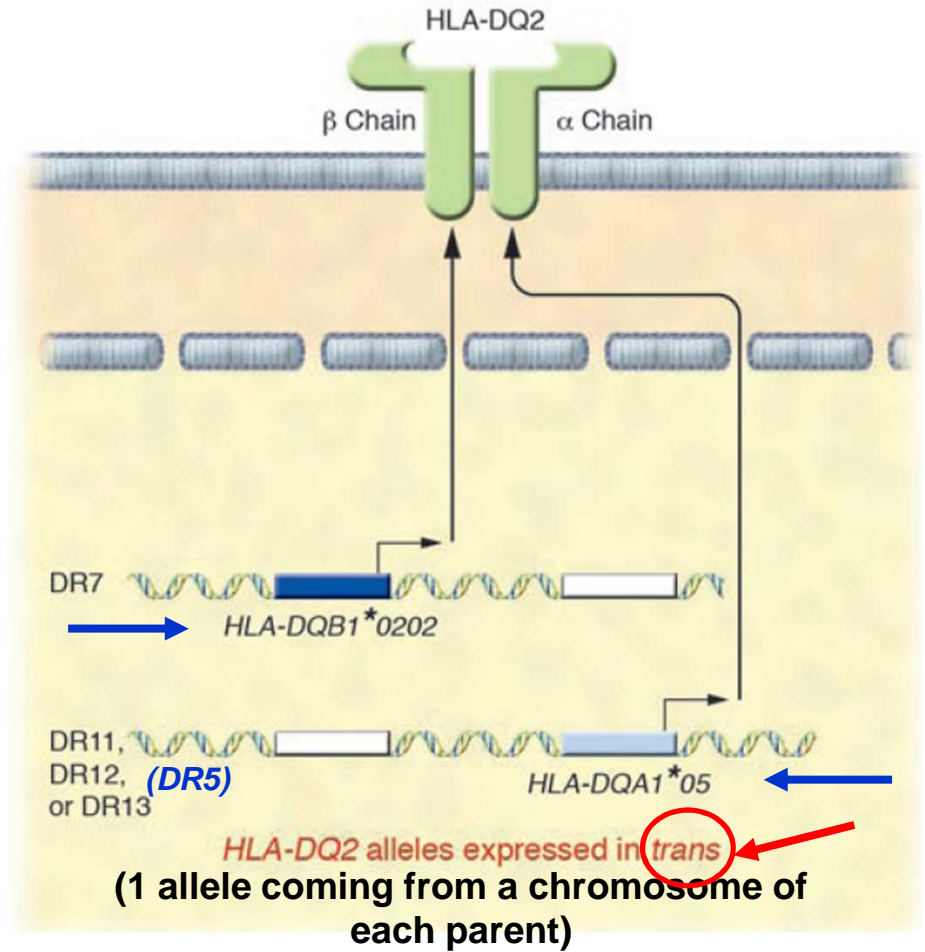
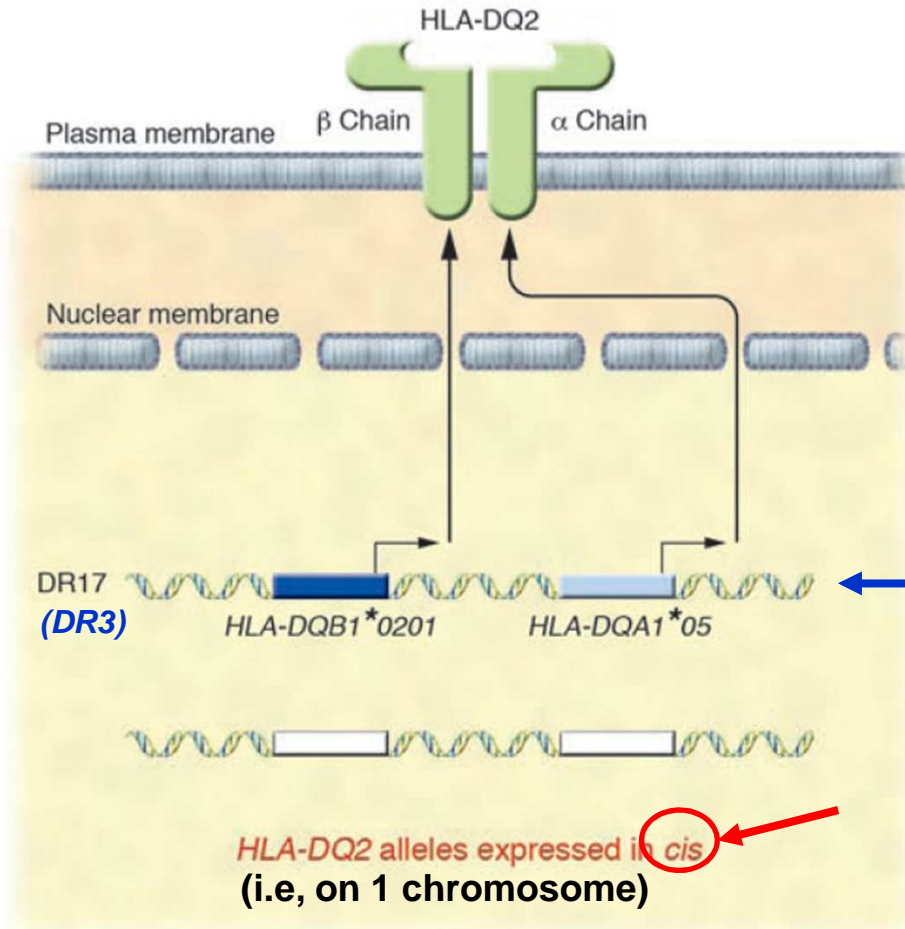


Di Sabatino A, Corazza GR. The Lancet 2009

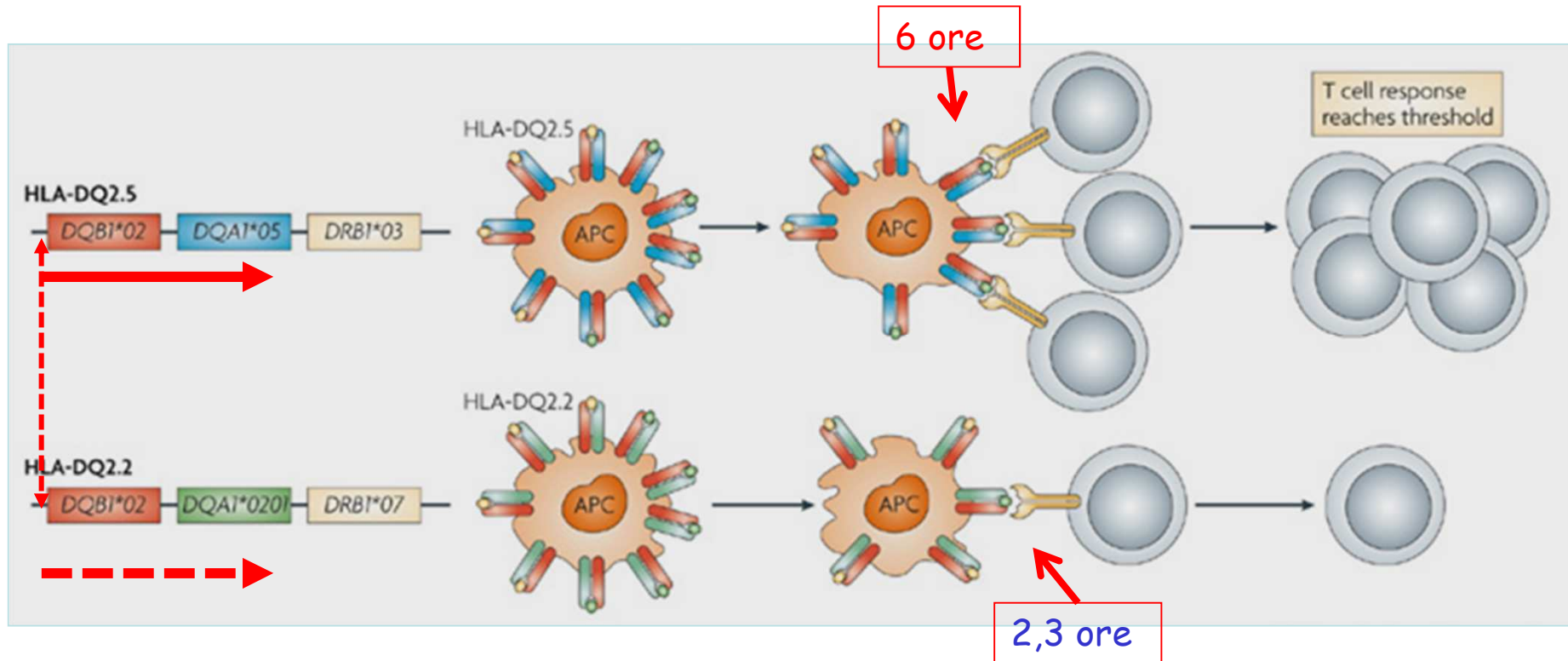


Geni HLA di classe II (DQ-DR-DP) (crom. 6) e associazione alla celiachia

HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*0201)- DR3



HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302)- DR4



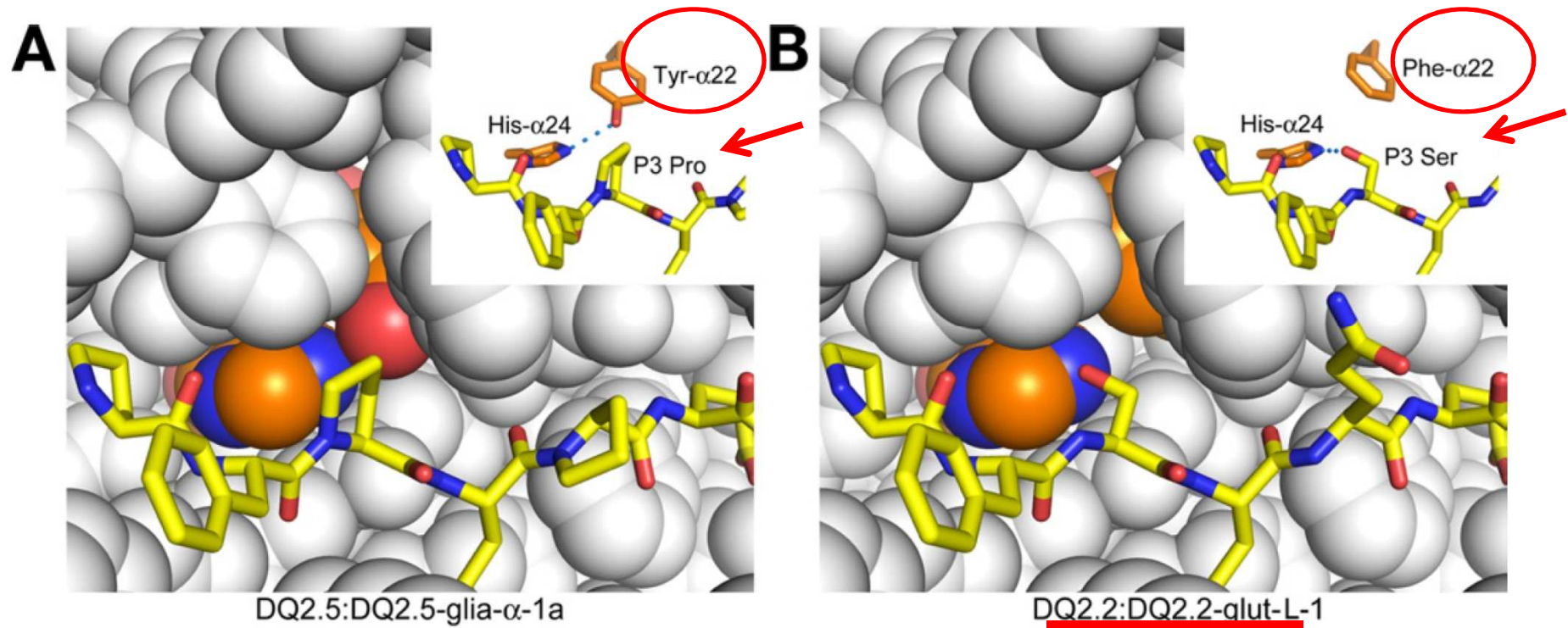
- Il DQ2.5 è un elevato fattore di rischio per CD
- Il DQ2.5 lega i peptidi gliadinici con una maggiore stabilità e consente una presentazione del peptide più protratta rispetto al DQ2.2, aumentando così la probabilità di raggiungere la soglia richiesta per l'attivazione delle cellule T

Catena alfa \neq (α -22: tirosina-fenilalanina)

Nat Immunol 2009



Ruolo della molecola DQ2.2 nel rischio di celiachia (4/7 pazienti DQ2.2 in assenza di DQ2.5 e/o DQ8)



Frequenza nei celiaci di DQ2.2 ~ 4-5%
(pochi peptidi del glutine legano stabilmente la molecola DQ2.2)

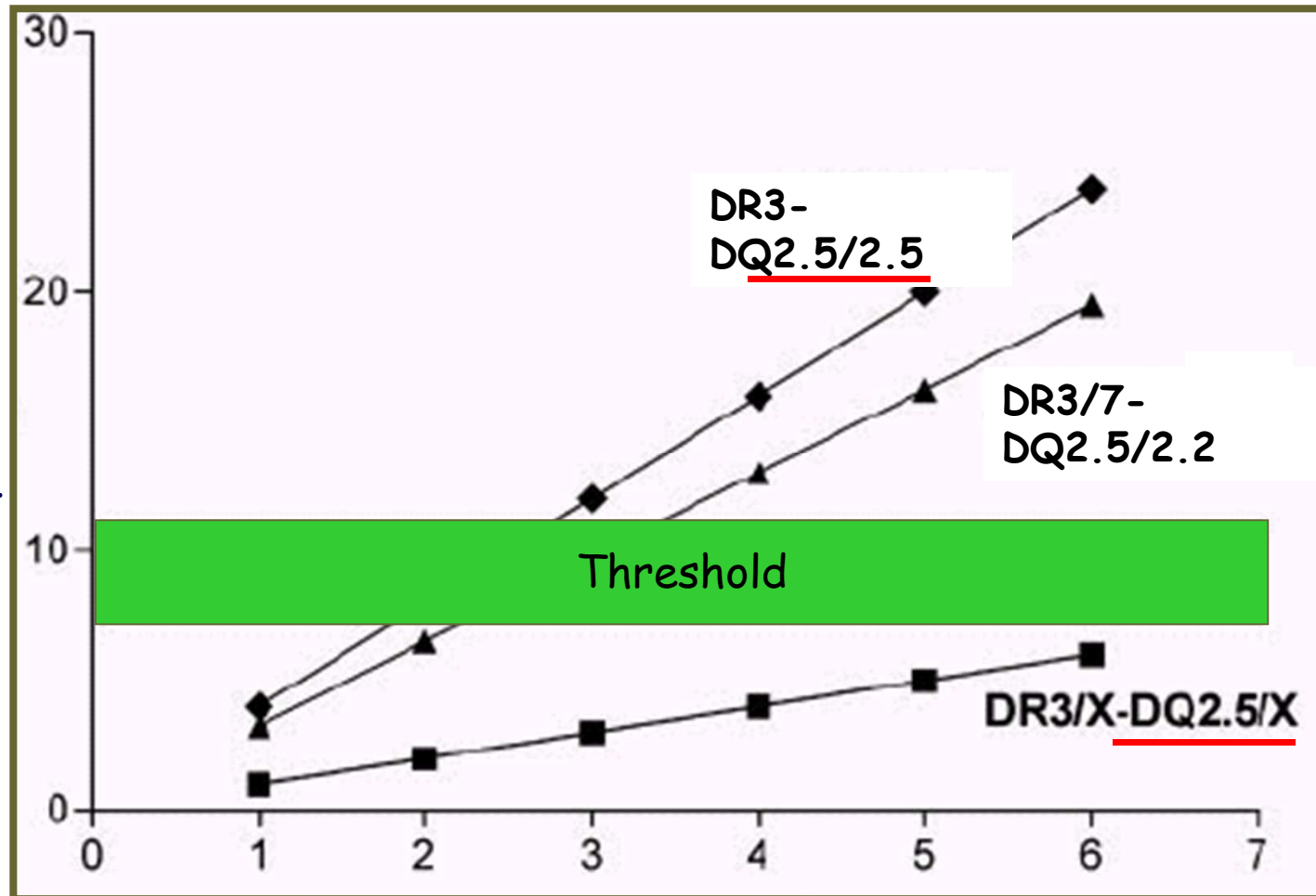
Gastroenterology, 2012



Modello quantitativo per lo sviluppo della celiachia



Number of HLA-DQ2-peptide complexes



Number of T cell stimulatory gluten peptides



Gli individui omozigoti DQ2.5/DQ2.5 o eterozigoti DQ2.5/DQ2.2 riescono a raggiungere più facilmente la soglia di immunocomplessi necessari per l'attivazione dei linfociti T



Rischio genetico di CD



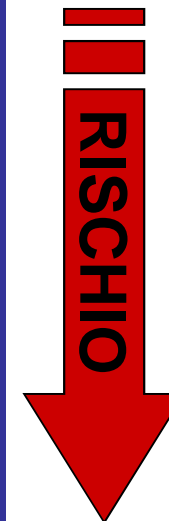
DQ 2.5 →

DQ 2.2 →

DQ 8 →

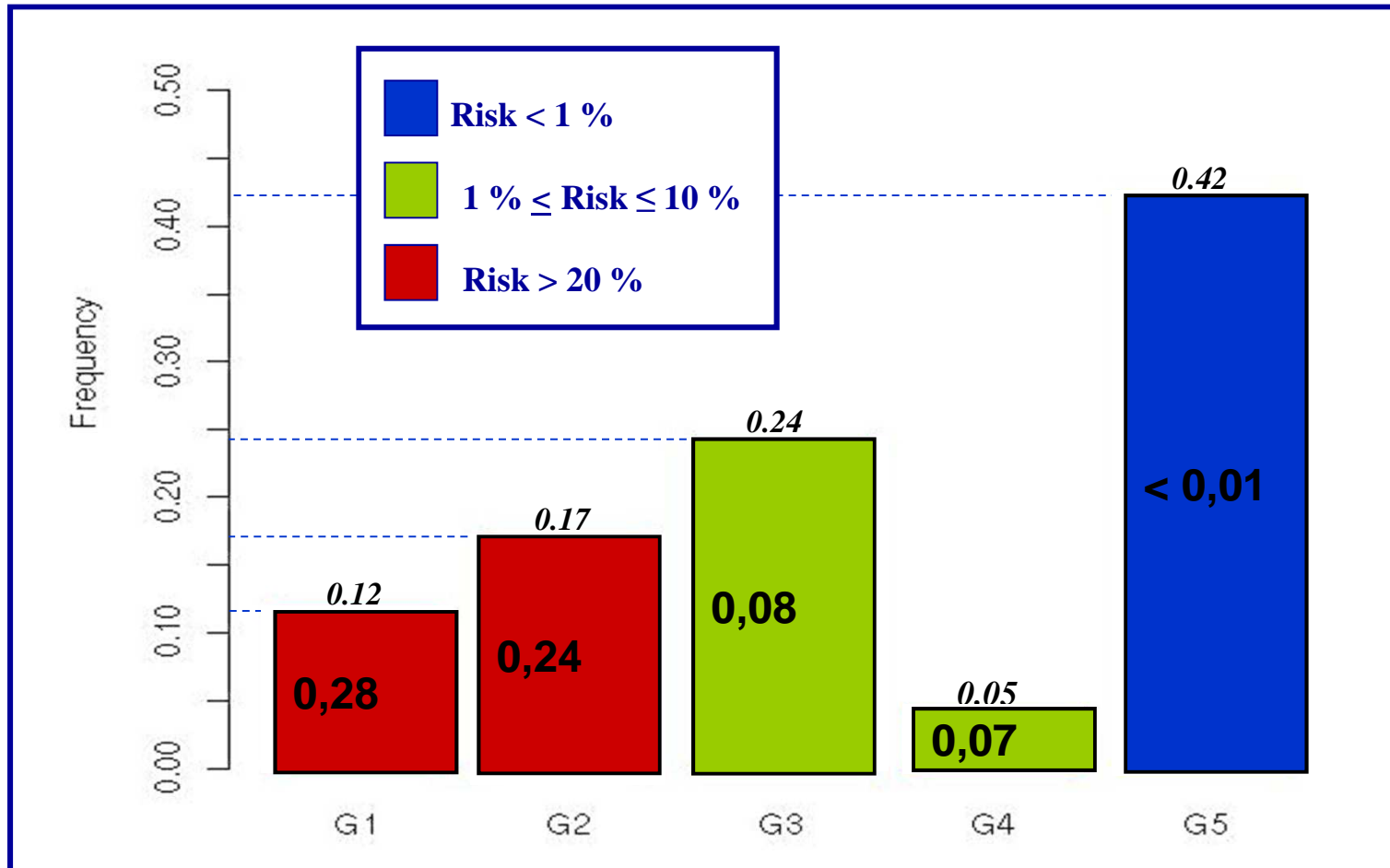
Aplotipo	Alleli DQA/DQB	Allele DR
H1	DQA1*05 –DQB1*0201	DR3
H2	DQA1*02 –DQB1*0202	DR7
H3	DQA1*05 –DQB1*03	DR5
H4	DQA1*0301 - DQB1*0302	DR4
H5	Altri	DRX

Gruppi di rischio	Genotipi
G1	H1/H1; H1/H2
G2	H2/H3
G3	H1/H3; H1/H4; H1/H5
G4	H2/H2; H2/H4; H4/H4
G5	Altri



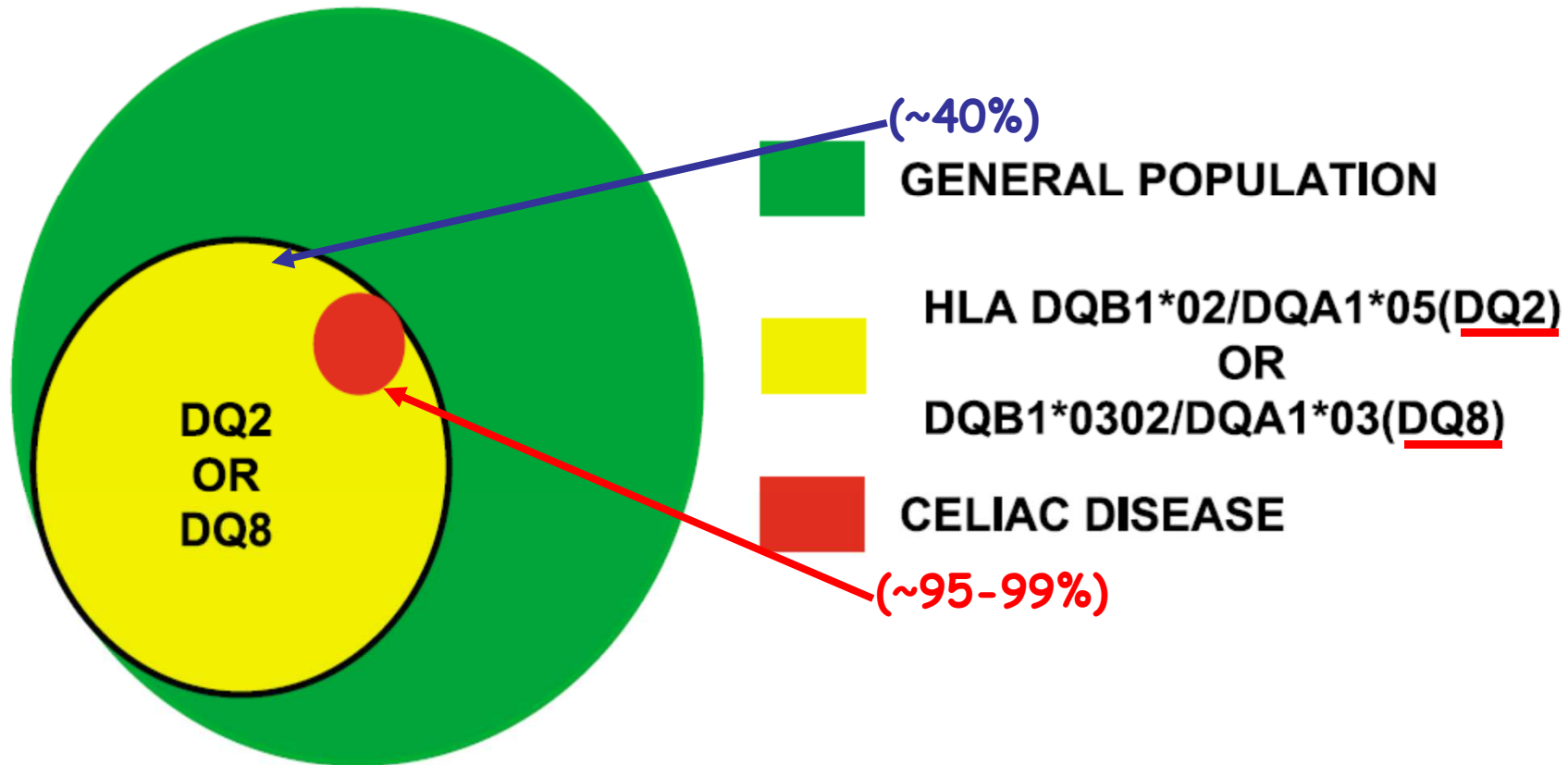


Rischio per un fratello di un probando sulla base del genotipo DQ presentato





Distribuzione delle molecole HLA-DQ2 e/o HLA-DQ8 nella popolazione generale e in quella dei celiaci (diagramma di Venn)



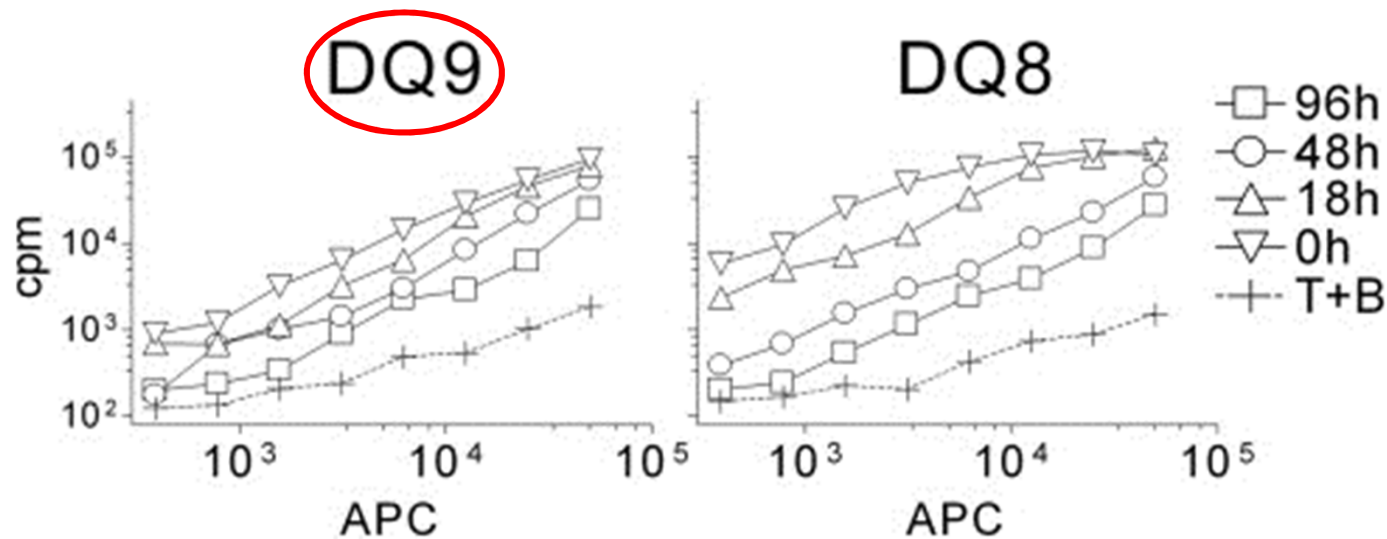
Assenza delle molecole HLA-DQ2 e/o DQ8=
alto valore predittivo negativo



Esistono altre molecole
HLA (non DQ2.5 o DQ8)
di rischio per celiachia ?



Alleli di rischio CD meno frequenti (paziente eterozigote HLA-DQ2.2/DQ9)



DQ9 lega l'antigene ed attiva i linfociti T in modo simile a DQ8
(Frequenza del DQ9 nella popolazione <1%)

DQ9 (DQA1*03/DQB1*0303) → B 57 aspartato

DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) → B 57 alanina





Tipizzazione HLA

Quando richiederla ?

- risultato sierologico e/o istologico ambiguo
- celiachia: potenziale, subclinica o asintomatica
- impossibilità ad eseguire biopsia intestinale
- screening di popolazioni a rischio (famiglie di Celiaci)

Che contributo offre al clinico?

- Supporto alla diagnosi (anti-TG2 > 10 times URL)
- Valutazione del rischio nei familiari di celiaci

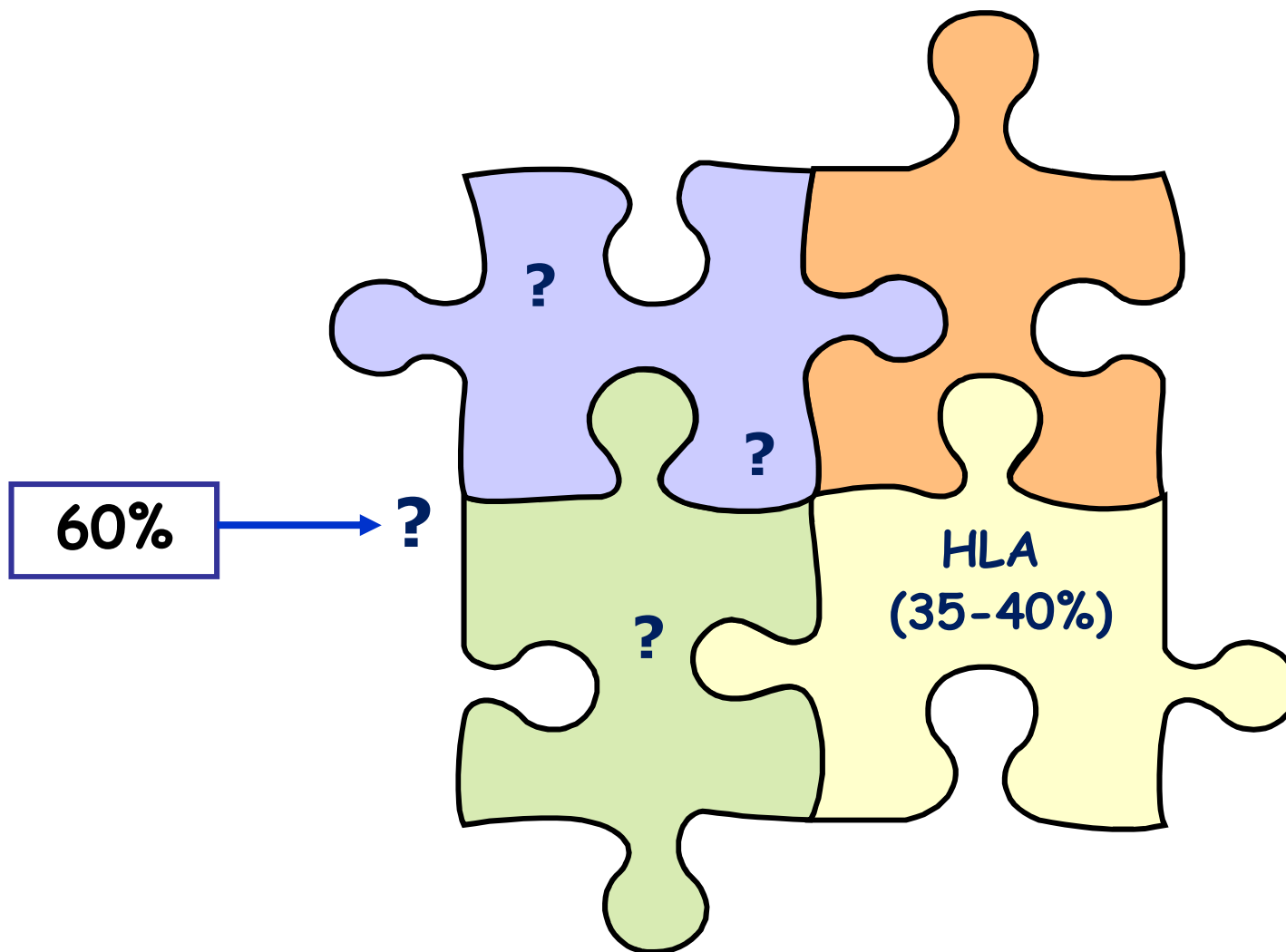
Cosa chiedere al laboratorio?

Presenza/assenza delle molecole HLA-DQ2 (2.5-DQ2.2)- DQ8 ed eventuale DR in linkage



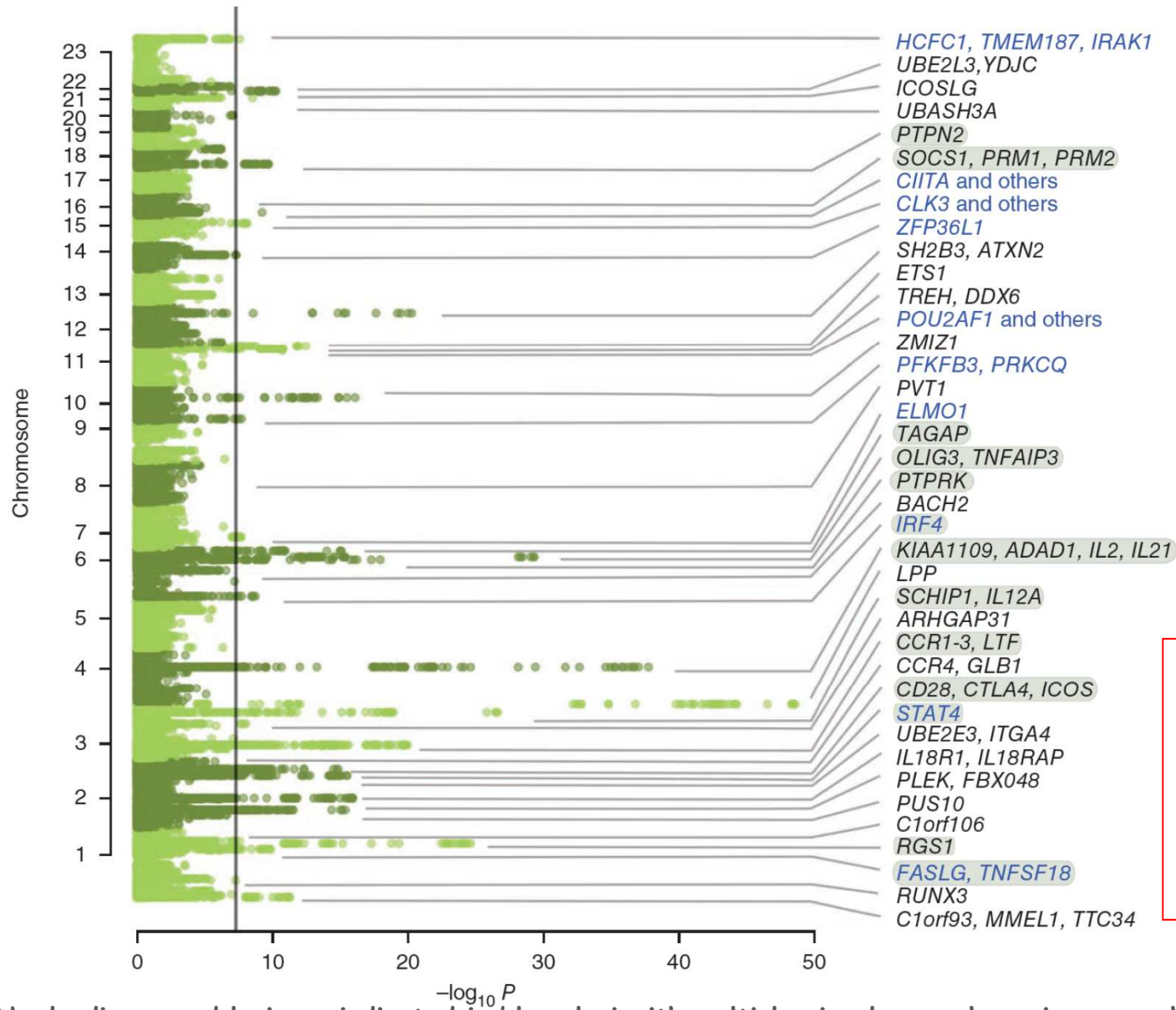


Componente genetica della celiachia





Genotipizzazione densa di loci non-HLA di rischio autoimmune



40
loci
(27+13)

Newly discovered loci are indicated in blue; loci with multiple signals are shown in a gray highlighted box. The significance threshold used was $P = 5 \times 10^{-8}$

Nature Genetics. 12 , 1193-1202 (2011)





Genotipizzazione Densa di loci genici associati alla celiachia (HLA e non-HLA)



- ✓ Studiati 12.041 soggetti CD e 12.228 controlli
- ✓ Caratterizzati 183 loci associati a malattie immunomediate emersi da altri studi (ImmunoChip, Illumina Infinium-High-Density-Array)
- ✓ 39/40 loci associati alla CD (spiegano il 13,7% della genetica)
- ✓ 36/39 loci non-HLA significativamente associati alla CD ($P < 5 \times 10^{-8}$) (MAF > 5% = varianti comuni)
- ✓ Molti dei loci contengono geni candidati con funzioni immunologiche
- ✓ Sono emerse molte varianti che possono avere una funzione regolatoria (localizzazione 3'UTR del gene o regione al 5' del gene)



Nature Genetics. 12 , 1193-1202 (2011)

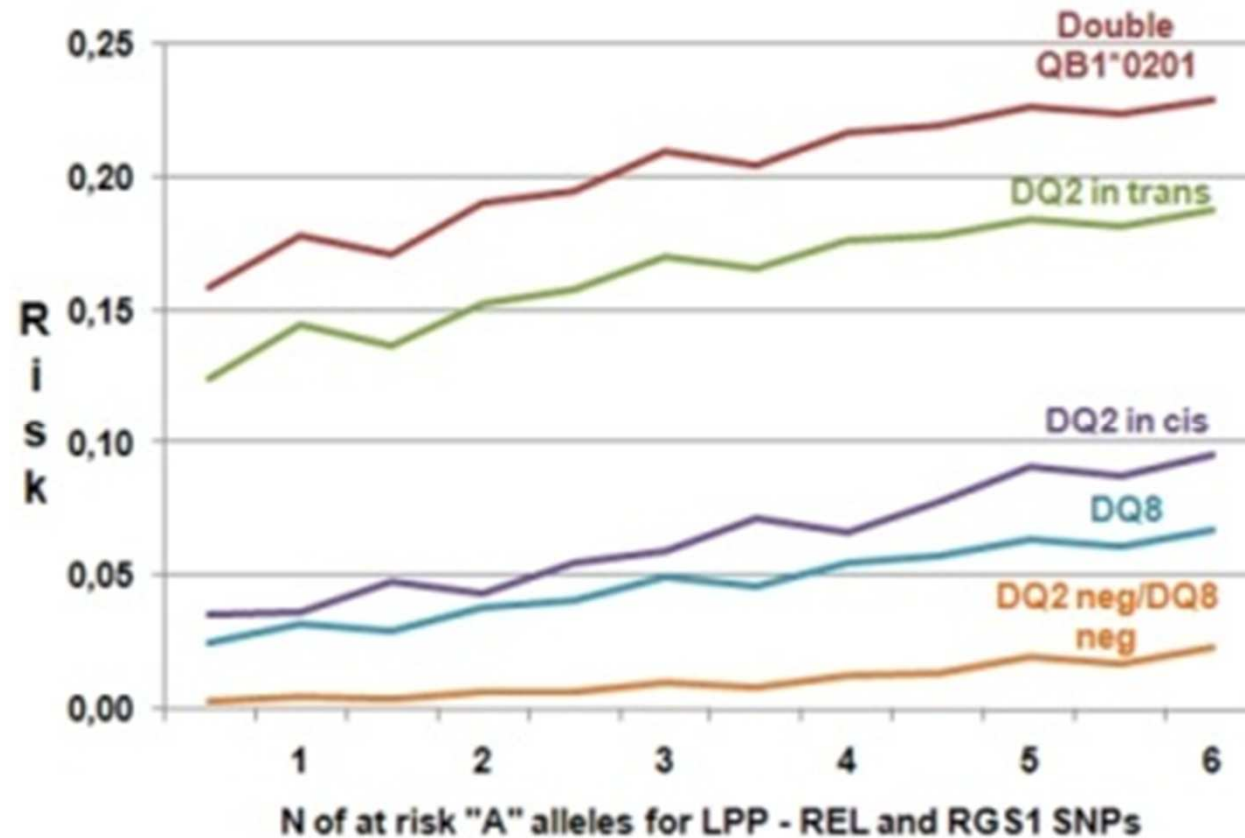
La stima del rischio di celiachia può migliorare tipizzando altri loci genici non-HLA?

- studio su 157 famiglie comprendenti almeno un soggetto affetto da CD
- Studiati 249 fratelli (follow up per un periodo di 6 anni)
- 29/249 fratelli hanno sviluppato la malattia durante lo studio
- Tutti sono stati tipizzati per 10 SNPs tra quelli maggiormente replicati da più studi
- 3 SNPs sono risultati fattori di rischio per CD:

-LPP	OR (CI) 2.36 (1.64-3.41)	p<0.001
-RGS1	OR (CI) 1.75 (1.07-2.86)	p=0.025
-REL	OR (CI) 1.66 (1.04-2.65)	p=0.034



Utilità della genotipizzazione di polimorfismi non-HLA nel calcolo del rischio di celiachia



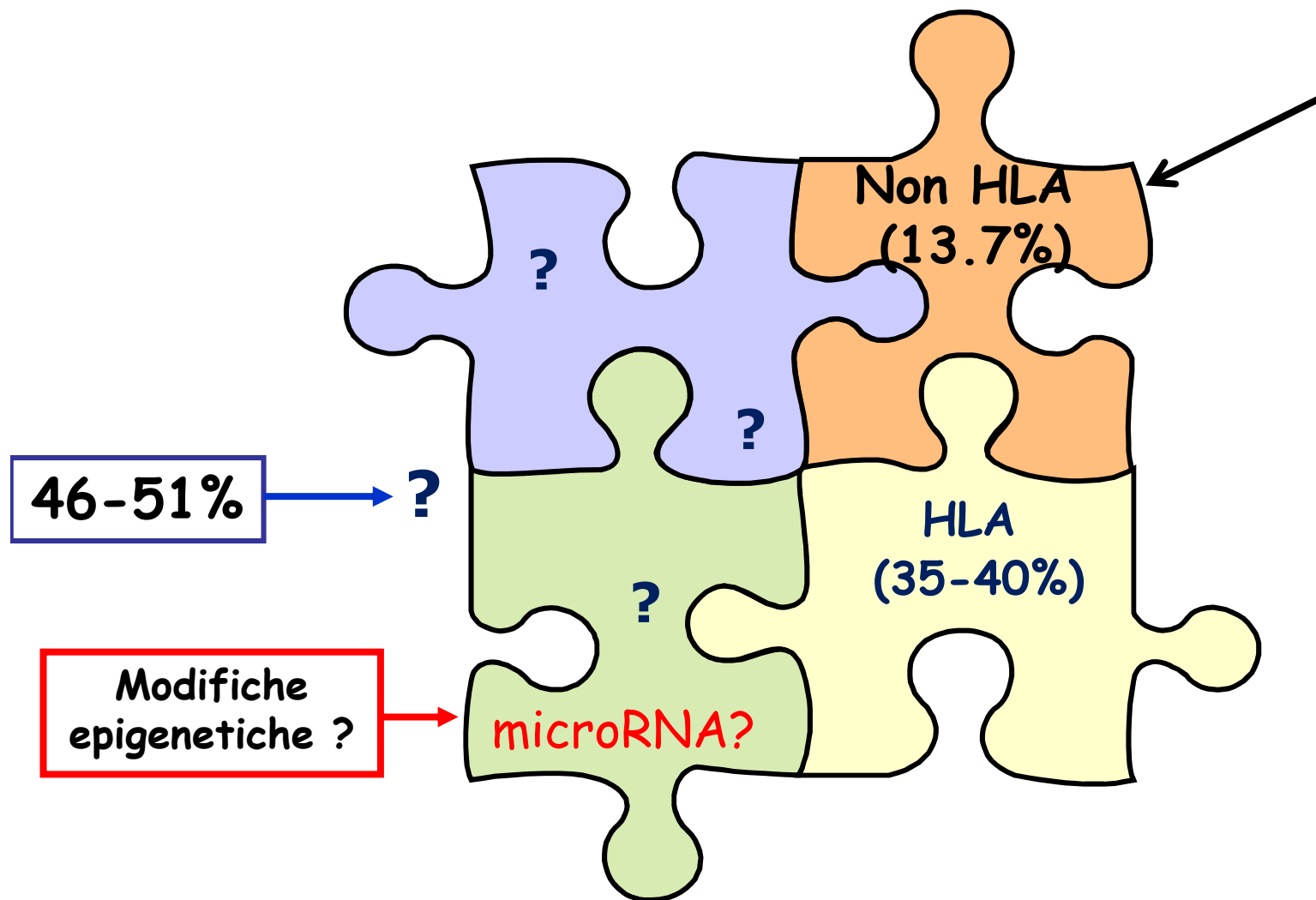


CNR2: Altro potenziale marcatore genetico di rischio di celiachia

- Recettore dei cannabinoidi tipo 2 (CB2)
- Gene CNR2 mappa sul crom 1 (1p36.11)
- La variante (Q63R) è associata alla celiachia
- A livello intestinale (immunoistochimica) CB2 è upregolata nei celiaci
- conferisce un rischio di 6 volte maggiore di malattia



Componente genetica della celiachia



Piccoli RNAs non codificanti (21-25 nucleotides)

Regolano l'espressione genica a livello posttrascrizionale (circa il 50% dei geni nell'uomo)

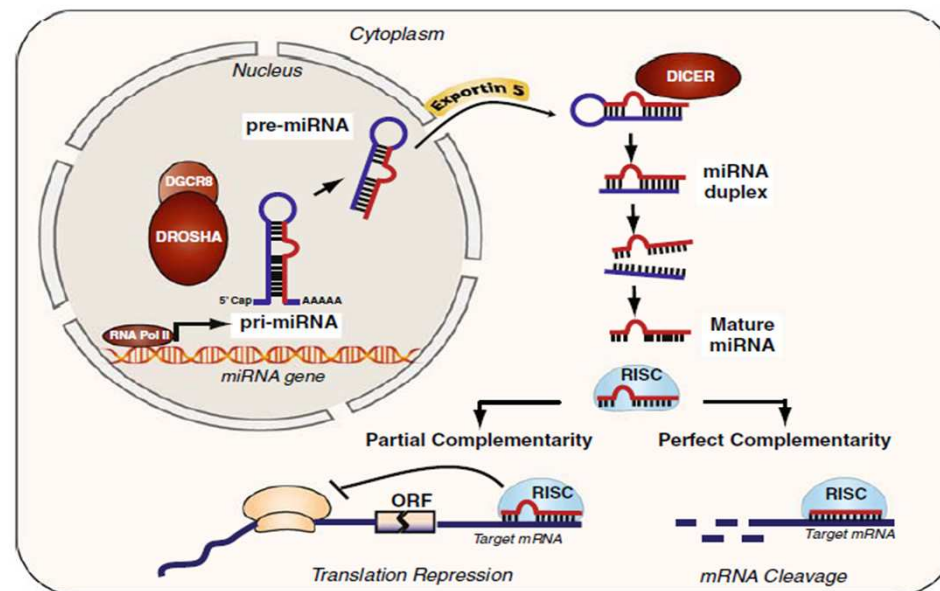
La loro espressione è tessuto specifica

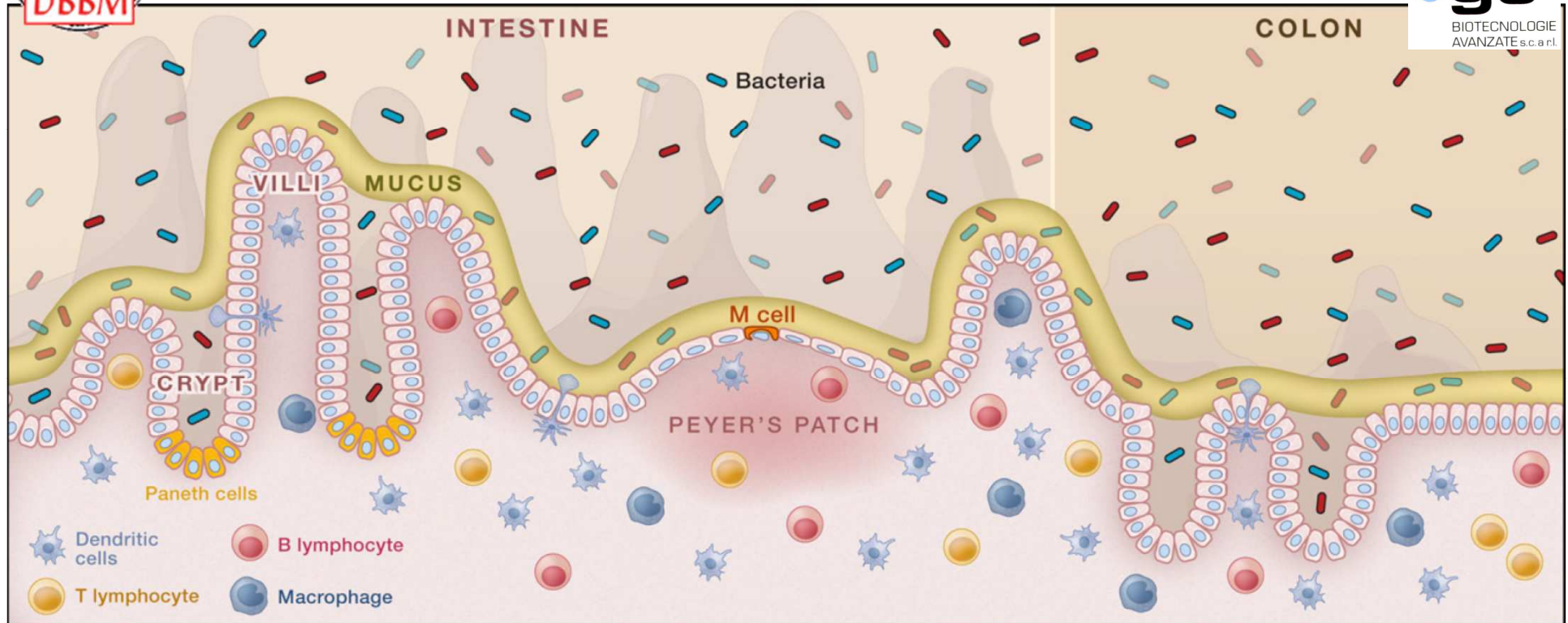
Nell'uomo i microRNAs sono stati associati a varie condizioni fisiologiche e patologiche

- Circa 20% di 360 miRNAs testati sono alterati nel soggetto celiaco (active CD e GFD)
- Alcuni di essi inducono una ridotta differenziazione delle cellule intestinali (goblet cell lineage)



Capuano M, Iaffaldano L, Greco L, Sacchetti L PLOS One (6)2011





- 10^{14} Cellule batteriche compongono il microbiota umano
- > 10 volte il numero delle cellule del corpo umano
- 10^{10} - 10^{11} cellule b. sono presenti nel tratto gastrointestinale : 10^4 - 10^5 nel duodeno, 10^6 - 10^7 nel digiuno, 10^7 - 10^8 (cellule/g) nell'ileo
- Si caratterizzano studiando la regione 16S dell'RNA ribosomale (regioni altamente conservate e altamente variabili)





Microbioma intestinale

- ✓ Il tipo di allattamento (al seno o artificiale) influenza la diversità e la prevalenza delle varie specie batteriche
- ✓ Bambini con rischio genetico alto (HLA) hanno una prevalenza di *Bacteroides vulgatus* rispetto a quelli a basso rischio e a quelli allattati al seno (Prevalenza di *B. uniformis*)
- ✓ Il genotipo HLA esercita un effetto sulla colonizzazione di queste specie che è indipendente dall'alimentazione e che può rappresentare un fattore di rischio per la celiachia
- ✓ La colonizzazione batterica è importante per la maturazione del sistema immune (animali germ free)
- ✓ *B. fragilis* (in vitro) attiva le cellule T CD4+





Gruppi di ricerca



CEINGE/DBBM

- Lucia Sacchetti
- Nadia Tinto
- Marina Capuano
- Laura Iaffaldano
- Valentina Capobianco
- Francesco Salvatore
- Valeria D'Argenio
- Giorgio Casaburi



Università Federico II Dip. PEDIATRIA/ELFID

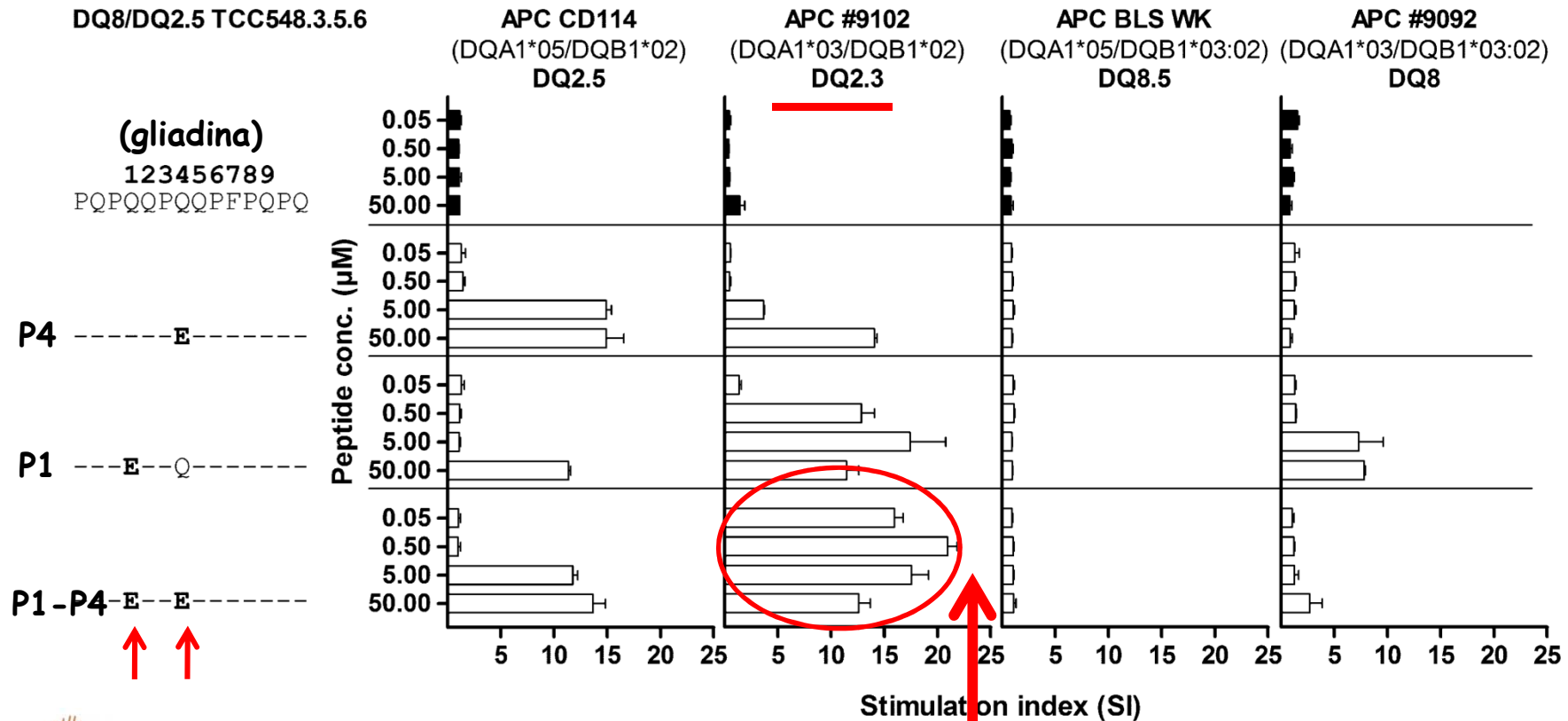
- Luigi Greco e coll.
- Riccardo Troncone

UNIVERSITA' DI SALERNO

- Carolina Ciacci e coll.

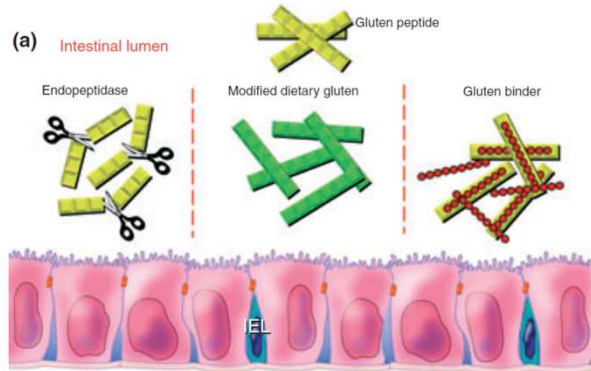


Studio funzionale della molecola HLA-DQ2.3 formata dal transdimero DQA1*0301/DQB1*0201 (↑ 5 volte rischio T1D)

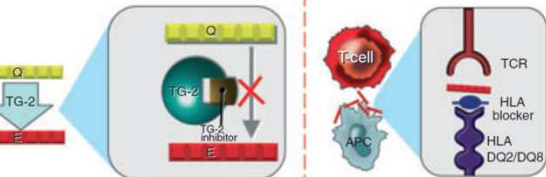
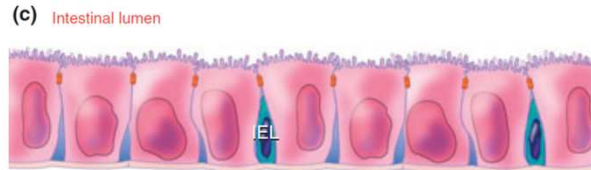


(DQ2.5) DQA1*0501 / **DQB1*0201** — **DQ2.3** (stabile)
 (DQ8) **DQA1*0301** / DQB1*0302

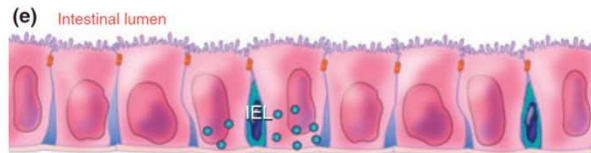
New therapeutic approaches for coeliac disease



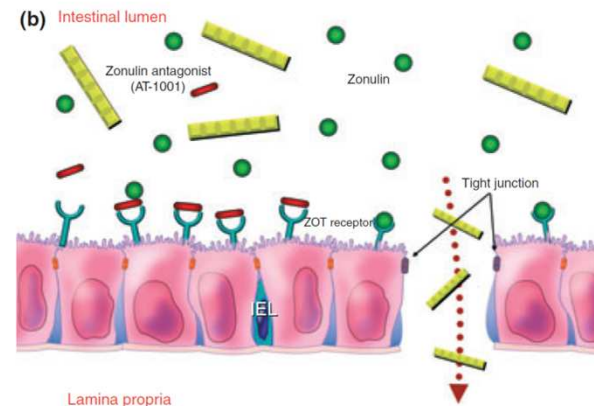
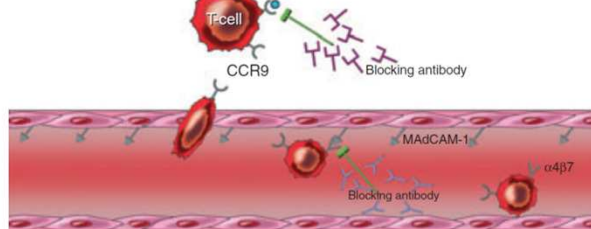
Lamina propria



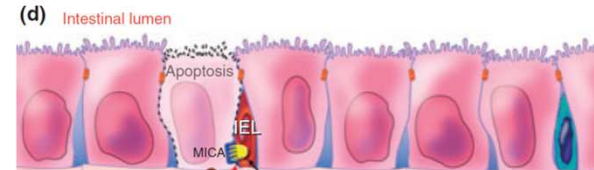
Lamina propria



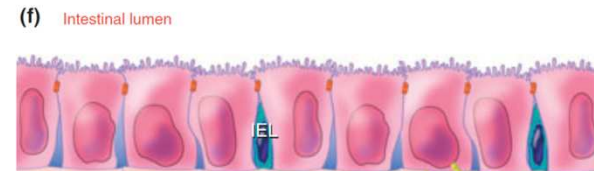
Lamina propria



Lamina propria



Lamina propria

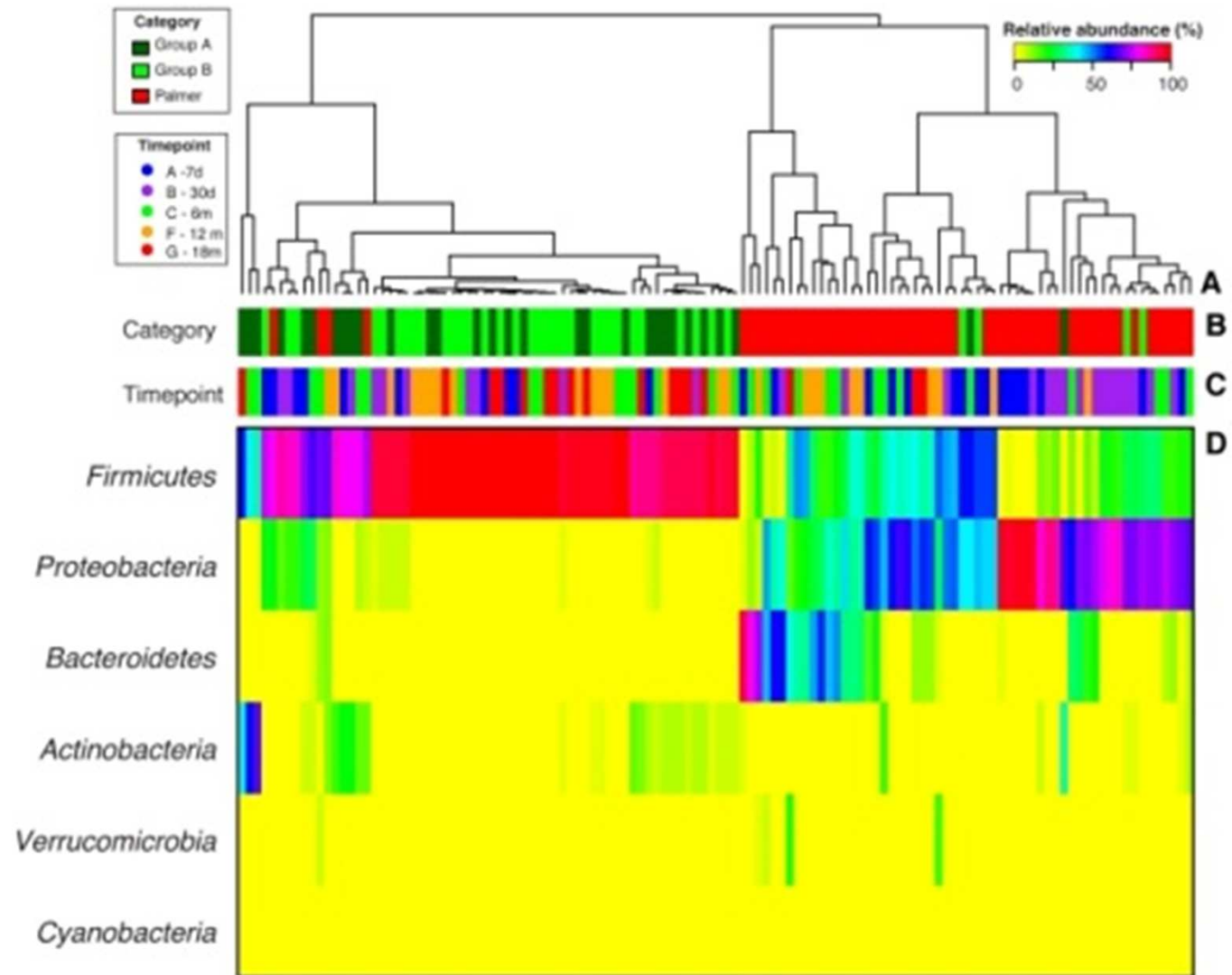


Lamina propria

Aliment Pharmacol Ther, 2012

New therapeutic approaches for coeliac disease

Underlying pathology	Therapeutic approach	Compound/Organism	Development stage
Immunodominant Gluten Peptides	Dietary Modification		
	Wheat Variants Non-immunogenic ancient wheat species Genetically modified harmless wheat strains		
	Gluten Detoxification Enzymatic cleavage of gluten fragments Inactivation by polymeric binders Probiotic preparation	Prolyl Endopeptidases P (HEMA-co-SS) Lactobacilli	Preclinical Preclinical/phase I clinical trial
Impaired Mucosal Barrier	Permeability inhibition and mucosal reconstruction		
	Zonulin/ZOT receptor Blockade Mitogenic compounds	AT-1001 R-spondin 1	Phase IIb clinical trial Phase III clinical trial for Crohn's Disease
Adaptive Immunity	Antigen Presentation Suppression		
	Tissue Transglutaminase 2 Inhibition HLA DQ2/DQ8 blockade	KCC009, L-682777	Preclinical Preclinical
Inflammatory Response	Cytokine therapy and Anti Inflammation		
	Anti Inflammatory compounds Regulatory Cytokines augmentation IL-10	Budesonide	Preclinical
	Inflammatory Cytokine blockade Antagonist peptides Anti INF- gamma Anti TNF -alpha Anti IL-15	Infliximab AMG 714	Preclinical Preclinical
Lymphocyte Recruitment	Adhesion Blockade		
	Anti $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1 Anti CCR9/CCL25	Natalizumab Ccx282-B,CCX025	Preclinical Preclinical
Overreactive Autoimmune Response	Immunomodulation		
	Tolerance Induction Gluten Vaccination Parasite Infection Chemotherapy and stem cell Transplant	Nexvax2 Necator Americanus	Phase I clinical trial Phase II clinical trial

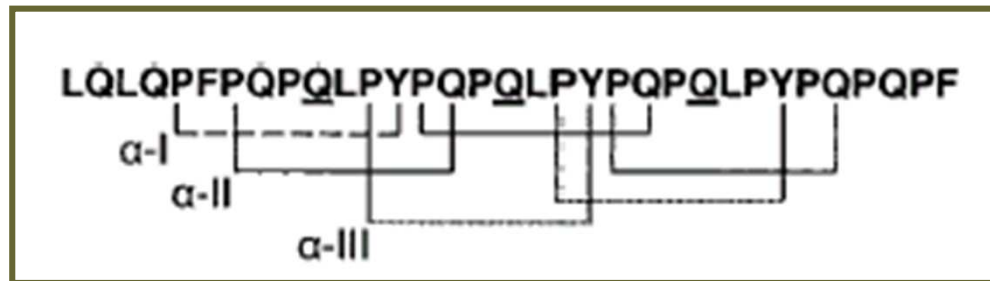




Celiachia: intolleranza a proteine del grano (glutine), segale, orzo



- Gliadine: famiglia di proteine del glutine (ricche in glutamina 35%, prolina 15% e AA idrofobici 19%)

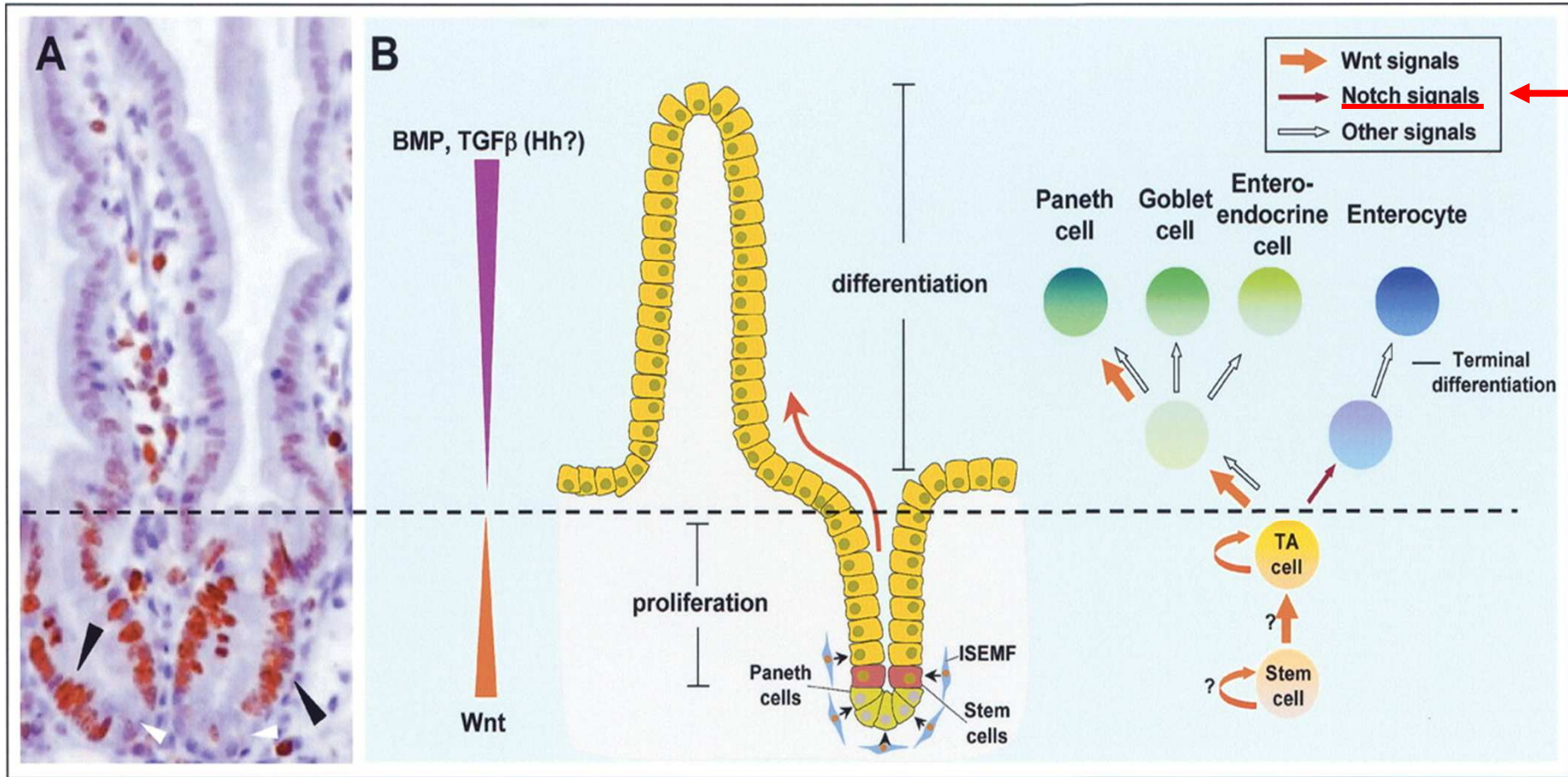


PEPTIDE GLIADINICO 33-MER (RESIDUI DA 57 A 89)E SUOI EPITOPI

- Non digerito da enzimi gastrici e pancreatici
- 3 epitopi delle gliadine sono riconosciuti da cellule T CD4+ di soggetti celiaci (bambini)
- Gli stessi epitopi sono substrati della tTGsi



Adult intestinal homeostasis





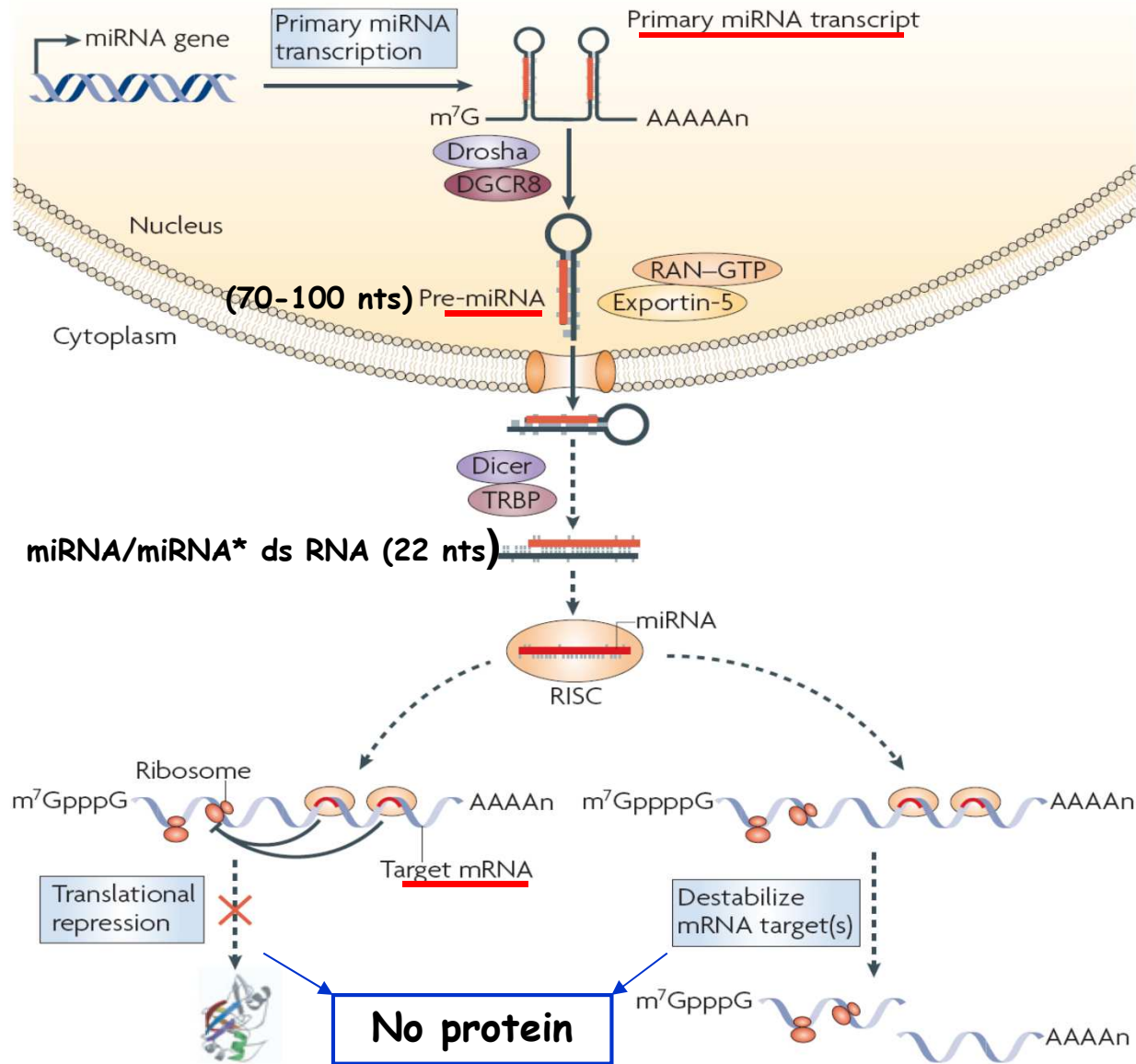
Micro-RNAs (miRNAs)



- ✦ *microRNA* nel locus *Lin-4* modula la proteina *lin-14* in *Caenorhabditis Elegans* (Ambros et al, 1993)
- ✦ Sequenze di 19-22 nt che regolano l'espressione di geni bersaglio
- ✦ Si legano al 3'UTR (ma anche a regioni codificanti) del gene bersaglio
- ✦ Sequenze altamente conservate
- ✦ >4000 miRNA individuati (piante, virus, animali), 1% del genoma
- ✦ Ogni miRNA ha centinaia di geni target (altamente conservati e/o non conservati)
- ✦ Un gene può essere regolato da più miRNAs
- ✦ Circa 30% del genoma umano si pensa sia regolato con meccanismo miRNA dipendente da almeno 1 miRNA
- ✦ Nell'uomo sono noti più di 700 miRNA

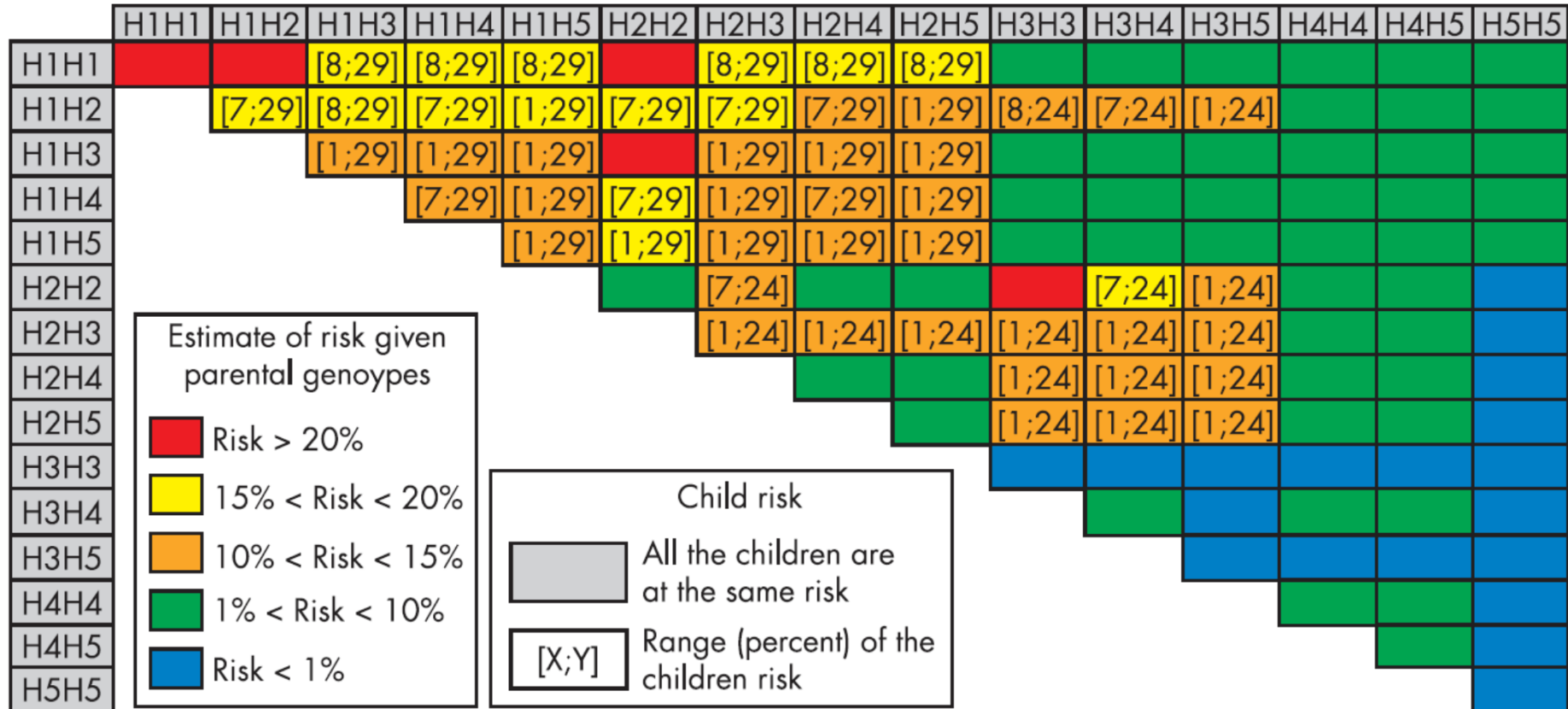


miRNA Biogenesis





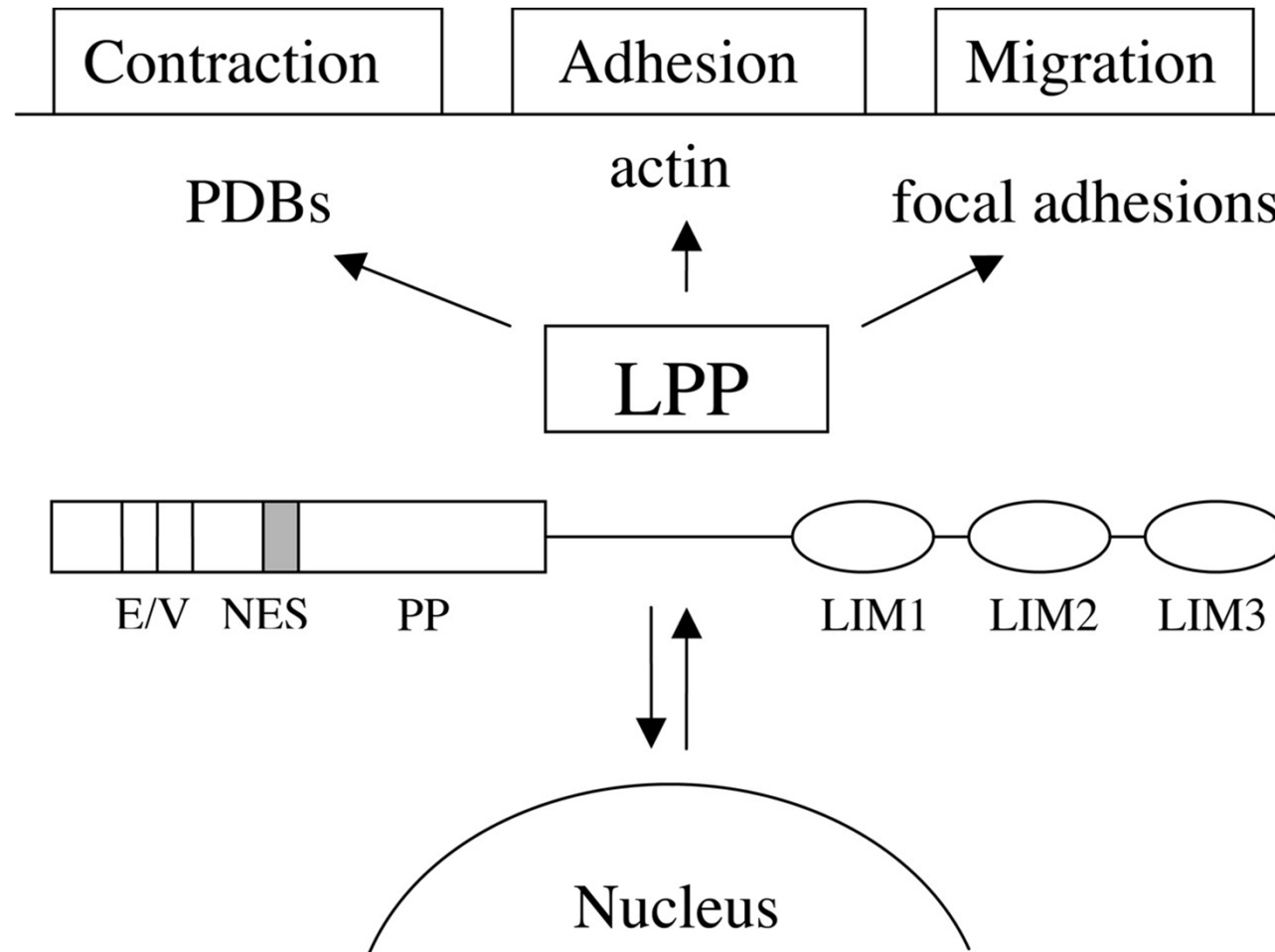
Stima del rischio di un figlio basato sui genotipi dei genitori



(Greco, Sacchetti, Tinto et al Gut 2007)

LPP

E' una proteina adattatrice che media l'assemblaggio di complessi multi proteici





HLA ed altri loci di suscettibilità alla CD



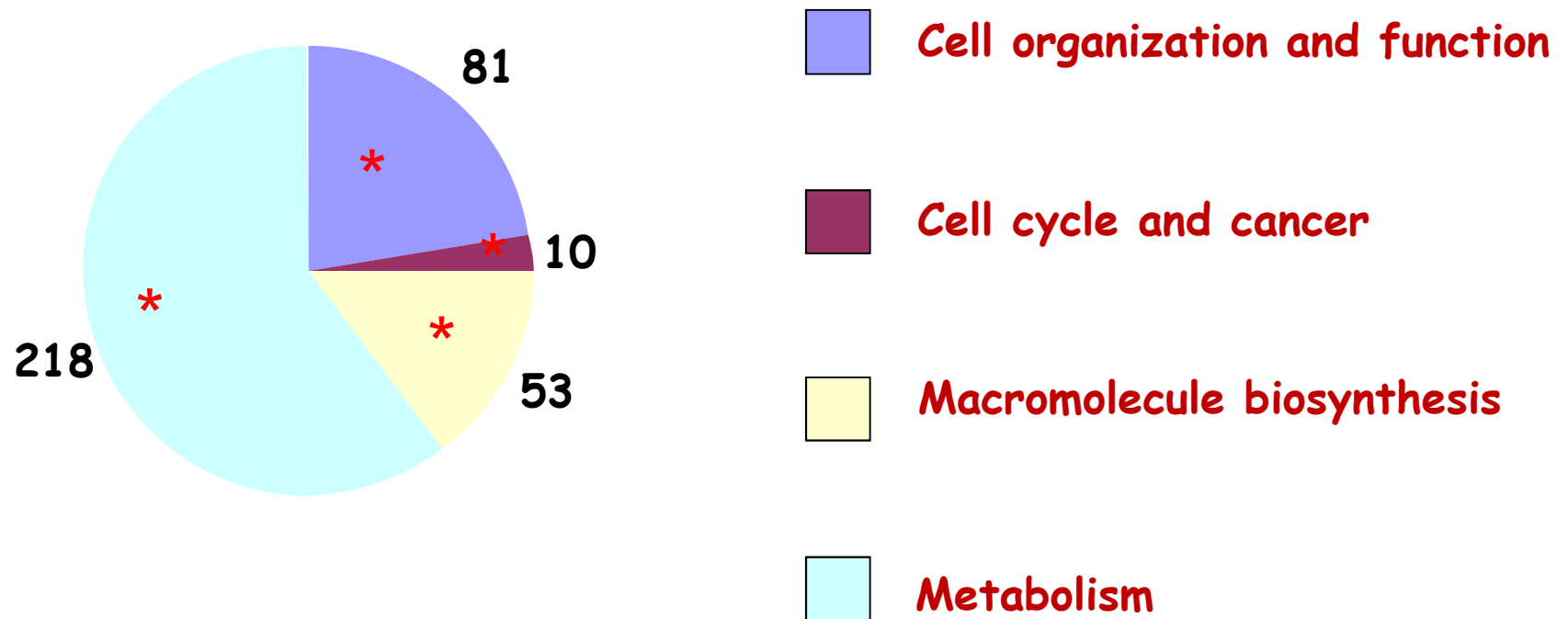
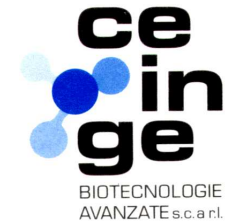
Locus*	Most likely candidate gene(s)	Function of proteins encoded by candidate gene(s)	Probable immune function
6p21	<i>HLA</i>	MHC is important for antigen presentation	Yes
2q33	<u><i>CTLA4</i></u>	CTLA4 is a receptor on T cells for CD80 and CD86 and is a negative regulator of T cell activation	Yes
4q27	<u><i>IL2</i></u> and <i>IL21</i>	IL-2 is a growth factor for T cells; IL-21 is a cytokine that enhances B cell, T cell and NK cell functions	Yes
1q31	<u><i>RGS1</i></u>	RGS1 is involved in cell signalling and is expressed by intraepithelial lymphocytes	Yes
2q12	<u><i>IL1R1, IL18R1</i></u> and <u><i>IL18RAP</i></u>	The α -chain and β -chain of the IL-18 receptor are encoded by <i>IL18R1</i> and <i>IL18RAP</i> , respectively; IL-18 promotes interferon- γ production	Yes
3p21	<u><i>CCR1, CCR3, CCR2</i></u> and <u><i>CCR5</i></u>	The chemokine receptors CCR1, CCR3, CCR2 and CCR5 are encoded at this locus; there are probably two independent coeliac disease risk factors at this locus	Yes
3q25	<u><i>IL12A</i></u>	The p35 subunit of the cytokine IL-12 is encoded at this locus; IL-12 favours T _H 1 cell differentiation	Yes
3q28	<i>LPP</i>	Unknown	No
6q25	<i>TAGAP</i>	TAGAP is expressed by activated T cells and is important for modulating <u>cytoskeletal changes</u>	Yes
12q23	<u><i>SH2B3</i></u>	Lymphocyte adaptor protein (LNK) is encoded at this locus and is involved in signalling in lymphocytes, including T cells	Yes
18p11	<u><i>PTPN2</i></u>	The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of inflammation	Yes
6q23	<u><i>TNFAIP3</i></u>	TNFAIP3 is a zinc-finger protein that inhibits nuclear factor- κ B activity and tumour necrosis factor-mediated programmed cell death	Yes
2p13	<u><i>REL</i></u>	REL is a component of the nuclear factor- κ B transcription complex	Yes

CCR, CC-chemokine receptor; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; IL, interleukin; LPP, LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma; NK, natural killer; PTPN2, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2; R, receptor; RAP, receptor accessory protein; RGS1, regulator of G protein signalling 1; TAGAP, T cell activation RhoGTPase activating protein; TH1, T helper 1; TNFAIP3, tumour necrosis factor, α -induced protein 3.

*The odds ratios of the strongest associated markers of the non-HLA loci range from 0.7-1.4 Bana Jabri, Nature review immunology, 2009



miR-449a putative target genes and pathways

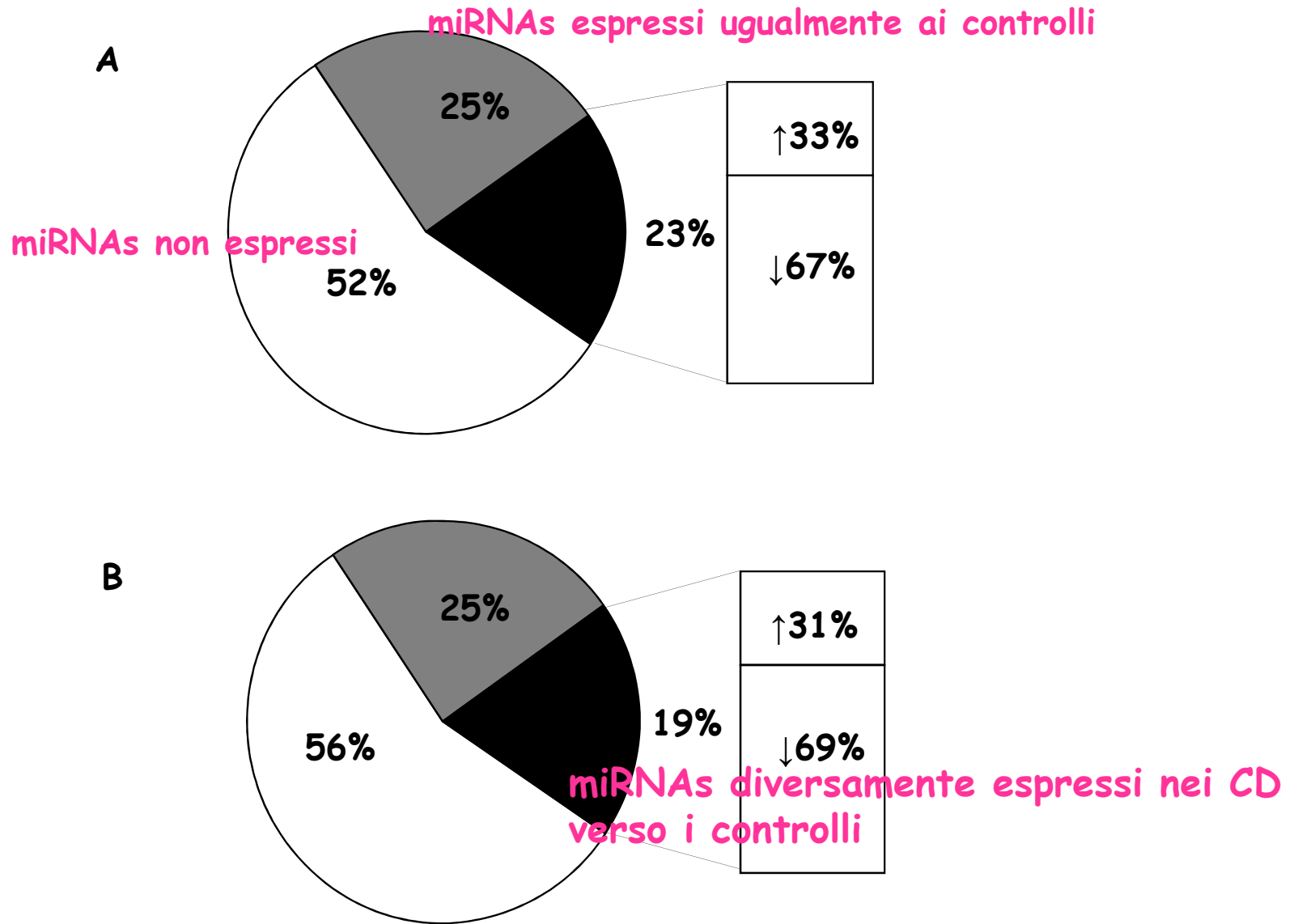


* NOTCH pathway genes (differenziamento cellulare a livello intestinale)





Espressione dei miRNAs nel piccolo intestino di bambini celiaci in fase attiva (A-, n=20), in remissione (B-, n=9) verso i controlli (n=11)

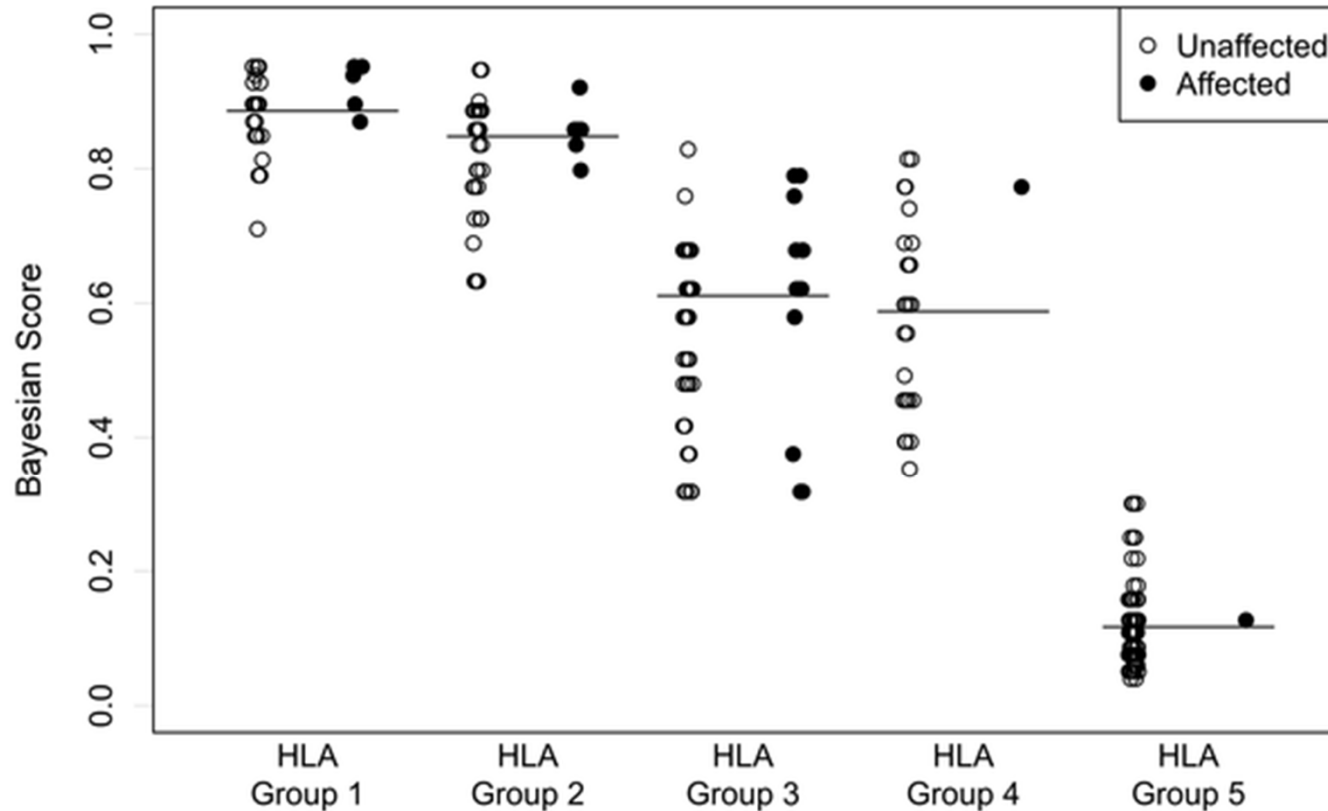




SNP	Gene	Model	Risk Allele	OR (95% CI)	p value
rs1464510	LPP	Additive	A	2.36 (1.64–3.41)	<0.001
rs2816316	RGS1	Recessive	A	1.75 (1.07–2.86)	0.025
rs842647	REL	Recessive	A	1.66 (1.04–2.65)	0.034
rs2327832	OLIG3	Additive	G	1.35 (0.90–2.03)	0.150
rs6441961	CCR1/CCR3	Additive	A	1.24 (0.89–1.72)	0.189
rs6822844	IL2/IL21	Additive	C	1.43 (0.82–2.49)	0.210
rs1738074	TAGAP	Dominant	A	1.31 (0.79–2.16)	0.293
rs3184504	SH2B3	Additive	A	1.19 (0.86–1.63)	0.294
rs17810546	IL12A	Additive	G	1.10 (0.80–1.51)	0.572
rs9811792	IL12A/SCHIP1	Dominant	G	1.10 (0.59–2.05)	0.753



Utilità della genotipizzazione di polimorfismi non-HLA (LPP, RGS1, REL) nel calcolo del rischio di celiachia



Above*
Under*

	HLA Group 1		HLA Group 2		HLA Group 3		HLA Group 4		HLA Group 5	
Above*	13	4	20	6	22	9	14	1	43	1
Under*	11	1	20	2	23	5	11	0	43	0

← 2/29

