

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Genetické vlivy na vývoj atopických chorob

Bakalářská práce

Autor: Kateřina Vávrová

Vedoucí práce: doc. Marie Lipoldová, CSc.

Praha, akademický rok 2007/2008

Poděkování

Upřímné poděkování za vedení, čas a pomoc při zpracování bakalářské práce patří paní doc.
Marii Lipoldové, CSc.

Seznam použitých zkratek

AD	atopic dermatitis (atopická dermatitida)
ADAM33	a disintegrin and metalloproteinase domain 33
ADRB2	β_2 adrenergic receptor (β_2 adrenergní receptor)
BHR	bronchial hyperresponsiveness (bronchiální hyperreaktivita)
CC16/CC10	Clara cell protein
cM	centimorgan
CSF	colony stimulating factor (faktor stimulující růst kolonií)
CSGA	The Collaborative Study on the Genetics of Asthma
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated-4 gene
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DPP10	dipeptidyl serine protease
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCERI	high-affinity IgE receptor (vysokoafinní IgE receptor)
FGF	fibroblast growth factor (růstový faktor fibroblastů)
GPRA	G-protein-coupled receptor
GRL	glucocorticoid receptor lymphocyte (glukokortikoidní receptor lymfocytu)
HLA	human leukocyte antigens (hlavní lidský histokompatibilní antigen)
CHI3L1	chitinase 3-like1
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukin
IL4R	interleukin 4 receptor

IRF	interferon regulatory factor
ISAAC	The International Study of Asthma and Allergies in Childhood
LTA4H	leukotrien A ₄ hydrolase (leukotrien A ₄ hydroláza)
LTC4	leukotrien C4
Mb	megabase (megabáze)
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
NFYB	nuclear transcription factor Y beta (beta podjednotka nukleárního faktoru Y)
PCDH1	protocadherin-1
PHF11	PHD finger protein 11
RAST	radioallergosorbent test (radioalergosorbentní test)
SCF	stem cell factor (faktor kmenových buněk)
SNP	single nucleotid polymorphism (polymorfismus v jednom nukleotidu)
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
TCR	T cell receptor (receptor T-lymfocytů pro antigen)
TGFB	transforming growth factor beta (transformující růstový faktor beta)
T _H	helper T-cell (pomocný T-lymfocyt)
TNF	tumor necrosis factor (faktor nekrotizující nádory)

Obsah

Abstrakt.....	6
1. Úvod.....	7
2. Klasifikace atopie.....	7
3. Průběh reakce.....	8
4. Určení fenotypu.....	9
4.1. Stanovení imunoglobulinu E v séru.....	10
4.2. Kožní testy (skin prick test).....	11
4.3. Bronchiální hyperreaktivita.....	11
5. Prevalence.....	11
6. Dědičnost a výskyt atopie.....	12
6.1. Metody mapování.....	13
6.1.1. Funkční klonování.....	14
6.1.2. Vazebná analýza.....	14
6.1.3. Asociační studie kandidátních genů.....	15
6.2. Genetické faktory podílející se na vzniku atopických onemocnění.....	16
6.2.1. Lokusy kontrolující vnímavost k atopii.....	17
6.2.2. Geny kontrolující vnímavost k atopii.....	20
7. Závěr.....	29
8. Použitá literatura.....	30

Abstrakt

Atopie je predispozice k hyperprodukcii imunoglobulinu E (IgE) proti běžným alergenům prostředí. Podílí se na vzniku onemocnění jako je atopická dermatitida, astma a alergická rhinitida. Vnímavost k atopickým onemocněním je ovlivněna jak prostředím, tak genetickými faktory a v různých populacích se liší. Při genetickém rozboru komplexních znaků se používá přístup kandidátních genů i testy zahrnující celý lidský genom, což vede k mapování kontrolních chromozomálních oblastí a identifikaci genů vnímavosti k atopii.

Rostoucí prevalence a zvyšující se závažnost alergických onemocnění v posledních desetiletích významně ovlivňují společnost nejen řadou omezení postižených jedinců, ale také ekonomickými důsledky. Z těchto důvodů představují tyto choroby intenzivně studovanou oblast.

Klíčová slova: atopie, astma, kandidátní gen, SNP, vazba

Abstract

Atopy is a predisposition to hyperproduction of immunoglobulin E (IgE) against common environmental allergens. It contributes on development of such diseases like atopic dermatitis, asthma and allergic rhinitis. The susceptibility to atopic diseases is influenced by both genetic and environmental factors and it varies in different populations. A genetic dissection of complex traits is using candidate gene approach as well as genome-wide search. That leads to a mapping of control chromosomal regions and identification of atopy susceptibility genes.

The increasing prevalence and severity of allergic disorders in the last decade has a significant impact on the society not only because of a number of limitations of suffering individuals but also because of economical consequences. For these reasons allergic disorders represent an area of intense investigation.

Key words: atopy, asthma, candidate gene, SNP, linkage

1. Úvod

Atopie (řec. *atopos*-ne na svém místě, neobvyklý, překvapující) je genetická predispozice vedoucí k imunopatologické reakci typu I. Ta se projevuje tím, že imunitní systém jedince reaguje na neškodné alergeny (antigeny) vnějšího prostředí zvýšenou produkcí protilátek typu imunoglobulin E (IgE). Lidé trpící takovýmto druhem přecitlivělosti se nazývají atopici. Mezi alergeny vyvolávající tuto reakci patří například složky pylových zrn, zvířecí srst, antigeny roztočů domácího prachu, potravinové alergeny aj. Mezi atopická onemocnění patří atopická dermatitida (AD), astma, senná rýma a alergie na potraviny.

Genetický podklad atopických onemocnění není známý. Předpokládá se polygenní dědičnost, kdy se na vzniku choroby podílí několik genů, které se však u jednotlivých jedinců projevují různě. Genetické dispozice však nejsou jedinou příčinou, významnou roli hrají i podmínky životního prostředí jako je znečištění vzduchu (Brauer et al. 2002), míra expozice alergenu, aktivní i pasivní kouření (Cline and Burrows 1989; Tager 1998), a dále virové infekce v dětství jako je například hepatitis B virus (Cakir et al. 2008). Díky multifaktoriálnímu vlivu se náchylnost k atopickým onemocněním v různých populacích liší (Warner 1999).

Rostoucí prevalence a závažnost alergických onemocnění v posledních desetiletích významně ovlivňuje společnost nejen v omezení postižených jedinců, ale také svými ekonomickými důsledky. Proto se odborníci snaží různými metodami rozluštit etiopatogenezi těchto onemocnění a najít prostředky pro vhodnou léčbu a prevenci.

2. Klasifikace atopie

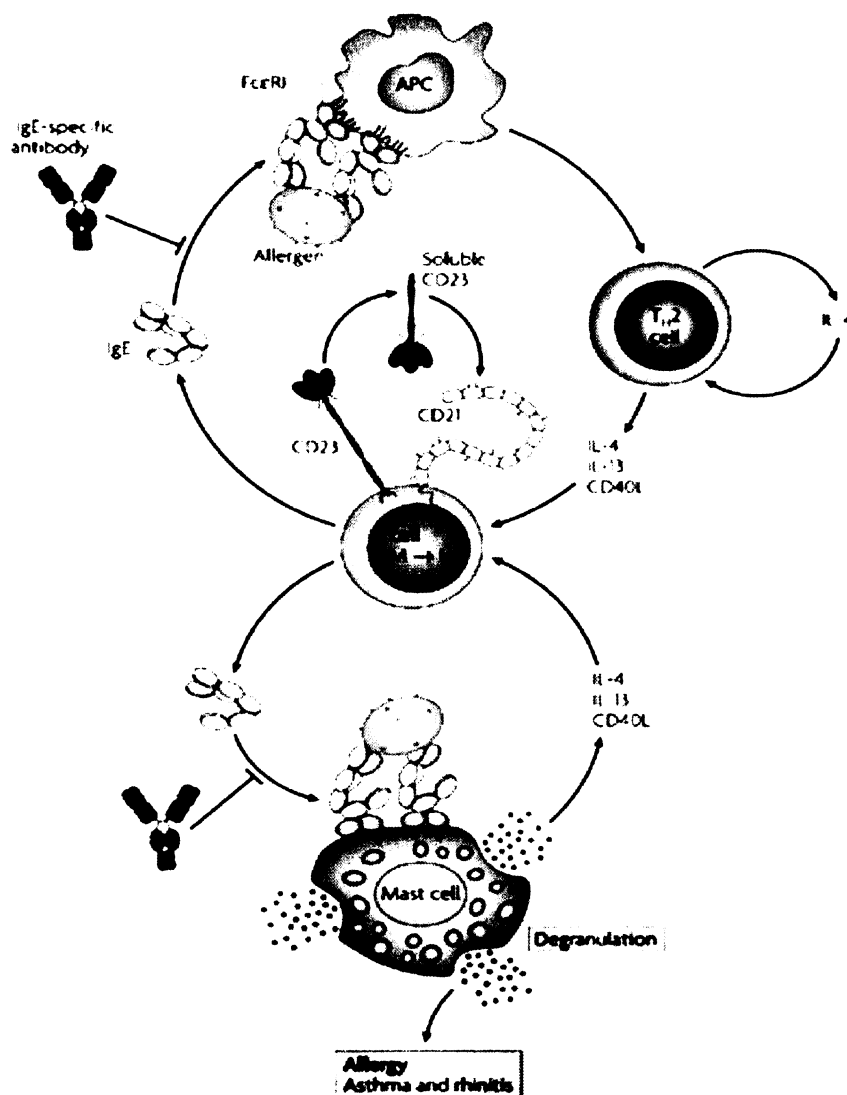
Atopie patří mezi imunopatologické reakce, které se vyznačují tím, že mohou vyvolat více či méně závažné poškození organismu. Tato poškození jsou u atopických onemocnění výsledkem neadekvátní reakce na neškodné vnější antigeny. Podle převládajících efektorových mechanismů ji řadíme k humorální imunopatologické reakci typu I.

Mechanismy imunopatologických reakcí jsou v zásadě stejné jako u prospěšných obranných reakcí, lze tedy najít jisté paralely mezi fyziologickou a imunopatologickou reakcí.

U atopických onemocnění jsou touto paralelou mechanismy, které se fyziologicky uplatňují při odpovědi na mnohobuněčné parazity.

3. Průběh reakce

Atopická reakce se také označuje jako přecitlivělost časného typu, protože k ní dochází velice brzy po kontaktu s alergenem. Je obdobná jako fyziologická obrana proti mnohobuněčným parazitům. Po setkání imunitního systému s alergenem prostřednictvím bazofilů, žírných buněk (mastocytů) a eosinofilů dochází k senzibilizaci pacienta následnými procesy (viz obr.1): stimuluje se proliferace a diferenciaci pomocných T lymfocytů (T_H2). Efektorové T_H2 dále stimuluje proliferaci a terminální diferenciaci B lymfocytů především sekrecí cytokinů-interleukinů IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13. Vliv mají i interleukiny sekretované mastocyty a jinými antigen prezentujícími buňkami. Díky vlivu IL-4 dochází pak k izotypovému přesmyku a produkci protilátek typu IgE. Ty se navážou na vysokoafinní IgE-receptory mastocytů a bazofilů a vyzbrojí je antigenně specifickými receptory. Po opakovaném setkání s alergenem dojde k agregaci těchto receptorů na povrchu těchto buněk a k uvolnění mediátorů (převážně histamin, heparin-první fáze alergické reakce) z cytoplazmatických granul. Záhy poté se aktivací membránové fosfolipázy A_2 vytvářejí metabolity kyseliny arachidonové (prostaglandiny, leukotrieny, tromboxany-druhá fáze alergické reakce). Tyto produkty napomáhají amplifikaci celé zánětlivé reakce.



Obr. 1 : Rozvoj imunitní TH2 odpovědi. Převzato z Gould and Sutton (2008)

4. Určení fenotypu

Pro genetické studie polygenních chorob stejně tak jako pro léčbu pacientů je velice důležité definovat klinický fenotyp sledované nemoci. K tomu napomáhá určení symptomů a stanovení objektivních kritérií, podle kterých se řídí vyhodnocování studií. Atopie je detekována převážně pomocí kožních testů (tzv. skin prick test), kvantifikací celkového IgE v séru a měření specifických IgE protilátek proti alergenům s použitím radioalergosorbentního testu (RAST) nebo metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Atopická onemocnění jsou také často doprovázena krevní eozinofilií (Daniels et al. 1996).

Ke klinickým projevům atopie patří astma bronchiale, rhinitis a dermatitida. Astma je definováno jako chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, charakteristické bronchiální obstrukcí a symptomy jako sípot, dušnost či kašel. Úzce souvisí také s bronchiální hyperreaktivitou. Vyskytuje se převážně v dětství, ale příležitostně se některé jeho projevy mohou objevit i v dospělosti. Alergická rhinitis je označována jako občasný nebo přetrvávající zánět nosní sliznice s následujícími symptomy: nasální neprůchodnost, kýchání, svědění. Nejběžnější forma rhinitis, senná rýma, se s výjimkami objevuje okolo sedmého roku života. Atopická dermatitida se nejmarkantněji projevuje v dětství, je charakterizována svědivou, zarudlou vyrážkou (Feijen et al. 2000).

Většina studií volí při stanovení následující kvantitativní znaky-fenotypy, které byly primárně vyvinuty jako klinické: kožní testy (skin prick test), celkové a specifické IgE v séru, počet eozinofilů v periferní krvi a bronchiální hyperreaktivitu (BHR). Dále zmiňují kritéria jen několika vybraných fenotypů.

4.1. Stanovení imunoglobulinu E v séru

Imunoglobulin E (190kDa) se vyskytuje u zdravých lidí v séru v nepatrných koncentracích, udávaný obsah se pohybuje v rozmezí 0-380 kU/l, u různých jedinců je však velice variabilní (Antošová et al. 1985; Marsh et al. 1994). Uplatňuje se v obranných reakcích proti mnohobuněčným parazitům na sliznicích a je hlavní příčinou atopických reakcí. Vysokoafinní receptory pro IgE se nacházejí na povrchu žírných buněk a bazofilů. Vazbou multivalentního antigenu na IgE zakotvené v membráně těchto buněk dojde k jejich degranulaci a uvolnění biologicky aktivních mediátorů. Zvýšená hladina celkového IgE koreluje s klinickou expresí alergie a astmatu (Xu et al. 2000).

Při měření specifického IgE se nejčastěji měří senzitivita k běžným inhalačním alergenům jako je srst zvířat (kočka, pes, kůň), roztoči (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*), pyly trav a stromů, domácí prach (Haagerup et al. 2002; Gusareva et al. 2006). Atopie je definována zvýšenou hladinou IgE proti alespoň jednomu z testovaných alergenů a hladinou celkového IgE vyšší než 100 kU/l (Haagerup et al. 2002).

4.2. Kožní testy (skin prick test)

Tyto testy se liší v počtu i složení testovaných alergenů (Ober et al. 2000; Koppelman et al. 2002; Dizier et al. 2000; Altmuller et al. 2005). Pozitivní kožní reakce na jeden a více alergenů je považována za patologický stav.

4.3. Bronchiální hyperreaktivita

Bronchiální hyperreaktivita je přehnaná bronchospastická odpověď na různorodé podněty. Objevuje se u lidí s astmatem i u asymptomatických jedinců, kde představuje riziko vzniku astmatu. Bývá měřena mnoha způsoby s použitím různých provokačních stimulů, například metacholin (Daniels et al. 1996; Van Eerdewegh et al. 2002) nebo histamin (Xu et al. 2000).

BHR je přítomna ve zvýšené míře u atopického i neatopického typu astmatu u jedinců z městských aglomerací (Vondra et al. 1990).

5. Prevalence

Prevalence atopie se v západních populacích pohybuje v rozmezí mezi 40-50% (Daniels et al. 1996), přičemž se zvyšuje hlavně u dětí (Yap et al. 2005). Liší se značně po celém světě, i mezi jednotlivými evropskými zeměmi. Podle výsledků ISAAC (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, 1998) je prevalence astmatu a atopické dermatitidy, které patří k nejčastějším alergickým projevům u atopiků, nejnížší v zemích východní Evropy, Indii a Číně a naopak nejvyšší ve Velké Británii, Austrálii, Novém Zélandě a Irsku (Jarvis and Burney 1998). Tento nárůst je připisován změně životního stylu v západních zemích, který charakterizuje převaha pobytu ve městech, v uzavřených prostorech, změna stravování, větší výskyt vzdušných alergenů a menší promořenost obyvatelstva infekcemi. Na základě těchto aspektů bylo vytvořeno několik hypotéz, například dietní, která mimo jiné diskutuje vliv mateřského mléka versus probiotických náhrad v kojeneckém věku (Huurre et al. 2008; Waser et al. 2007). Hygienická hypotéza se zabývá absencí infekčních nemocí v dětství. Paradoxně vyšší úroveň hygieny u rodin s malým počtem dětí vede k vyššímu výskytu atopických onemocnění (Strachan 1989).

Naopak protektivně mohou působit opakované infekce v raném dětství, které mohou snížit riziko vzniku alergických onemocnění (Lewis 1998). Mají vliv na vývoj imunitního systému a mohou tak zvrátit imunologický proces vedoucí k T_H2 odpovědi.

6. Dědičnost a výskyt atopie

Přestože se atopická onemocnění neřídí podle předpokládaného vzorce dědičnosti dle Mendela, prvotní provedené studie navrhovaly dominantní, recesivní, kodominantní i polygenní modely dědičnosti atopie a hladiny IgE. Důvody pro tuto odchylku v dědičnosti jsou následující: (1) na projevu fenotypu se podílí několik genů (polygenní dědičnost); (2) u různých jedinců se mohou vyskytovat odlišné alely pro danou chorobu (genetická heterogenita); (3) interakce s prostředím mohou vést k neúplné penetranci, tedy pravděpodobnost projevu daného fenotypu je menší než 1:1 (Anderson and Cookson 1999).

I. Borecki se jako první pokusil najít souvislost mezi hlavním regulačním lokusem, ovlivňujícím vysokou hladinu imunoglobulinu E, a různými projevy atopických chorob (Borecki et al. 1985; Barnes 2000). Použil k tomu klinická data ze studie Gerrarda et al. (Gerrard et al. 1978). V případě astmatu a atopické dermatitis odpovídal účinek genu recesivní dědičnosti. Meyers et al. (Meyers et al. 1994) také navrhli hlavní autozomálně recesivní lokus určující vysokou hladinu IgE, zatímco Martinez et al. (Martinez et al. 1994) pro ten samý znak navrhli kodominantní dědičnost autozomálního lokusu.

W. Cookson (Cookson and Hopkin 1988) ve své studii uvedl autozomálně dominantní dědičnost atopie a později pomocí vazebné analýzy našel důkaz pro "atopický gen" na chromozomu 11q13 (Sheikh 2002). Ani s jednou teorií se neztotožnila studie Lawrence et al. (Lawrence et al. 1994), která neprokázala žádný efekt hlavního genu na jakýkoli znak asociovaný s atopií (astma, ekzém, dušnost, celkové IgE, pozitivní kožní test, bronchiální hyperresponzibilita).

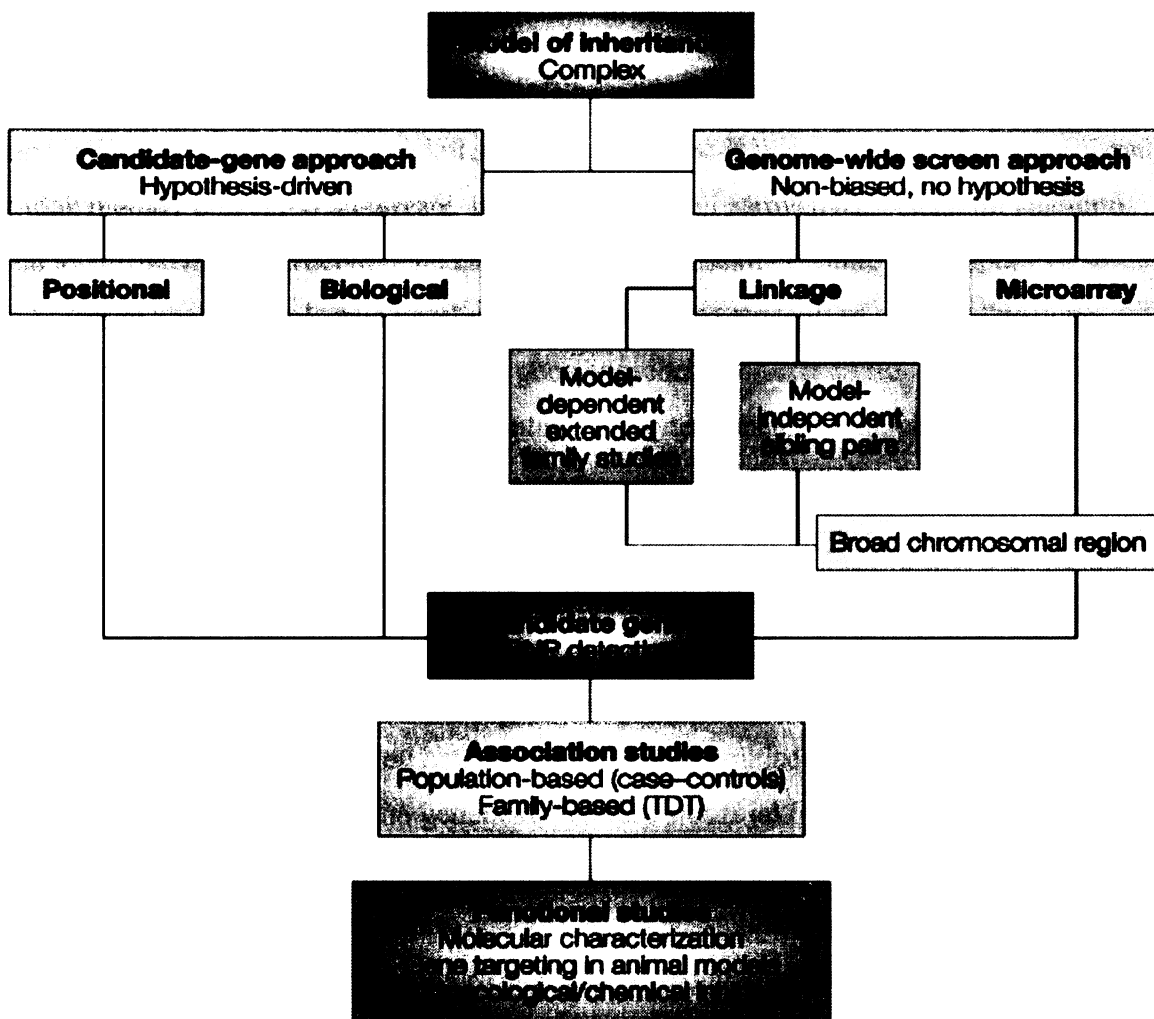
Je známo, že atopie se projevuje zvýšeným výskytem v rodinách s pozitivní rodinnou anamnézou. Moffatt et al. (Moffatt and Cookson 1997a) poukazují na zvýšené riziko atopie u dětí, jejichž matky jsou atopičky. Cookson et al. (Cookson et al. 1992) udávají, že přenos atopie na lokusu chromozomu 11q je detekovatelný pouze přes mateřskou linii. Relativní riziko (kolikrát častěji se dané onemocnění vyskytuje u jedinců s danou alelickou formou než u jedinců, kteří tuto alelu nenesou) 1,40 pro atopii u dětí s pozitivní rodinnou anamnézou oproti 1,14 bez pozitivní anamnézy uvádí Yap et al. (Yap et al. 2005). Mechanismus tohoto

fenoménu není známý, ale existují hypotézy zabývající se vlivem genetického imprintingu (proces, kdy je určitý gen odlišně aktivován či umlčován v závislosti na pohlaví rodiče, od kterého byl zděděn) nebo imunologickými interakcemi matky a dítěte v děloze a po porodu.

Některé výsledky studií dvojčat poukazují na to, že konkordance pro atopii a hladinu IgE je vyšší u monozygotních než dizygotních dvojčat a to nezávisle na tom, zda jsou vychováváni společně nebo odděleně (Feijen et al. 2000; Los et al. 2001). Takováto shoda uvnitř páru dvojčat pro sledovaný znak svědčí o přítomnosti genetické složky.

6.1. Metody mapování

V zásadě jsou používány tři postupy identifikace genů zodpovědných za komplexní onemocnění jako je atopie: funkční klonování, vazebná analýza a asociační studie (obr. 2).



6.1.1. Funkční klonování

První způsob vychází z již existující znalosti vztahu daného genu ke konkrétnímu onemocnění, anebo se takový vztah dá vzhledem k dosud získaným poznatkům o jeho funkci či struktuře předpokládat. Takový kandidátní gen je pak podroben genetické a molekulárně biologické analýze a jsou testovány hypotézy o asociaci/kosegregaci specifických variant (polymorfizmů) daného genu se zkoumaným znakem. Tento postup je nazýván funkční klonování (“functional cloning”).

6.1.2. Vazebná analýza

Oproti tomu druhá metoda vychází výlučně z identifikace oblasti genomu, kde se na základě vazebných studií nachází místo (lokus), který významně ovlivňuje variabilitu zkoumaného znaku. V místě nejsilnější vazby se pak v ideálním případě molekulárně genetickými metodami shrnutými v pojmu poziční klonování (“positional cloning“) podaří pomocí vysoce polymorfních markerů identifikovat zodpovědný gen, respektive jeho alelu kauzálně spjatou se segregujícím znakem. Díky nárůstu počtu známých genů, ke kterému došlo v důsledku rozsáhlých projektů sekvenace genomů člověka a modelových organismů, se však metody pozičního klonování nejčastěji používají zároveň s asociačními studiemi. Jsou identifikovány pravděpodobné kandidátní geny v úseku genomu, jehož spojitost se zkoumaným znakem prokázala vazebná analýza. Pro tuto strategii se používá “pozičně-kandidátní přístup“ (positional candidate gene approach).

U vybrané skupiny rodin s frekventním výskytem onemocnění, případně u souboru sourozenců sdílejících určitý fenotyp zkoumáme, jestli postižení jedinci významně častěji nesdílejí některé alely. Toto testování předpokládá znalost genotypu pro mnoho míst v genomu u jedinců ze souboru. Metodou zvanou testování celého genomu (genome-wide search) se provádí genotypizace pomocí stovek anonymních markerů rozmístěných po celém genomu, charakterizujících polymorfizmy typu mikrosatelitů (krátkých repetitivních di-, tri- nebo tetranukleotidů) s vysokou mírou heterozygocie, která je základem pro informativnost analýzy. Tyto vysoce polymorfní genetické markery slouží jako ukazatele přibližné lokalizace genu, který se pravděpodobně účastní na projevu daného onemocnění. Pro vyhodnocení experimentů používajících vazebnou analýzu jsou nejčastěji užívané tzv. neparametrické metody, tedy takové, kde a priori nepředpokládáme žádný konkrétní způsob dědičnosti, počet genů nebo míru vlivu negenetických faktorů. Výsledek vede obvykle k identifikaci oblasti genomu o velikosti 10-20 milionů párů bází, tedy 10 centimorganů [cM] a více, což znamená, že mohou obsahovat stovky kandidátních genů (Whittaker 2003). Ve studiích kandidátních

genů byl doposud důkaz vazby prokázán ve více jak dvaceti lokusech v patnácti autozomálních chromozomech (Whittaker 2003).

6.1.3. Asociační studie kandidátních genů

Asociační studie se přímo zaměřují na testování vztahu mezi konkrétní alelou, genotypem nebo haplotypem (souborem úzce vázaných genotypů) a onemocněním. Většinou mají charakter “case-control“ (případ-kontrola), kdy se porovnává relativní zastoupení určitého polymorfizmu mezi skupinami, z nichž jedna dané onemocnění vykazuje (atopici), zatímco druhá nikoli. Cílem této metody je najít polymorfizmy v genu známé funkce a porovnat frekvenci alel v případech a kontrolách. Pokud je i při zachování zásad správného výběru obou skupin a po statistickém odfiltrování falešně pozitivních výsledků nalezena asociace mezi zkoumanou genetickou variantou a onemocněním, lze tento výsledek interpretovat několika způsoby. Buď tato alela přímo ovlivňuje expresi daného fenotypu, nebo je ve vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium) se skutečnou kauzální alelou (Palmer and Cookson 2001) a slouží víceméně jako její marker. Takto je možné testovat polymorfizmy čistě funkčních kandidátních genů o známé funkci nebo takových, na které ukázala předchozí vazebná analýza. Z principu této metody jsou zřejmá i její omezení. Aby byl výsledek považován za biologicky významný, je nutné ověřit ho v další, alespoň jedné nezávislé studii.

V nedávné době se začal používat nový způsob- tzv. genome-wide association studies. Jedná se o vyhledávání polymorfizmů v jednom nukleotidu (single nucleotid polymorphisms [SNPs]) v lidském genomu a jejich asociace s onemocněním. Tyto studie vyžadují dvě skupiny účastníků: jednu s daným onemocněním a druhou skupinu zdravých jedinců. Pokud se určitý polymorfizmus nachází s vyšší frekvencí ve skupině nemocných, lze říci, že je tato variace “asociována“ s daným onemocněním.

Každá z těchto metod však naráží na úskalí vyplývající z multifaktoriální podstaty atopických onemocnění. Jsou to především polygenní dědičnost, genetická heterogenita a neúplná penetrance (diskutováno v kap. 6.1.). Problémem jsou také fenokopie týkající se jedinců, kteří nezdědili predispoziční alelu, ale mohou onemocnět v důsledku působení environmentálních nebo jiných náhodných příčin, nebo různý věk nástupu (age of onset), díky němuž je možné, že u jedinců s nediagnostikovanou atopií v době provádění studie dojde v průběhu času k manifestaci geneticky determinovaného znaku (Lander and Schork 1994).

Významnou překážkou je i etnická heterogenita. Vychází se z předpokladu, že pro populace různých etnik se budou skupiny odpovědných genů do určité míry lišit a význam jednotlivých variant bude mít v různých populacích jinou míru relevance pro výsledný fenotyp. Jako řešení se jeví stratifikace kohorty nebo použití speciálních statistických modelů zahrnujících předpoklad tzv. genetického přimísení (admixture). Podstatně menší heterogenitu vykazují populace izolované geograficky, kulturně nebo nábožensky a které v mnoha případech historicky vznikly jen z velmi omezeného počtu původních zakladatelů. V těchto skupinách, kde je environmentální prostředí relativně homogenní, se předpokládá i podobnost alel. Většina studií se proto zaměřuje na inbrední populace s homogenním genetickým i environmentálním pozadím jako jsou Amishové, Hutterité (Ober et al. 2000), Hispánci (Martinez et al. 1994) nebo na vyhrazené populace bez znatelného inbreedingu jako jsou např. Japonci (Shirakawa et al. 1996).

V případě studií kandidátních genů se často stává, že asociace nalezená v jedné populaci se neprokáže v žádné z dalších. To může být způsobeno rozdíly v uspořádání studie, velikosti studovaného vzorku, diagnostických kritériích nebo v populačních rozdílech (Anderson and Cookson 1999).

6.2. Genetické faktory podílející se na vzniku atopických onemocnění

Při hledání genů zodpovědných za atopii se výzkum zaměřil především na genotypizaci polymorfizmů v jednom nukleotidu (SNPs) jakožto jedním z typů DNA sekvenčních variant. Jedná se o záměnu jednoho páru bází DNA a využívá díky větší stabilitě ve srovnání s jinými polymorfizmy. Další výhodou je jejich rozsáhlý výskyt v lidském genomu, nachází se v exonech, intronech, promotorech, enhancerech a intergenních oblastech. Z doposud publikovaných studií vyplývá, že kromě poruch genů kódujících proteiny účastníci se imunitních reakcí přispívá k atopii a zejména k její orgánové manifestaci ne zcela jasným způsobem i řada genů kódujících molekuly mimo imunitní systém.

Ve své práci se budu zabývat takovými úseky chromozomů s potenciálními geny pro atopii, které byly potvrzeny ve více než jedné studii a zaměřuje se na ně největší pozornost.

6.2.1. Lokusy kontrolující vnímavost k atopii

Doposud bylo u lidí provedeno mnoho celogenomových vazebných studií. Vazby k atopii byly nalezeny ve specifických etnických skupinách, s použitím různých fenotypů a odlišných hladin statistické významnosti. Největší pozornost se věnuje lokusům 5q23-31, 6p24-21, 11q21-13, 12q24-12 a 13q14-12. Většina těchto chromozomálních úseků je však rozsáhlá, v rozmezích deseti až třiceti megabází (Mb), a obsahuje mnoho kandidátních genů. Pomocí pozičního klonování, genotypizace SNP a mapování vazebné nerovnováhy se vytipují a identifikují potenciální geny, a to i bez znalosti jejich přesné funkce.

Chromozom 5q

Jednou z oblastí kde je silný průkaz vazby k atopii a astmatu je lokus 5q31-q33. Obsahuje velký počet genů, které hrají důležitou roli v regulaci IgE a vývoji zánětlivých onemocnění asociovaných s alergií a astmatem. Nachází se zde geny kódující několik prozánětlivých cytokinů podílejících se na T_H2 odpovědi (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), β_2 adrenergní receptor (ADRB2), leukotrien C4 syntázu (LTC4), glukokortikoidní receptor lymfocytu 1 (GRL1), kolonie stimulující faktor (CSF2) a mnoho dalších (Bleecker et al. 1997). Předmětem zájmu na tomto chromozomu je vazba asociovaná se třemi fenotypy: BHR, astmatem a celkovým IgE. První studii zabývající se posledně uvedeným fenotypem provedli Marsh et al. (Marsh et al. 1994) na základě geneticky izolované populace Amishů a objevili vazbu mezi celkovým IgE v séru a několika markery v tomto lokusu včetně IL-4, interferon regulatory factor (IRF-1) a IL-9. Následovaly další studie lokusu 5q31.1 (Meyers et al. 1994; Martinez et al. 1998; Postma et al. 1995) navrhuující asociaci i s dalšími znaky jako BHR, počet eozinofilů. Výzkum vazby astmatu a souvisejících fenotypů na chromozom 5q uskutečnilo mnoho vědeckých skupin, které testovaly rodiny z Japonska (Noguchi et al. 1997), Austrálie (Palmer et al. 1998) nebo rodiny Hutteritů (Ober et al. 1998).

Koppelman a spolupracovníci (Koppelman et al. 2002) shromáždili soubor holandských atopických rodin. Pomocí vazebné analýzy a pozičního klonování se jim na chromozomu 5 podařilo identifikovat gen pro protokadherin-1 (PCDH1) asociovaný s BHR. PCDH1 je exprimován v plicní tkáni, konkrétně v bronchiálních epitelálních buňkách, které se účastní interakcí mezi vnějším prostředím a prostředím plic (Whittaker 2003).

I přes přesvědčivé pozitivní výsledky většiny studií jsou i takové, které důkaz vazby na chromozomu 5q nepotvrdily (Daniels et al. 1996; Laitinen et al. 1997).

Chromozom 6q

Na tomto chromozomu se nachází rozsáhlý hlavní histokompatibilní komplex (MHC komplex), u lidí zvaný HLA komplex (human leukocyte antigens). Hlavní funkcí MHC glykoproteinů je vázat antigeny a prezentovat je na svém buněčném povrchu tak, aby byly rozpoznatelné pro T-lymfocyty. Největší pozornost je věnována HLA-D (DR, DQ a DP) úseku, který je lokalizován na krátkém raménku (lokus 6p21.3). D. Marsh a jeho kolegové se zaměřili na imunitní odpověď ke dvěma alergenům *Ambrosia artemisiifolia*- Amb a 5 a Amb a 6 (Barnes and Marsh 1998). Tyto studie jasně ukázaly vztah mezi přítomností určitého HLA-D fenotypu a specifické IgE a IgG protilátkové odpovědi. Asociace v HLA-D oblasti se rozšířily o další alergeny včetně roztouče *Dermatophagoides pteronyssinus* (Moffatt et al. 2001) a travní pyly (Woszczek et al. 2002). U polských pacientů s pylovou alergií byla identifikována alela HLA-DRB*01, která je asociována s významně vyšší hladinou imunoglobulinu E.

Tan et al. (Tan et al. 2007) se zabývali SNP v 3' nepřekládané oblasti HLA-G úseku, který je u rodin z Chicaga a Nizozemí asociován s astmatem. Stejný fenotyp se nepodařilo prokázat v asociaci s alelou HLA-DRB1 u australských Aboriginů (Moffatt et al. 2003).

V blízkosti HLA-D se nachází gen kódující tumor necrosis factor α (TNF- α), důležitý cytokin v zánětlivých odpovědích. Polymorfismus v komplexu TNF je asociován s odlišnou expresí TNF- α a přítomností astmatu (Chagani et al. 1999).

Chromozom 11

Důkaz vazby široce definovaného fenotypu atopie k markeru na chromozomu 11q13 byl poprvé popsán v roce 1989 skupinou W. Cooksona (Cookson et al. 1989; Bleeker et al. 1997). Byl proveden screening možných vazeb za pomoci 17 polymorfních markerů rozptýlených v genomu. Pozdější studie Cooksona et al. provedená na dvou separovaných populacích (australské a britské) měla shodný výsledek (Daniels et al. 1996). Následovaly studie, které naopak neprokázaly žádnou vazbu: Hizawa et al. (1995); CSGA- The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (1997).

Brzy po prvotní studii Cookson navrhl jako prvořadého kandidáta gen FCER1B, který kóduje β řetězec vysokoafinního receptoru pro IgE. Tento řetězec není nezbytný pro funkci FCER1B, ale stabilizuje povrchovou expresi receptoru a jakákoliv variace na úrovni exprese β řetězce může změnit funkci receptoru.

Polymorfismus v genu pro FCER1B je spojován s několika fenotypy atopie včetně BHR u italské populace (Trabetti et al. 1998), celkového/specifického IgE u australské

populace (Palmer et al. 1998; Daniels et al. 1996) a atopického astmatu v japonské populaci (Shirakawa et al. 1996). Sekvenční varianta (Gly237Glu) identifikovaná Shirakawou et al. pro posledně zmiňovaný fenotyp však nebyla potvrzena ve studii Sandforda et al. (Sandford et al. 2000). Young et al. (Young et al. 1992) navrhli, že region 11q13 obsahuje hlavní lokus zodpovědný za IgE odpověď, důležitou imunologickou odchylku, která charakterizuje atopii. Kandidátní geny v této oblasti zahrnují matrix metaloproteinázový gen 1, 3 a 8, dále δ , γ a ϵ podjednotky CD3 (Koppelman et al. 2002) a FGF3 (fibroblast growth factor 3).

Zajímavostí je i polymorfismus spojený s regulací IgE u australských Aboriginů nakažených parazity, který naznačuje protektivní roli genu v případě zamoření helminty (Palmer et al. 1997).

Chromozom 12q

Pozornost se soustředí na poměrně rozsáhlý chromozomální úsek 12q14.3-q24.1, který obsahuje velký počet kandidátních genů pro astma a alergie. Jsou to především geny kódující interferon gama (IFNG), cytokin, který inhibuje aktivitu IL-4; stem cell factor (SCF); insulin-like growth factor-1 (IGF1); leukotrien A₄ hydrolázu (LTA4H) a podjednotku nukleárního faktoru-Y (NFYB). Důležitým genem je i STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6), což je transkripční faktor nezbytný pro IL-4/IL-13 zprostředkovanou transdukční dráhu.

Vazba na chromozomu 12q ke koncentraci celkového IgE byla poprvé popsána u dvou populací: Amishů a afro-karibské populace z ostrova Barbados (Anderson and Cookson 1999). CSGA (1997) prokázala vazbu astmatu k markeru na stejném úseku u dvou ze tří studovaných rasově odlišných populací: bělochů a hispánců. Souhlasné výsledky má studie Carole Ober et al. (Ober et al. 1998), která se zaměřila na populaci Hutteritů. Důkaz vazby byl však zaznamenán přes značnou vzdálenost (>60cM), proto je potřeba ještě dalších upřesňujících analýz.

Chromozom 13

Na tomto chromozomu byl proveden genome-wide screen australské (Daniels et al. 1996), francouzské (Dizier et al. 2000) a nizozemské (Koppelman et al. 2002) populace vedoucí k identifikaci vazby pro atopii, počet eozinofilů, SPT a celkového IgE v séru. Kimura et al. (Kimura et al. 1999) poukázali na asociaci atopického astmatu k markeru na chromozomu 13 u japonské populace. Zhang et al. (Zhang et al. 2003) našli pomocí pozičního klonování asociaci mezi celkovým IgE a několika alelami genu PHF11.

Ostatní chromozomy

Na chromozomu 14 (lokus 14q11.2-13) bylo identifikováno několik kandidátních genů, konkrétně TCRA (receptor T lymfocytů s α řetězcem) a TCRD (receptor T lymfocytů s δ řetězcem), asociovaných se zvýšenou koncentrací specifického IgE a pozitivním kožním testem (Mansur et al. 1999).

Lokus 1p31 byl zkoumán v souvislosti s astmatem a alergickou rhinitis ve francouzské populaci (Dizier et al. 2000; Dizier et al. 2007), a s koncentrací IgE v nizozemské populaci (Koppelman et al. 2002).

Výsledky celogenomového screeningu evropských, australských a amerických rodin uskutečněného Pillaiem et al. (Pillai et al. 2006) ukazují možnou vazbu BHR k lokusu na chromozomu 2p a naopak vylučují vazbu k astmatu.

Poměrně širokým lokusem na chromozomu 17 se zabývaly již tři celogenomové studie (CSGA 1997; Koppelman et al. 2002) zaměřené na fenotypy spojené s imunitní odpovědí. Jedním z lokusů bohatých na geny asociované s astmatem a zánětem dýchacích cest je 17q11.2-q21, kde jsou seskupeny geny kódující C-C chemokiny. Nejprobádanějším chemokinem je RANTES. Sekvenční varianta v jeho promotoru je asociovaná s atopickou dermatitidou, SPT, ale nikoli s hladinou celkového IgE (Nickel et al. 2000; Fryer et al. 2000). Testování celého genomu pro atopickou dermatitidu identifikovalo u skupiny jedinců ze severní Evropy vazbu AD k lokusu 17q25 (Morar et al. 2006).

Prvotní analýza CSGA (1997) s použitím neparametrických vazebných metod poskytla důkaz pro lokus vnímavý k astmatu na chromozomu 11q11.1-q11.2 u afro-amerických rodin.

Skupina vědců identifikovala lokus vnímavý k atopické dermatitis na chromozomu 3q21 u 199 rodin evropského původu (Lee et al. 2000). Shodný závěr vyvodila studie T. Kurze et al. (Kurz et al. 2005).

6.2.2. Geny kontrolující vnímavost k atopii

Doposud bylo navrženo přes 100 genů podílejících se na rozvoji astmatu a příbuzných fenotypů (Zhang et al. 2008), což odráží různorodost, která tyto znaky charakterizuje. U většiny genů však nebyl určen jejich vliv a funkce v rozvoji vnímavosti k onemocnění. Poziční klonování indikovalo sedm genů v lokusech 2q14-32 (DPP10- dipeptidyl serine protease), 2q33 (CTLA4- cytotoxic T-lymphocyte-associated-4 gene), 5q32-33 (PCDH1- protocadherin-1), 7p14.3 (GPRA- G-protein-coupled receptor), 13q14 (PHF11- PHD finger protein 11), 20q13 (ADAM33- A desintegrin and metalloproteinase domain 33)

a 1q32.1 (CHI3L1- chitinase 3-like 1), jejichž alely disponují svoje nositele k atopickým chorobám, anebo znakům provázejícím atopie.

Dipeptidyl serine protease (DPP10)

M. Allen et al. (Allen et al. 2003) objevili asociaci mikrosatelitu D2S308 k astmatu, 800 kilobází distálně od interleukinového klusteru na chromozomu 2q14. Mapování 244 britských rodin vedlo k identifikaci haplotypu lokalizovaného ve vazebné nerovnováze, která byla asociována s astmatem. Ten samý haplotyp byl také asociován s astmatem u astmatických dětí z Německa. Navíc haplotyp D2S308*3 měl vyšší výskyt u steroidně-dependentních astmatiků. Jediným genem exprimovaným v této chromozomální oblasti byl MEX4FB-1. Žádný kódující polymorfismus v DPP10 genu nebyl nalezen.

DPP10 patří mezi konzervovanou rodinu dipeptidyl proteináz, které mohou odštěpovat koncové dipeptidy z chemokinů a cytokinů a regulovat tak jejich aktivitu (Huang 2005). Další funkční vlastnosti DPP10 ještě nejsou zcela objasněné.

Cytotoxic T-lymphocyte-associated-4 gene (CTLA4)

Kvůli imunitním poruchám byly studovány tři polymorfizmy v CTLA4 genu: C/T polymorfismus na pozici -319 v promotoru, A/G záměna na pozici +49 v exonu 1 (Nistico et al. 1996) a mikrosatelitní AT repetice v 3' nepřekládané oblasti.

Mapování chromozomu 2q33 v nizozemské populaci odhalilo asociaci mezi SNP v CTLA4 genu a hladinou celkového IgE v séru (Howard et al. 2002b). Kombinace polymorfismu +49 A/G a AT repetice byla asociována s hladinou celkového IgE, zatímco -1147 SNP byl asociován s BHR a astmatem. Jedinci s rizikovými genotypy pro BHR (-1147 CT nebo TT) a vyšší hladinu IgE (+49 AA) měli zvýšené riziko vzniku astmatu.

Protocadherin-1 (PCDH1)

Pomocí vazebné analýzy a pozičního klonování provedeném v nizozemské populaci Whittaker et al. identifikovali na chromozomu 5 gen protocadherin-1, asociovaný s BHR (Whittaker 2003). PCDH1 se skládá z integrálních membránových proteinů, které se účastní v kalcium-dependentní buněčné adhezi (Sano et al. 1993) a je exprimován v bronchiálních epiteliálních buňkách.

G-protein-coupled receptor (alias GPRA, GPR154, GPR14, VRR1)

G-protein-coupled receptor lokalizovaný na chromozomu 7p15 byl identifikován jako kandidátní gen pro astma ve finské a francouzsko-kanadské populaci (Laitinen et al. 2001). GPRA se vyskytuje ve dvou hlavních izoformách (Kere 2005) s alternativně sestříhaným 3' exonem (371 aminokyselina pro izoformu A a 377 aminokyselina pro izoformu B). Exprese GPRA-B izoformy v plicích se liší mezi astmatiky a zdravými jedinci. Při tomto porovnání byla pouze u astmatiků zvýšená hladina izoformy B, a to v buňkách hladkých svalů dýchacích cest a epiteliálních buňkách.

Bylo nalezeno několik haplotypů a SNP tomto genu, které byly asociovány se zvýšenou hladinou IgE, astmatem a atopií (Laitinen et al. 2001). Rizikové haplotypy se v různých populacích lišily.

Studium dětí z pěti západoevropských zemí vedlo k objevení haplotypů H1, H5 a H6, asociovaných s alergickou senzitivací, a haplotypu H1, který je asociován s alergickým astmatem (Melen et al. 2005). Kormann et al. (Kormann et al. 2005) se zabývali polymorfizmy v GPRA genu asociované s astmatem, BHR a zvýšenou koncentrací IgE v německé populaci.

Při genotypizaci a analýze dvaceti sedmi GPRA polymorfizmů v mexické populaci nebyla nalezena žádná asociace s astmatem nebo atopií (Wu et al. 2008).

PHD finger protein 11 (PHF11)

Y. Zhang a kolegové (Zhang et al. 2003) se zabývali lokusem kontrolujícím kvantitativní znaky na chromozomu 13q14 a našli asociaci mezi hladinou celkového IgE v séru a mikrosatelitem USAT24GI. Další studie odhalily 3 polymorfizmy v genu PHF11, které jsou asociované s hladinou IgE: dva v intronech a jeden v 3' nepřekládané oblasti (Huang 2005).

Přesná funkce genu PHF11 není známá, ale přítomnost dvou motivů zinkového prstu naznačuje, že by se mohl podílet na regulaci lymfocytů a imunoglobulinové syntéze.

ADAM 33 (A desintegrin and metalloproteinase domain)

Celogenomové skenování 460ti rodin bělošského původu z Velké Británie a Spojených států amerických vedlo k identifikaci lokusu na chromozomu 20p13, který je spojován s astmatem a BHR (Van Eerdewegh et al. 2002). Následný výzkum polymorfizmů v jednom nukleotidu ve 23 genech určil ADAM33 jako gen asociovaný s astmatem.

Proteiny ADAM obsahují disintegrinovou a metaloproteázovou doménu a vyskytují se na povrchu buněk. Tyto metaloproteinázy mají v aktivním místě navázaný atom zinku, aby mohly štěpit peptidové vazby jiných proteinů (Whittaker 2003). Jsou exprimovány v plicích fibroblastech a hladkých svalech průdušek (Vercelli 2003). Účastní se adheze buněk, jejich signalizace i proteolýzy. Předpokládá se, že ADAM proteiny hrají roli spíše v remodelaci dýchacích cest než v imunitně zprostředkovaném zánětu. Asociaci ADAM33 k astmatu potvrdila studie Powella et al. (Powell et al. 2004), a naopak neprokázala studie provedená v australské (Kedda et al. 2006) a mexické populaci (Lind et al. 2003).

Chitinase 3-like 1 (CHI3L1)

CHI3L1 je gen kódující “chitinase-like“ protein YKL-40 (též zvaný human cartilage glycoprotein 39 [HCgp39]). Tento protein narozdíl od pravých chitináz postrádá enzymatickou aktivitu. YKL-40 byl ve zvýšeném množství nalezen v séru a plicích pacientů s astmatem, u kterých hladiny proteinu pozitivně korelovaly s mírou astmatu, tloušťkou subepiteliální membrány a nepřímo s plicní funkcí (Chupp et al. 2007). Při zkoumání vlivu genetické varianty na hladinu proteinu YKL-40 byla provedena celogenomová asociační studie členů Hutteritské komunity z Jižní Dakoty. Ober et al. (Ober et al. 2008) našli promotorový SNP (-131C/G) v CHI3L1 genu, který byl asociován se zvýšenou hladinou YKL-40, astmatem, BHR a hodnotami plicní funkce. Stejný SNP nebyl významně asociován s atopií a s hladinou celkového IgE. Konkrétně nositelé jedné nebo dvou kopií C alely měli vyšší hladinu YKL-40 v séru a byli náchylnější k astmatu. Naopak alela G vykazovala protektivní účinek.

Pro potvrzení těchto výsledků testovala stejná vědecká skupina dvě kohorty evropského původu. U obou skupin byla prevalence C alely vyšší u pacientů s astmatem v porovnání s kontrolami. Dále zjistili, že polymorfismus -131G je asociován s hladinou YKL-40 od narození do pěti let věku a naopak nepredikuje vznik astmatu u dětí v šesti letech věku.

Jako další zmiňují předpokládané kandidátní geny o známé funkci, která je určitým způsobem spojuje s imunitní reakcemi.

β podjednotka vysokoafinního IgE receptoru (FCERIB)

FCERIB se nachází na povrchu žírných buněk a bazofilů. Po navázání molekul IgE na tento receptor dojde k sekreci mediátorů včetně IL-4. Mutace v FCERIB genu mohou pozměnit produkci IL-4 a následně hladinu IgE. FCERIB se skládá ze sedmi exonů a šesti intronů. Sekvenování kódujících oblastí podjednotky vysokoafinního IgE receptoru odhalilo dva polymorfizmy v exonu 6 (L181I a L183V), které jsou asociovány s atopickým astmatem a atopií ve vzorku britské a australské populace (Traherne et al. 2003). Studie Hilla et al. (Hill et al. 1995) uvádí maternální dědičnost obou těchto variant, přestože tyto alely nebyly v australské populaci běžné.

Další kódující polymorfizmus E237G byl nalezen v exonu sedm u 5,3 % vzorku australské populace (Hill and Cookson 1996). Jedinci s touto variantou měli výrazně vyšší bronchiální reaktivitu a zvýšené riziko vzniku astmatu. Samantha Green et al. (Green et al. 1998) objevila mutaci E237G asociovanou s BHR u astmatiků z Jižní Afriky. Prevalence daného polymorfizmu byla větší u astmatiků v černošské populaci než v bělošské. Následující studie neprokázaly asociaci z žádným polymorfizmem: Dickson et al. 1999; Deichmann et al. 1999.

Alfa řetězec receptoru T lymfocytů (TCR) a human leukocyte antigen-DR (HLA-DR)

Polymorfizmy v genu, který kóduje alfa řetězec TCR, mají vliv na periferní repertoár receptorů T lymfocytů (Loveridge et al. 1991) a mohou ovlivnit imunitní odpověď k antigenu. Vazba specifické IgE odpovědi k TCR- α/δ lokusu (nikoliv k β -TCR) na chromozomu 14 byla stanovena ve dvou skupinách zkoumaných subjektů (Moffatt and Cookson 1997a). TCR- α/δ oblast obsahuje mnoho částí, které mohou ovlivňovat rozpoznání specifických antigenů. Lokalizace těchto částí závisí na asociacích mezi specifickými alelami a IgE odpovědí. Byla nalezena silná asociace mezi alelou 2 Va8.1 polymorfizmu (Va8.1*2) a reaktivitou na roztočce Der p 2 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) a pouze slabá asociace k Der p 1. Tato asociace byla pozorována pouze u HLA-DRB1*1501 a zároveň Va8.1*2 pozitivních jedinců (Moffatt and Cookson 1997a). To naznačuje, že vzájemné působení těchto dvou variací modifikuje odpověď k exogenním antigenům.

Tumor necrosis factor α (TNF α)

Ve vzdálenosti zhruba 5 cM od HLA-D leží gen kódující tumor necrosis factor α , což je důležitý prozánětlivý cytokin. Moffatt a Cookson (Moffatt and Cookson 1997b) zkoumali asociaci astmatu a polymorfizmu v TNF genu v 88 rodinách. Astma bylo detekováno u

jedinců s alelou 1 LTα *NcoI* polymorfizmem (LTα *NcoI**1) a alelou 2 TNF-308 polymorfizmem (TNF-308* 2). Tato asociace astmatu byla omezena na LTα *NcoI**1/ TNF-308* 2 haplotyp, takže není možno rozlišovat mezi působením alely LTα *NcoI* a TNF-308. Z těchto výsledků vyplývá, že genotypy ovlivněné zvýšenou sekrecí TNF jsou asociovány se zvýšeným rizikem astmatu.

Asociaci polymorfizmů LTα *NcoI* a TNF-308 k astmatu, atopii, BHR a celkovému IgE nepodpořila studie italské populace (Trabetti et al. 1999).

Jiný polymorfizmus (C-863A) v promotorové oblasti TNF-α byl asociován s nízkou hladinou TNFα v séru (Skoog et al. 1999).

Interleukin 4 (IL-4)

Interleukin 4 hraje důležitou roli v syntéze IgE tím, že aktivuje pre-T pomocné lymfocyty, které se následně diferencují na T_H2 a spouštějí izotypový přesmyk IgM/IgG na IgE v B buňkách. Lze tedy předpokládat, že zvýšená exprese IL-4 vede k rozvoji atopických onemocnění.

Gen kódující tento cytokin se nachází v již zmíněném lokusu 5q23-31. V roce 1995 Rosenwasser et al. popsali funkční polymorfizmus v oblasti promotoru IL-4 (konkrétně -590C/T), který je asociován se zvýšenou hladinou IgE v séru astmatických jedinců (Hoffjan and Ober 2002).

Asociace stejného polymorfizmu se specifickým IgE a sípitem byla slabě podpořena studií australské populace (Walley and Cookson 1996) a potvrzena pro AD u japonské populace (Kawashima et al. 1998) a pro alergické astma u íránské populace (Hosseini-Farahabadi et al. 2007).

Basehore et al. (Basehore et al. 2004) zkoumali SNPs u astmatiků bělošského, afro-amerického a hispánského původu. Podařilo se jim identifikovat devět polymorfizmů asociovaných s regulací celkového IgE a pět SNP asociovaných s astmatem pouze v bělošské populaci. Dále se zaměřili na frekvenci haplotypů, která se mezi populacemi značně lišila. Vyhodnocení tří haplotypů běžných u bělošské populace odhalilo, že pouze polymorfizmus 3017G/T byl konkordantní s hladinou celkového IgE v séru. Burchard et al. (Burchard et al. 1999) se zabývali porovnáním genotypů na lokusu C-589T u pacientů s astmatem bělošského a afro-amerického původu. Pouze jedinci bělošského původu s homozygotním TT genotypem vykazovali sníženou hodnotu FEV₁ (jednovteřinová vitální kapacita plic). Značný počet studií však s prokázáním asociace k variacím v IL-4 genu neuspěl (Elliott et al. 2001; Walley and Cookson 1996; Liu et al. 2003).

Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin 10, lokalizovaný na lidském chromozomu 1q32.1, inhibuje u T_H1 a T_H2 lymfocytů syntézu cytokinů a navozuje antigenně-specifickou toleranci. Hladina interleukinu 10 může být snížena v případě atopických onemocnění a zintenzivnit tak zánětlivou reakci. Snížená produkce IL-10 byla nalezena u astmatiků v porovnání s kontrolami (Borish et al. 1996). Vystavením IL-10 se inhibují B buňky produkující IgE. Podle Denverské studie interleukinu 10, provedené u astmatiků a zdravých jedinců, Borish a jeho kolegové identifikovali záměnu C-A bazí (Hobbs et al. 1998). Tento polymorfismus byl asociován se zvýšenou hladinou celkového IgE u homozygotních i heterozygotních jedinců.

Interleukin 13 (IL-13)

Interleukin 13 je zajímavý pro svou souvislost s IL-4. Oba patří mezi cytokiny produkované T_H2 buňkami a spouští izotypový přesmyk v B buňkách. Interleukin 13 hraje důležitou roli v patogenezi astmatu nezávisle na IL-4. Gen kódující IL-13 leží na chromozomu 5q31, který je spojován s astmatem a příbuznými fenotypy, což prokázaly mnohé vazebné studie (Postma et al. 2005; Noguchi et al. 1997; Martinez et al. 1998). Společnou komponentou pro oba interleukiny je alfa řetězec receptoru pro IL4 (IL4RA). Howard et al. (Howard et al. 2002b) se zabývali vzájemným působením těchto genů. Zjistili, že jedinci, kteří jsou nositeli homozygotní Ser478 IL4RA alely a alely -1111T IL-13, mají skoro pětkrát větší riziko vzniku astmatu v porovnání s ostatními genotypy.

Van der Pouw Kraan et al. (van der Pouw Kraan et al. 1999) poprvé popsali polymorfismus -1050C>T (v jiných studiích odpovídá pozici -1111 nebo -1112), který byl asociován s alergickým astmatem, BHR (Howard et al. 2002a), atopií a zvýšeným IgE (Liu et al. 2000; Graves et al. 2000; Liu et al. 2003).

Heinzmann et al. (Heinzmann et al. 2000) ve své studii objevili kódující variantu na pozici 110 (Gln110Arg), která má vliv na hladinu interleukinu 13 v séru a určitý dopad na interakce ligand-receptor. Tato záměna byla v Heinzmannově studii britské a japonské populace asociována s astmatem. Naopak žádná asociace nebyla potvrzena v populaci Hutteritů (Ober et al. 2000).

Transforming growth factor beta (TGFB1)

Denverská skupina objevila několik polymorfizmů v oblasti promotoru tohoto genu. Pouze polymorfismus v promotoru TGF β 1 byl asociován se zvýšeným IgE v séru (Hobbs et al. 1998).

RANTES/CCL5

RANTES je jedním z nejvíce studovaných cytokinů od doby určení vazby astmatu na chromozom 17p12-17q11.2 (CSGA 1997). Na tomto lokusu se nachází kluster C-C chemokinů a předpokládalo se, že by se jeho mutace mohly podílet na patogenezi astmatu a příbuzných fenotypů. RANTES je chemokin z rodiny A, který funguje jako účinný chemoatraktant pro lymfocyty, monocyty, eosinofily a bazofily (Kameyoshi et al. 1992). Nickel et al. (Nickel et al. 2000) identifikovali bodovou mutaci A-401G v oblasti promotoru genu RANTES. Tento polymorfismus se vyskytoval s vyšší frekvencí u jedinců afrického původu a byl asociován s atopickou dermatitis. Další SNP, konkrétně A-403G, identifikovala studie Fryera et al. (Fryer et al. 2000), provedená na jednotlivcích bělošského původu. Bylo zjištěno, že nositelé homozygotní alely mají zvýšené riziko obstrukce dýchacích cest. Z daných výsledků lze vyvodit, že tento polymorfismus má vliv na vývoj atopie a astmatu.

Clara cell protein (CC16/CC10)

CC16 gen kóduje Clara cell 16 kDa protein a nachází se 3 megabáze od FCER1B na chromozomu 11. Jako první se tímto genem zabývali Hay et al. (Hay et al. 1995), v této studii je však analogicky pojmenován CC10. Zjistili, že produkt tohoto genu je exprimován v neobrvených epitelálních buňkách dýchacích cest. Produkce CC16 je snížena působením glukokortikoidů a protein sám o sobě inhibuje fosfolipázu A₂, která aktivuje dráhu vedoucí k syntéze prostaglandinů a leukotrienů (Boguniewicz and Hayward 1996). Hay a spolupracovníci navrhli asociaci tohoto genu k astmatu.

Australská skupina vědců provedla screening tří exonů CC16 a našla polymorfismus na pozici 38 (A38G), který asociovala s astmatem (Laing et al. 1998; Laing et al. 2000).

IL-4 receptor (IL4R)

První polymorfismus genu kódujícího α podjednotku IL-4 receptoru na chromozomu 16 identifikovali Hershey et al. (Hershey et al. 1997). U pacientů s hyper-IgE syndromem objevili funkční variaci na pozici 576 (Q576R). Vyskytovala se u čtyř ze sedmi pacientů s AD a u třinácti z dvaceti pacientů s atopií. Mutace R576 predisponuje své nositele k alergickým

onemocněním tak, že pozmění funkci IL-4 receptoru. Tato alela byla spojována se zvýšenou expresí CD23, což nebylo potvrzeno v jiné studii (Risma et al. 2002).

Německá skupina se zaměřila na čtyři polymorfizmy lokalizované v intracelulární části IL-4R α . Podařilo se jí určit asociaci dvou polymorfizmů (Q576R a S503P) s nízkou hladinou celkového IgE (Kruse et al. 1999).

Mitsuyasu et al. (Mitsuyasu et al. 1999) identifikovali mutaci Val50Ile v receptoru pro IL-4. Frekvence varianty Ile50 byla vyšší než Val50 u pacientů s atopickým astmatem a korelovala s hladinou celkového IgE v séru a s hladinou specifického IgE proti roztočům. Tato mutace také přispívá ke zvýšení syntézy IgE.

β_2 - adrenergní receptor (ADRB2)

Gen kódující ADRB2 se nachází na dlouhém raménku chromozomu 5q32. Tento receptor je cílem pro ligandy používané k léčbě akutní bronchokonstrikce u astmatiků. Je exprimován na žírných buňkách v plicích a hladkých svalech průdušek. Bylo popsáno devět mutací, z nichž čtyři jsou výsledkem bodových mutací: Arg16Gly, Gln27Glu, Val34Met a Thr164Ile (Anderson and Cookson 1999).

Asociace fenotypů k těmto polymorfizmům jsou často protichůdné. Přestože byla u Hutteritů na lokusu 5q23-31 nalezena vazba k astmatu, nemůže být tento fenotyp asociován s variacemi v ADRB2 genu (Summerhill et al. 2000). Turki et al. (Turki et al. 1995) však demonstrovali poměrně vysokou frekvenci alely Gly16 u tzv. nočních astmatiků. Takto postiženým lidem se zhoršují příznaky astmatu v noci.

Asociace mezi polymorfizmem Gln27Glu a zvýšenou hladinou IgE v séru byla nalezena v Southamptonské populaci (Dewar et al. 1997). Italské skupině vědců se podařilo replikovat asociaci mezi genotypem Gly16-Gln27 a BHR, ale žádnou s koncentrací IgE (D'Amato et al. 1998).

7. Závěr

V současnosti se poziční klonování v kombinaci s testováním kandidátních genů (pozičně kandidátní metody) zdají být nejlepším řešením pro pochopení atopických onemocnění. I přes redukcionistický přístup se jeví jako nejpraktičtější postupy pro vyhledávání genů kontrolujících vznik onemocnění. Strategie budoucích studií zahrnuje testy dosud popsanych kandidátních lokusů a genů a identifikaci nových vhodných kandidátních genů. Nalezení kontrolních lidských genů může pomoci předvídat průběh choroby u jednotlivých pacientů a tím přispěje k účinnější a cílenější terapii a prevenci.

Nejběžnějšími způsoby léčby atopických symptomů jsou profylaxe (snaha vyhnout se alergenů) a použití farmak, která např. blokují receptory pro histamin (antihistaminika), inhibují syntézu histaminu a působí protizánětlivě (kortikoidy) nebo inhibují degranulaci ovlivněním vlastností membrány mastocytů (kromoglykát). Částečně úspěšné jsou pokusy o kauzální léčbu- tzv. alergenovou imunoterapii (hyposenzibilizaci) pacientů. Při ní se podávají zvyšující se dávky alergenů nebo části alergenů, proti nimž pacienti reagují. Při vhodném způsobu aplikace lze zřejmě dosáhnout stimulace konkurenční T_H1 odpovědi, která inhibuje alergenní T_H2 buňky a blokuje syntézu IgE.

Další studium genetiky a buněčných mechanismů pomůže pochopit podstatu etiologie a patogeneze atopických onemocnění. Mnoho problémů, které komplikují lidské genetické studie může být překonáno použitím myšího modelu, kde jsou homologické geny mutovány jak u myši, tak u člověka.

8. Použitá literatura

- (1997) A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *Nat Genet* 15: 389-92
- Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, Bhattacharyya S, Tinsley J, Zhang Y, Holt R, Jones EY, Lench N, Carey A, Jones H, Dickens NJ, Dimon C, Nicholls R, Baker C, Xue L, Townsend E, Kabesch M, Weiland SK, Carr D, von Mutius E, Adcock IM, Barnes PJ, Lathrop GM, Edwards M, Moffatt MF, Cookson WO (2003) Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet* 35: 258-63
- Altmuller J, Seidel C, Lee YA, Loesgen S, Bulle D, Friedrichs F, Jellouschek H, Kelber J, Keller A, Schuster A, Silbermann M, Wahlen W, Wolff P, Schlenvoigt G, Ruschendorf F, Nurnberg P, Wjst M (2005) Phenotypic and genetic heterogeneity in a genome-wide linkage study of asthma families. *BMC Pulm Med* 5: 1
- Anderson GG, Cookson WO (1999) Recent advances in the genetics of allergy and asthma. *Mol Med Today* 5: 264-73
- Barnes KC (2000) Evidence for common genetic elements in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 106: S192-200
- Barnes KC, Marsh DG (1998) The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 19: 325-32
- Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, Harkins MS, Meyers DA, Bleeker ER (2004) A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol* 114: 80-7
- Bleeker ER, Postma DS, Meyers DA (1997) Evidence for multiple genetic susceptibility loci for asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156: S113-6
- Boguniewicz M, Hayward A (1996) Atopy, airway responsiveness, and genes. *Thorax* 51 Suppl 2: S55-9
- Borecki IB, Rao DC, Lalouel JM, McGue M, Gerrard JW (1985) Demonstration of a common major gene with pleiotropic effects on immunoglobulin E levels and allergy. *Genet Epidemiol* 2: 327-38
- Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S (1996) Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 97: 1288-96
- Brauer M, Hoek G, Van Vliet P, Meliefste K, Fischer PH, Wijga A, Koopman LP, Neijens HJ, Gerritsen J, Kerkhof M, Heinrich J, Bellander T, Brunekreef B (2002) Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1092-8
- Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, Weiss ST, Hasday J, Lilly CM, Ford JG, Drazen JM (1999) Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 919-22
- Cakir M, Akcay S, Karakas T, Gedik Y, Okten A, Orhan F (2008) Prevalence of atopy in children with type 1 diabetes mellitus, hepatitis B virus carriers, and healthy children: role of T helper 1 (Th1)-type immune response. *Allergy Asthma Proc* 29: 166-70
- Cline MG, Burrows B (1989) Distribution of allergy in a population sample residing in Tucson, Arizona. *Thorax* 44: 425-31

- Cookson WO, Hopkin JM (1988) Dominant inheritance of atopic immunoglobulin-E responsiveness. *Lancet* 1: 86-8
- Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM (1989) Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1: 1292-5
- Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Nakumuura Y, et al. (1992) Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 340: 381-4
- D'Amato M, Vitiani LR, Petrelli G, Ferrigno L, di Pietro A, Trezza R, Matricardi PM (1998) Association of persistent bronchial hyperresponsiveness with beta2-adrenoceptor (ADRB2) haplotypes. A population study. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1968-73
- Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO (1996) A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383: 247-50
- Deichmann KA, Starke B, Schlenther S, Heinzmann A, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J (1999) Linkage and association studies of atopy and the chromosome 11q13 region. *J Med Genet* 36: 379-82
- Dewar JC, Wilkinson J, Wheatley A, Thomas NS, Doull I, Morton N, Lio P, Harvey JF, Liggett SB, Holgate ST, Hall IP (1997) The glutamine 27 beta2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families. *J Allergy Clin Immunol* 100: 261-5
- Dickson PW, Wong ZY, Harrap SB, Abramson MJ, Walters EH (1999) Mutational analysis of the high affinity immunoglobulin E receptor beta subunit gene in asthma. *Thorax* 54: 409-12
- Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, Charpin D, Degioanni A, Gormand F, Grimfeld A, Hochez J, Hyne G, Lockhart A, Luillier-Lacombe M, Matran R, Meunier F, Neukirch F, Pacheco Y, Parent V, Paty E, Pin I, Pison C, Scheinmann P, Thobie N, Vervloet D, Kauffmann F, Feingold J, Lathrop M, Demenais F (2000) Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1812-8
- Dizier MH, Bouzigon E, Guilloud-Bataille M, Genin E, Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Demenais F (2007) Evidence for a locus in 1p31 region specifically linked to the comorbidity of asthma and allergic rhinitis in the EGEA study. *Hum Hered* 63: 162-7
- Elliott K, Fitzpatrick E, Hill D, Brown J, Adams S, Chee P, Stewart G, Fulcher D, Tang M, Kemp A, King E, Varigos G, Bahlo M, Forrest S (2001) The -590C/T and -34C/T interleukin-4 promoter polymorphisms are not associated with atopic eczema in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 108: 285-7
- Feijen M, Gerritsen J, Postma DS (2000) Genetics of allergic disease. *Br Med Bull* 56: 894-907
- Fryer AA, Spiteri MA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC, Makki R, Tavernier G, Smilie FI, Custovic A, Woodcock AA, Ollier WE, Hajeer AH (2000) The -403 G-->A promoter polymorphism in the RANTES gene is associated with atopy and asthma. *Genes Immun* 1: 509-14
- Gerrard JW, Rao DC, Morton NE (1978) A genetic study of immunoglobulin E. *Am J Hum Genet* 30: 46-58
- Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritsch C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD (2000) A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 105: 506-13
- Green SL, Gaillard MC, Song E, Dewar JB, Halkas A (1998) Polymorphisms of the beta chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (Fepsilon RI-beta) in South

- African black and white asthmatic and nonasthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1487-92
- Gusareva ES, Bragina EJ, Deeva EV, Kazakevich NV, Puzyrev VP, Ogorodova LM, Lipoldova M (2006) Cat is a major allergen in patients with asthma from west Siberia, Russia. *Allergy* 61: 509-10
- Haagerup A, Bjerke T, Schiøtz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA (2002) Asthma and atopy - a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy* 57: 680-6
- Hay JG, Danel C, Chu CS, Crystal RG (1995) Human CC10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease. *Am J Physiol* 268: L565-75
- Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimazu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaichi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T, Deichmann KA (2000) Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 9: 549-59
- Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA (1997) The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 337: 1720-5
- Hill MR, Cookson WO (1996) A new variant of the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI-beta E237G): associations with measures of atopy and bronchial hyper-responsiveness. *Hum Mol Genet* 5: 959-62
- Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, le Souef P, Musk AW, Cookson WO (1995) Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ* 311: 776-9
- Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Ohnuma N, Kodama N, Kojima J, Ohe M, Kawakami Y (1995) Association between high serum total IgE levels and D11S97 on chromosome 11q13 in Japanese subjects. *J Med Genet* 32: 363-9
- Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L (1998) Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1958-62
- Hoffjan S, Ober C (2002) Present status on the genetic studies of asthma. *Curr Opin Immunol* 14: 709-17
- Hosseini-Farahabadi S, Tavakkol-Afshari J, Rafatpanah H, Farid Hosseini R, Khaje Daluei M (2007) Association between the polymorphisms of IL-4 gene promoter (-590C>T), IL-13 coding region (R130Q) and IL-16 gene promoter (-295T>C) and allergic asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 6: 9-14
- Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, Bleecker ER (2002a) Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet* 70: 230-6
- Howard TD, Postma DS, Hawkins GA, Koppelman GH, Zheng SL, Wysong AK, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER (2002b) Fine mapping of an IgE-controlling gene on chromosome 2q: Analysis of CTLA4 and CD28. *J Allergy Clin Immunol* 110: 743-51
- Huang JL (2005) Asthma severity and genetics in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 38: 158-63
- Huurre A, Laitinen K, Rautava S, Korkeamaki M, Isolauri E (2008) Impact of maternal atopy and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: a double-blind placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy*
- Chagani T, Pare PD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, Fitzgerald JM, Sandford AJ (1999) Prevalence of tumor necrosis factor-alpha and angiotensin converting enzyme

- polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 278-82
- Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M, Elias JA (2007) A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 357: 2016-27
- Jarvis D, Burney P (1998) ABC of allergies. The epidemiology of allergic disease. *BMJ* 316: 607-10
- Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM (1992) Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176: 587-92
- Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otsuka F, Hamaguchi H (1998) Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 35: 502-4
- Kedda MA, Duffy DL, Bradley B, O'Hehir RE, Thompson PJ (2006) ADAM33 haplotypes are associated with asthma in a large Australian population. *Eur J Hum Genet* 14: 1027-36
- Kere J (2005) Mapping and identifying genes for asthma and psoriasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1551-61
- Kimura K, Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Yokouchi Y, Takeda K, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, Hamaguchi H (1999) Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population. *Hum Mol Genet* 8: 1487-90
- Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS (2002) Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109: 498-506
- Kormann MS, Carr D, Klopp N, Illig T, Leupold W, Fritsch C, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M (2005) G-Protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large German population. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1358-62
- Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA (1999) The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 96: 365-71
- Kurz T, Altmueller J, Strauch K, Ruschendorf F, Heinzmann A, Moffatt MF, Cookson WO, Inacio F, Nurnberg P, Stassen HH, Deichmann KA (2005) A genome-wide screen on the genetics of atopy in a multiethnic European population reveals a major atopy locus on chromosome 3q21.3. *Allergy* 60: 192-9
- Laing IA, Goldblatt J, Eber E, Hayden CM, Rye PJ, Gibson NA, Palmer LJ, Burton PR, Le Souef PN (1998) A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma. *J Med Genet* 35: 463-7
- Laing IA, Hermans C, Bernard A, Burton PR, Goldblatt J, Le Souef PN (2000) Association between plasma CC16 levels, the A38G polymorphism, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 124-7
- Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petays T, Green T, Cargill M, Hahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ, Kere J (2001) A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 28: 87-91
- Laitinen T, Kauppi P, Ignatius J, Ruotsalainen T, Daly MJ, Kaariainen H, Kruglyak L, Laitinen H, de la Chapelle A, Lander ES, Laitinen LA, Kere J (1997) Genetic control of serum IgE levels and asthma: linkage and linkage disequilibrium studies in an isolated population. *Hum Mol Genet* 6: 2069-76

- Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-48
- Lawrence S, Beasley R, Doull I, Begishvili B, Lampe F, Holgate ST, Morton NE (1994) Genetic analysis of atopy and asthma as quantitative traits and ordered polychotomies. *Ann Hum Genet* 58: 359-68
- Lee YA, Wahn U, Kehrt R, Tarani L, Businco L, Gustafsson D, Andersson F, Oranje AP, Wolkertstorfer A, v Berg A, Hoffmann U, Kuster W, Wienker T, Ruschendorf F, Reis A (2000) A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat Genet* 26: 470-3
- Lewis SA (1998) Infections in asthma and allergy. *Thorax* 53: 911-2
- Lind DL, Choudhry S, Ung N, Ziv E, Avila PC, Salari K, Ha C, Lovins EG, Coyle NE, Nazario S, Casal J, Torres A, Rodriguez-Santana JR, Matallana H, Lilly CM, Salas J, Selman M, Boushey HA, Weiss ST, Chapela R, Ford JG, Rodriguez-Cintron W, Silverman EK, Sheppard D, Kwok PY, Gonzalez Burchard E (2003) ADAM33 is not associated with asthma in Puerto Rican or Mexican populations. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1312-6
- Liu X, Beaty TH, Deindl P, Huang SK, Lau S, Sommerfeld C, Fallin MD, Kao WH, Wahn U, Nickel R (2003) Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J Allergy Clin Immunol* 112: 382-8
- Liu X, Nickel R, Beyer K, Wahn U, Ehrlich E, Freidhoff LR, Bjorksten B, Beaty TH, Huang SK (2000) An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90). *J Allergy Clin Immunol* 106: 167-70
- Los H, Postmus PE, Boomsma DI (2001) Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin Res* 4: 81-93
- Loveridge JA, Rosenberg WM, Kirkwood TB, Bell JI (1991) The genetic contribution to human T-cell receptor repertoire. *Immunology* 74: 246-50
- Mansur AH, Bishop DT, Markham AF, Morton NE, Holgate ST, Morrison JF (1999) Suggestive evidence for genetic linkage between IgE phenotypes and chromosome 14q markers. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1796-802
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH (1994) Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264: 1152-6
- Martinez FD, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Wright AL, Taussig LM (1994) Evidence for Mendelian inheritance of serum IgE levels in Hispanic and non-Hispanic white families. *Am J Hum Genet* 55: 555-65
- Martinez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M, Erickson RP (1998) Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1739-44
- Melen E, Bruce S, Doekes G, Kabesch M, Laitinen T, Lauener R, Lindgren CM, Riedler J, Scheynius A, van Hage-Hamsten M, Kere J, Pershagen G, Wickman M, Nyberg F (2005) Haplotypes of G protein-coupled receptor 154 are associated with childhood allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1089-95
- Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, Bleecker ER (1994) Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 23: 464-70
- Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K

- (1999) Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 162: 1227-31
- Moffatt MF, Cookson WO (1997a) Linkage and candidate gene studies in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156: S110-2
- Moffatt MF, Cookson WO (1997b) Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet* 6: 551-4
- Moffatt MF, Faux JA, Lester S, Pare P, McCluskey J, Spargo R, James A, Musk AW, Cookson WO (2003) Atopy, respiratory function and HLA-DR in Aboriginal Australians. *Hum Mol Genet* 12: 625-30
- Moffatt MF, Schou C, Faux JA, Abecasis GR, James A, Musk AW, Cookson WO (2001) Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample. *Eur J Hum Genet* 9: 341-6
- Morar N, Bowcock AM, Harper JI, Cookson WO, Moffatt MF (2006) Investigation of the chromosome 17q25 PSORS2 locus in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126: 603-6
- Nickel RG, Casolaro V, Wahn U, Beyer K, Barnes KC, Plunkett BS, Freidhoff LR, Sengler C, Plitt JR, Schleimer RP, Caraballo L, Naidu RP, Levett PN, Beaty TH, Huang SK (2000) Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES. *J Immunol* 164: 1612-6
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* 5: 1075-80
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miyamoto T, Kawashima T, Kobayashi K, Hamaguchi H (1997) Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1390-3
- Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Pettersson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Parry R (1998) Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum Mol Genet* 7: 1393-8
- Ober C, Tan Z, Sun Y, Possick JD, Pan L, Nicolae R, Radford S, Parry RR, Heinzmann A, Deichmann KA, Lester LA, Gern JE, Lemanske RF, Jr., Nicolae DL, Elias JA, Chupp GL (2008) Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 358: 1682-91
- Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ (2000) A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 67: 1154-62
- Palmer LJ, Cookson WO (2001) Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma. *Respir Res* 2: 102-12
- Palmer LJ, Daniels SE, Rye PJ, Gibson NA, Tay GK, Cookson WO, Goldblatt J, Burton PR, LeSouef PN (1998) Linkage of chromosome 5q and 11q gene markers to asthma-associated quantitative traits in Australian children. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1825-30
- Palmer LJ, Pare PD, Faux JA, Moffatt MF, Daniels SE, LeSouef PN, Bremner PR, Mockford E, Gracey M, Spargo R, Musk AW, Cookson WO (1997) Fc epsilon R1-beta polymorphism and total serum IgE levels in endemically parasitized Australian aborigines. *Am J Hum Genet* 61: 182-8
- Pillai SG, Chiano MN, White NJ, Speer M, Barnes KC, Carlsen K, Gerritsen J, Helms P, Lenney W, Silverman M, Sly P, Sundy J, Tsanakas J, von Berg A, Whyte M, Varsani

- S, Skelding P, Hauser M, Vance J, Pericak-Vance M, Burns DK, Middleton LT, Brewster SR, Anderson WH, Riley JH (2006) A genome-wide search for linkage to asthma phenotypes in the genetics of asthma international network families: evidence for a major susceptibility locus on chromosome 2p. *Eur J Hum Genet* 14: 307-16
- Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, Meyers DA, Levitt RC (1995) Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 333: 894-900
- Postma DS, Meyers DA, Jongepier H, Howard TD, Koppelman GH, Bleecker ER (2005) Genomewide screen for pulmonary function in 200 families ascertained for asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 446-52
- Powell RM, Wicks J, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE (2004) The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 13-21
- Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Ericksen MB, Bernstein JA, Chakraborty R, Hershey GK (2002) V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol* 169: 1604-10
- Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Pare PD (2000) Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 106: 135-40
- Sano K, Tanihara H, Heimark RL, Obata S, Davidson M, St John T, Taketani S, Suzuki S (1993) Protocadherins: a large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J* 12: 2249-56
- Sheikh A (2002) Itch, sneeze and wheeze: the genetics of atopic allergy. *J R Soc Med* 95: 14-7
- Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K, Hopkin J (1996) Association between atopic asthma and a coding variant of Fc epsilon RI beta in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 5: 1129-30
- Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A (1999) A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol Genet* 8: 1443-9
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259-60
- Summerhill E, Leavitt SA, Gidley H, Parry R, Solway J, Ober C (2000) beta(2)-adrenergic receptor Arg16/Arg16 genotype is associated with reduced lung function, but not with asthma, in the Hutterites. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 599-602
- Tager IB (1998) Smoking and childhood asthma--where do we stand? *Am J Respir Crit Care Med* 158: 349-51
- Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae D, Ober C (2007) Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 81: 829-34
- Trabetti E, Cusin V, Malerba G, Martinati LC, Casartelli A, Boner AL, Pignatti PF (1998) Association of the Fc epsilon RI beta gene with bronchial hyper-responsiveness in an Italian population. *J Med Genet* 35: 680-1
- Trabetti E, Patuzzo C, Malerba G, Galavotti R, Martinati LC, Boner AL, Pignatti PF (1999) Association of a lymphotoxin alpha gene polymorphism and atopy in Italian families. *J Med Genet* 36: 323-5
- Traherne JA, Hill MR, Hysi P, D'Amato M, Broxholme J, Mott R, Moffatt MF, Cookson WO (2003) LD mapping of maternally and non-maternally derived alleles and atopy in Fc epsilon RI-beta. *Hum Mol Genet* 12: 2577-85

- Turki J, Pak J, Green SA, Martin RJ, Liggett SB (1995) Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest* 95: 1635-41
- van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeijs LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA, van der Zee JS (1999) An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* 1: 61-5
- Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benchekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP (2002) Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418: 426-30
- Vercelli D (2003) Genetic polymorphism in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 15: 609-13
- Vondra V, Prazakova J, Reisoava M, Mazakova H, Baly J, Roth Z (1990) [Epidemiology of bronchial asthma and bronchial hyperreactivity]. *Cas Lek Cesk* 129: 714-8
- Walley AJ, Cookson WO (1996) Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet* 33: 689-92
- Warner JO (1999) Worldwide variations in the prevalence of atopic symptoms: what does it all mean? *Thorax* 54 Suppl 2: S46-51
- Waser M, Michels KB, Bieli C, Floistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrlander C (2007) Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37: 661-70
- Whittaker PA (2003) Genes for asthma: much ado about nothing? *Curr Opin Pharmacol* 3: 212-9
- Woszczek G, Kowalski ML, Borowiec M (2002) Association of asthma and total IgE levels with human leucocyte antigen-DR in patients with grass allergy. *Eur Respir J* 20: 79-85
- Wu H, Romieu I, Sienna-Monge JJ, del Rio-Navarro BE, Burdett L, Yuenger J, Li H, Chanock SJ, London SJ (2008) Lack of association between genetic variation in G-protein-coupled receptor for asthma susceptibility and childhood asthma and atopy. *Genes Immun* 9: 224-30
- Xu J, Postma DS, Howard TD, Koppelman GH, Zheng SL, Stine OC, Bleecker ER, Meyers DA (2000) Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am J Hum Genet* 67: 1163-73
- Young RP, Sharp PA, Lynch JR, Faux JA, Lathrop GM, Cookson WO, Hopkin JM (1992) Confirmation of genetic linkage between atopic IgE responses and chromosome 11q13. *J Med Genet* 29: 236-8
- Zhang J, Pare PD, Sandford AJ (2008) Recent advances in asthma genetics. *Respir Res* 9: 4
- Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, Ponting CP, Broxholme J, Holt R, Edser P, Bhattacharyya S, Dunham A, Adcock IM, Pulleyn L, Barnes PJ, Harper JI, Abecasis G, Cardon L, White M, Burton J, Matthews L, Mott R, Ross M, Cox R, Moffatt MF, Cookson WO (2003) Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet* 34: 181-6