

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Stanovenie polymorfizmov
génov asociovaných
s alergickou reakciou**

Dizertačná práca

MUDr. Marek Godava

Školiteľ: Mgr. Radek Vodička, Ph.D.

Olomouc 2013

Prehlásenie

Prehlasujem, že dizertačná práca bola vypracovaná samostatne pod vedením Mgr. Radka Vodičku, Ph.D. a v zozname literatúry sú uvedené všetky použité literárne a odborné zdroje.

V Olomouci dňa

Pod'akovanie

Rád by som pod'akoval predovšetkým môjmu školiteľovi Mgr. Radkovi Vodičkovi, Ph.D. za vedenie a cenné rady. Vrelá vďaka za odbornú pomoc patrí doc. RNDr. Radkovi Vrtělovi, Ph.D., prof. MUDr. Františkovi Kopřivovi, Ph.D. a prof. MUDr. Jiřímu Šantavému, CSc.

Vďaka za štatistickú analýzu patrí doc. RNDr. L. Duškovi, Ph.D. a jeho kolektívu, hlavne RNDr. Michaele Cvanovej. Ďalej sa chcem pod'akovať za podporu a pomoc celému DNA laboratóriu Ústavu Lékařské genetiky a fetální medicíny vo FN Olomouc.

Práca bola podporená grantovou agentúrou IGA MZ CZ, grantom č . NR8383-3/2005 a grantom č. NR8954-3/2006

Obsah:

Obsah:	4
1. Úvod	8
2. Charakteristika alergií	11
2.1 Imunopatologické reakcie	11
2.1.1 Humorálne imunopatologické reakcie.....	11
2.1.2 Imunopatologické reakcie mediované bunkami.....	13
2.2 Atopia	14
2.3 Alergény	15
2.4 Mechanizmy vedúce k tvorbe IgE protilátok	16
2.4.1 Senzibilizácia alergénom, tvorba Th2 lymfocytov.....	16
2.4.2 Signály vedúce k tvorbe IgE.....	18
2.4.3 Mechanizmus tvorby IgE.....	19
2.4.3.1 Antigénna špecifickosť - preskupovanie génov pre V_H a V_L domény imunoglobulínov.....	20
2.4.3.2 Isotypový priešmyk – terminálna diferenciacia B lymfocytu.....	23
2.5 Štruktúra IgE a signalizácia pomocou IgE	25
2.6 Fázy alergickej reakcie	28
2.6.1 Fáza senzibilizácie.....	28
2.6.2 Včasná a oneskorá fáza alergickej reakcie.....	29
2.7 Alergické choroby	29
2.7.1 Výskyt alergií.....	30
2.7.2 Asthma bronchiale.....	33
2.7.2.1 Výskyt.....	33
2.7.2.2 Etiopatogenéza astmy.....	33
2.7.2.3 Symptómy astmy.....	35
2.7.2.4 Klasifikácia astmy.....	37
2.7.2.5 Liečba astmy.....	38
2.7.3 Atopický ekzém.....	40
2.7.4 Ďalšie alergické ochorenia.....	41

3. Genetika alergií	42
3.1 Dedičnosť alergií	42
3.2 Prehľad genetických štúdií zameraných na výskyt astmy a atopie	45
3.2.1 Výskyt astmy a atopie vo vzťahu k HLA systému	45
3.2.2 Väzbové a celogenómové štúdie hľadajúce lokusy pre astmu a atopiu	48
3.2.3 Prehľad vybraných lokusov / kandidátskych génov ..	57
3.2.3.1 chromozóm 4	57
3.2.3.2. chromozóm 5	57
3.2.3.3 chromozóm 6	60
3.2.3.4 chromozóm 7p	62
3.2.3.5 chromozóm 11q	63
3.2.3.6 chromozóm 12q	64
3.2.3.7 chromozóm 13q	65
3.2.3.8 chromozóm 14q	66
3.2.3.9 chromozóm 19	66
3.2.3.10 chromozóm 20q	67
3.2.3.11 chromozóm Xq	68
3.3 Charakteristika vybraných kandidátskych génov ..	68
3.3.1 STAT6	69
3.3.1.1 Štruktúra STAT6	70
3.3.1.2 Štruktúra STAT6 proteínu	71
3.3.1.3 Funkcia STAT6 proteínu	73
3.3.1.4 Signálna dráha STAT6	74
3.3.1.5 Aktivácia transkripcie závislej na STAT6	77
3.3.1.6 Polymorfizmy v STAT6	79
3.3.2 ADAM33	81
3.3.2.1 Štruktúra ADAM33	81
3.3.2.2 Štruktúra ADAM33 proteínu	82
3.3.2.3 Isoformy ADAM33 a možné funkcie proteínu ADAM33	85
3.3.2.4 Polymorfizmy v ADAM33	91
4. Ciele dizertačnej práce	95
5. Materiál a metódy	96

5.1 Charakteristika sledovaných skupín	96
5.1.1 Posúdenie atopie v sledovaných skupinách	96
5.1.2 Posúdenie pľúcnych funkcií a BHR pomocou spirometrie	97
5.2 Genotypizácia	100
5.2.1 Izolácia DNA z leukocytov periférnej krvi Millerovou metódou	100
5.2.2 Sekvenácia	101
5.2.3 Genotypizácia s TaqMan sondami	107
5.3 Haplotypizácia	110
5.4 Štatistika	110
6. Výsledky	115
6.1 Polymorfizmy STAT6 a ADAM33 a ich vzťah k hladine celkových IgE a k výskytu astmy.	115
6.1.1 Charakteristika primárnych dát	115
6.1.2 Asociácia polymorfizmov s hladinou IgE a astmatickým fenotypom	115
6.2 Asociácia haplotypov s hladinou IgE.....	126
6.2.1 Distribúcia haplotypov v skúmaných skupinách	126
6.2.2 Haplotypy <i>STAT6</i> a hladina celkových IgE.....	126
6.2.2.1 Parentálny pôvod haplotypu a hladina celkových IgE	130
6.2.2.2 Pohlavie a hladina celkových IgE.....	131
6.2.2.3 Haplotypy <i>STAT6</i> a ich väzba na kategorizovanou hladinu IgE	131
6.2.3 Haplotypy <i>ADAM33</i> a hladina celkových IgE.....	134
6.3 Asociácia haplotypov s úrovňou BHR.....	134
6.3.1 Haplotypy <i>ADAM33</i> a bronchoprovokácie s histamínom	134
6.3.2 Haplotypy <i>ADAM33</i> a bronchoprovokácie s metacholínom	134
6.3.3 Vzťah haplotypov <i>STAT6</i> k BHR.....	139
7. Diskusia	141

8. Súhrn	157
9. Summary.....	159
10. Použité zkratky, vysvetlivky	161
11. Zoznam publikácií	163
12. Použitá literatúra.....	166

1. Úvod

Alergická reakcia je charakterizovaná neadekvátnou odpoveďou inak zdravých jedincov na neškodné vonkajšie antigény. Prejavom alergickej reakcie na klinickej úrovni sú alergické choroby (napr. astma, atopický ekzém a polinóza), ktorých výskyt v posledných dekádach výrazne stúpol. Pri opakovanej expozícii organizmu týmito antigénmi (alergénmi) dochádza k rozvoju zápalových zmien v tkanivách a orgánoch vedúcich nasledovne k poruchám ich funkcie a integrity¹.

Výskyt alergických chorôb je známy už pomerne dlhú dobu. Prvý popis choroby, ktorej symptómy by mohli odpovedať pochádza zo starovekej Číny (rok 2600 pred n.l.). O astme vieme tiež z Ebersovho staroegyptského papyrusu, kde jeden recept popisuje prípravu zmesi k inhalácii (16 str. pred n.l.). Ako medicínsky termín bola astma použitá až Hippokratesom v jeho diele Corpus Hippocraticum (približne v 4. storočie pred n.l.). Plínius st. (okolo roku 50 n.l.) si všimol vzťah peľov s výskytom dýchacích ťažkostí a ako liek odporučal látku na báze efedrínu rozpustenú vo víne. Henry Hyde Salder² už v roku 1860 vo svojom veľkom diele pojednávajúcom podrobne o astme napísal, že nemôže byť pochybností o tom, že astma je dedičným ochorením. Neskoršie štúdie výskytu častých alergických ochorení u dvojčiat odhalili, že dedičná predispozícia má dôležitú úlohu pri ich vzniku a ich heritabilita bola vyššia u monozygotných dvojčiek v porovnaní s dizygotnými^{3,4}. Štúdia dvojčiek z roku 2009 poukázala na to, že genetické faktory najsilnejšie ovplyvňujú hladinu IgE a vek nástupu alergického ochorenia⁵. V rodinách s výskytom alergického ochorenia nebol preukázaný jasný typ mendelovského dedičného prenosu a navyše vplyv vonkajšieho prostredia zohráva v etiopatogenéze týchto onemocnení taktiež dôležitú úlohu. Preto sa alergické choroby v dnešnej dobe považujú za choroby

s komplexnou dedičnosťou a okolité prostredie má vplyv na variabilitu a dobu prejavovania sa symptómov alergie⁶⁻⁹.

Nastavenie imunitného systému dieťaťa môže byť ovplyvnené už i prenatálne v dôsledku spôsobu života matky. Pravidelná expozícia matky prostrediu bohatému na mikrobiálne zložky bola spojená s protektívnym vplyvom proti atopickému senzibilizácii plodu v postnatálnom období¹⁰. Suplementácia kyselinou listovou v priebehu tehotenstva vo vzťahu k atopii a astme je ďalšou diskutovanou témou. Podľa záverov štúdie Whitrova a spol.¹¹ predstavovalo užívanie kyseliny listovej v 3. trimestri 1,25x vyššie riziko pre výskyt detskej astmy (v 3,5 roku) a 1,32x vyššie riziko pre rozvoj perzistujúcej astmy. Tieto výsledky boli v súlade s pozorovaniami u myši a dávali sa do súvislosti s epigenetickými vplyvmi – možné zvýšenie metylácie génov zodpovedných za vznik astmy. Sharland a spol.¹² zhodnotili výsledky štyroch predchádzajúcich observačných štúdií, a došli ku kontroverznému výsledku, nakoľko asociácia bola buď len mierna, alebo so suplementáciou folátmi v skoršej alebo pokročilejšej fáze gravidity. Bekkers a spol.¹³ naproti tomu, s výnimkou mierneho zvýšenia rizika pre skoré pískanie na prieduškách v roku života, nenašli zvýšené riziko výskytu respiračných alebo alergických problémov v spojitosti s prenatálnou suplementáciou kyselinou listovou. Fajčenie v gravidite je ďalším faktorom, ktorý bol spojený s výskytom astmy u detí¹⁴, pričom tento vplyv môže byť výraznejší u dcér žien fajčiacich v tehotenstve¹⁵, alebo u osôb nesúcich Arg16 alelu v géne pre β 2-adrenergický receptor¹⁶.

V roku 1989 bola po prvý krát popísaná väzba chromozómovej oblasti 11q13 s výskytom atopie¹⁷. Tento objav bol momentom, ktorý odštartoval revolúciu v štúdiu molekulovo genetickej podstaty alergických chorôb – zatiaľ čo v roku 1998 bolo známých 6 lokusov spojených s výskytom atopie, astmy alebo súvisiacich fenotypov, tak v roku 2008 Vercelli¹⁸ už referuje o viac než 200 kandidátskych génoch pre astma a súvisiace fenotypy identifikované pomocou rôznych prístupov. V nasledujúcich rokoch

pribudli ďalšie poznatky o molekulárne – genetickej podstate alergických chorôb na základe celogenómových asociačných štúdií (GWAS).

2. Charakteristika alergií

2.1 Imunopatologické reakcie

Každá imunologická reakcia prebiehajúca v organizme môže za určitých okolností viesť k menšiemu alebo väčšiemu poškodeniu organizmu. V prípade týchto okolností potom hovoríme o imunopatologickej reakcii. Táto môže byť do určitej miery i vedľajším následkom v priebehu bežných obranných reakcií organizmu proti patogénom či v dôsledku imunitnej reakcie proti antigénom telu vlastným (autoimunitné reakcie). V prípade alergie dochádza k neadekvátnej reakcii na antigény, ktoré sú bežne neškodné, tieto označujeme ako alergény.

Imunologické reakcie delíme podľa prevládajúcich mechanizmov na reakcie sprostredkované humorálne a bunkami. Pri rozvoji samotnej alergickej reakcie sa môže uplatniť prakticky ktorákoľvek zo základných typov imunologických reakcií, ktoré sa klasicky delia do 4 skupín podľa Coombsa a Gela. Toto klasické delenie však nezahŕňa všetky imunopatologické mechanizmy, ktoré v dnešnej dobe poznáme - bolo doplnené Roittom o reakcie antireceptorových protilátok. Súčasne k vzniku alergickej reakcie môže dochádzať aj kombináciou vyššie uvedených reakcií²⁰.

2.1.1 Humorálne imunopatologické reakcie

Reakcia I. typu – reakcia s účasťou IgE protilátok, atopia

Táto reakcia je najčastejšou a je charakteristická tvorbou IgE proti niektorým alergénom vonkajšieho prostredia, ako napr. peľové zrnká či potravinové alergie a pod. Je označovaná tiež ako precitlivenosť bezprostredného typu, nakoľko po styku s alergénom dochádza k reakcii v priebehu niekoľkých minút. Pre rozvoj samotnej reakcie je ale najprv potrebná senzibilizácia organizmu – pri prvom kontakte s alergénom je alergén pohltý antigén prezentujúcimi bunkami (APC), následne je v nich rozložený na

peptidové fragmenty, ktoré sú pomocou HLA vystavené na povrchu APC. Takto prezentované fragmenty alergénu môžu byť rozpoznané receptormi naivných CD4+ T lymfocytov, ktoré sa v dôsledku tejto interakcie diferencujú v alergén špecifické Th2 bunky. Th2 bunky následne produkujú, mimo iné, i IL-4, ktorý podnecuje B lymfocyty k tvorbe špecifických IgE (izotypový priesmyk / prepnutie). Vytvorené IgE sa s vysokou afinitou viažu na mastocyty a bazofily. Takto vyzbrojené bunky sa po opätovnom stretnutí so špecifickým alergénom aktivujú a uvoľňujú histamín, heparín a ďalšie substancie podporujúce zápal. Jedná sa o prvú fázu alergickej reakcii, po ktorej nasleduje fáza charakteristická tvorbu a sekréciou metabolitov kyseliny arachidónovej. Samotná alergická reakcia potom prebieha v závislosti na mieste vstupu buď lokálne (napr. alergická nádcha) alebo celkovo (anafylaktický šok)^{19,20}.

Reakcia II. typu – reakcia mediovaná pomocou IgG a IgM protilátok

1. cytotoxické protilátky

IgM a IgG protilátky, ktoré vznikajú pri tomto typu reakcie, majú schopnosť aktivovať komplement alebo vyvolať reakciu typu ADCC (bunková cytotoxicita závislá od protilátok). Fagocyty a NK bunky pomocou svojich povrchových Fc receptorov sú schopné viazať časti molekúl IgM. Týmto mechanizmom sú fagocyty a NK bunky schopné rozpoznať bunky označené protilátkami, dostať sa s nimi do blízkeho kontaktu pomocou vlastných mechanizmov cytotoxicity ich potom zničiť. Do tejto skupiny patria transfúzne reakcie (hlavne pri inkompatibilite ABO systému), ďalej Rh inkompatibilita a reakcie pri orgánovo špecifických autoimunitných chorobách (cytopénie, Goodpastureovej syndróm) apod.

2. blokujúce alebo stimulujúce protilátky

Tento typ protilátok stimuluje alebo blokuje funkciu cieľovej štruktúry. V prípade membránových receptorov dochádza k stimulácii jeho funkcie (napr. anti TSH protilátky pri Graves

Basedovej chorobe) či k blokovaní jeho funkcie v dôsledku kompetície s určitým ligandom (napr. myastenia gravis, vzácne formy diabetu). Ďalej protilátky môžu inhibovať funkciu i určitého proteínu (napr. perniciózna anémia, antifosfolipidový syndróm a niektoré formy hemofilie).

Reakcia III. typu – imunopatologická reakcia s tvorbou imunokomplexov

U týchto reakcií je možné nájsť určité paralely s atopiou, spôsobujú ich ale IgG protilátky. Za fyziologických podmienok dochádza po vytvorení komplexu protilátky s alergénom k ich eliminácii prostredníctvom fagocytózy. Pri nefyziologických pochodoch dochádza k ich ukladaniu do tkanív a ich väzbe na Fc receptory fagocytov, či k spusteniu komplementu s následnou aktiváciou poškodzujúcich reakcií. K tvorbe veľkého množstva imunokomplexov schopných viesť k patologickému stavu je ale potrebná tvorba veľkého množstva protilátok. V dôsledku tohto faktu tieto reakcie vznikajú až po určitej dobe, priemerne po 10-14 dňoch. Tento typ reakcie sa typicky vyskytuje napr. tzv. sérovej nemoci, Arthusovej reakcii alebo pri poškodení pľúc pri tzv. farmárskych pľúcach. Pri autoimunitných chorobách môžeme túto reakciu pozorovať napr. pri systémovom lupus erythematoses.

2.1.2 Imunopatologické reakcie mediované bunkami

Reakcia IV. typu – imunopatologická reakcia s oddialeným nástupom (DTH)

Tento typ lokálnej zápalovej reakcie je závislý na Th1 lymfocytoch a makrofágoch / monocytoch. Prvý kontakt organizmu s alergénom vedie k tvorbe špecifických Th1 buniek. Po opakovanom stretnutí sa s antigénom dochádza s 24 – 72 hodinovým oneskorením v mieste jeho vstupu k lokálnej reakcii, pretože do tohto miesta musia najprv migrovať Th1 bunky a makrofágy a vzájomne sa zastimulovať (IFN- γ produkovaný Th1 lymfocytmi

aktivuje makrofágy). V dôsledku infiltrácie týmito bunkami dochádza k výskytu charakteristického tvrdého opuchu. Za fyziologických podmienok vedie táto reakcia k odstráneniu intracelulárnych patogénov, pri pretrvávajúcom podnete však dochádza k poškodzovaniu tkaniva. Tento typ reakcie je zodpovedný za poškodzovanie tkanív napr. pri mykobakteriálnych infekciách alebo pri niektorých autoimunitných ochoreniach (sarkoidóza, granulomatózne vaskulitídy či demyelinizačné autoimunitné choroby).

Ďalšie typy bunkami sprostredkovaných imunopatologických reakcií.

Zástupcom tejto skupiny je reakcia mediovaná cytotoxickými bunkami, ktorá je podobná reakcii DTH, ale v jej patogenézi sa nadto aktivujú ďalšie efektory, hlavne CD8⁺ lymfocyty – likvidujú bunky infikované vírusmi alebo inak označené bunky. Ďalej sa tu uplatňujú Th17 lymfocyty produkciu hlavne IL-17, IL-21 a IL-22. Tento typ reakcie sa uplatňuje pri vírusových hepatitídach, niektorých formách autoimunitných zápalov štítnej žľazy a v pri akútnej rejekcii transplantátu.

Do tejto skupiny reakcií sa ešte radia reakcie na cudzie teleso a reakcie pri sepsy.

2.2 Atopia

Ako už bolo v úvode spomenuté, alergická reakcia sa môže rozvíjať na podklade ktoréhokoľvek typu imunopatologickej reakcie. Nakoľko však najčastejšou reakciou uplatňujúcou sa u alergikov je precitlivenosť 1. typu, charakterizovaná tvorbou IgE protilátok, tak o alergii v užšom slova zmysle hovoríme práve v takýchto prípadoch. Atopiu potom označujeme geneticky podmienenú predispozíciu reagovať na bežné alergény vonkajšieho prostredia zvýšenou tvorbou špecifických protilátok triedy IgE a to i pri veľmi nízkej koncentrácii alergénu¹. Osoba s atopiou sa bežne označuje ako atopik.

Hladina IgE protilátok je za normálnych okolností, a to i u atopikov, v rozmedzí do 0,2 mg/dL. Cirkulujúce IgE pretrvávajú relatívne krátko, ich polčas výskytu v krvnom obehu je len približne 2 dni. V prípade ich väzby na povrch tkanivových mastocytov sú pomerne stabilné a majú schopnosť perzistovať v organizme i mesiace¹⁹. Samotné mastocyty nesú na svojom povrchu vysoko afinitný receptor pre IgE (FcεRI). Sliznice (respiračný trakt, gastrointestinálny trakt či sliznice očných spojiviek) a koža sú miestami s najvyšším obsahom mastocytov a preto k výskytu IgE mediovaných alergických chorôb dochádza práve v týchto oblastiach organizmu. Klasicky uvádzanou fyziologickou funkciou IgE protilátok je ochrana organizmu proti parazitom. V prípade alergického ochorenia však dochádza k reakcii na neškodný alergén, ktorá môže viesť až k poškodeniu relevantného orgánu alebo celého organizmu.

Atopia postihuje 30 – 40% osôb v populácii vo vyspelých štátoch, no nie vždy musí mať i jednoznačný klinický dopad, nakoľko časť atopických osôb s preukázateľnou tvorbou špecifických protilátok nemá alergické ťažkosti. Opakovaná expozícia organizmu určitým alergénom a jeho interakcia so špecifickými IgE následne vedie k rozvoju zápalovej reakcie, ktorá sa klinicky prejaví ako niektoré z alergických ochorení. Zjednodušene je potom možné prirovnať alergické ochorenie ako fenotypové prejavenie sa atopického genotypu, pričom je ale nutné pamätať na to, že toto prirovnanie platí len pre reakcie sprostredkované pomocou IgE^{1,19}.

2.3 Alergény

Alergénom môže byť označená akákoľvek cudzorodá látka majúca vlastnosť viesť k alergickej reakcii. V praxi sa alergénom označuje jednak jeho zdroj (breza, roztoče a pod.) i konkrétna chemická štruktúra s imunochemicky alebo molekulárne charakterizovateľným epitopom. Väčšinou sa jedná o proteíny alebo glykoproteíny, niektoré z nich majú i enzymatickú aktivitu (jedná sa

o proteázy). Medzi hlavné alergény patria tie, na ktoré až 90% alergikov reaguje tvorbou špecifických IgE protilátok. Niektoré alergizujúce bielkoviny môžu pochádzať z viacerých zdrojov, ich medzidruhová sekvenčná homológia je asi 90% a označujeme ich ako panalergény. Sú príčinou skrížených alergií. Vonkajšie prostredie môže taktiež ovplyvňovať vznik alergie, je známym faktom, že napr. exhaláty z automobilovej dopravy zvyšujú alergenny potenciál peľových antigénov¹.

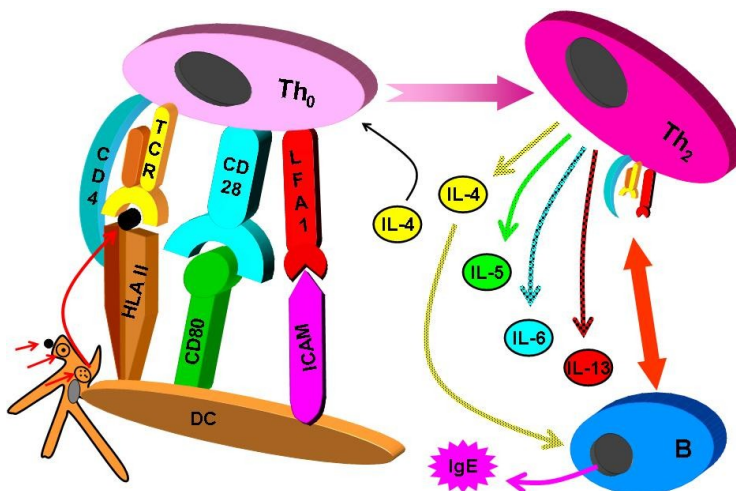
2.4 Mechanizmy vedúce k tvorbe IgE protilátok

V procese tvorby IgE protilátok stoja v centre diania, mimo samotný alergén vyvolávajúci alergickú reakciu, Th a B lymfocyty. Dôležitú úlohu majú aj ďalšie bunky, ktoré sa stýkajú s antigénom, spracovávajú ho a na záver predkladajú práve T lymfocytom – jedná sa o tzv. antigén prezentujúce bunky (APC). Medzi ne patria hlavne dendritické bunky (DC) a folikulárne DC, ďalej aj monocyty, makrofágy, bazofily a za určitých okolností i B lymfocyty²¹. Antigén je teda spracovaný profesionálnou APC, táto ho prezentuje asociovaný na HLA II na svojom povrchu a po rozpoznaní fragmentu antigénu príslušnou Th2 bunkou dochádza k jej aktivácii. Th2 lymfocyt nasledovne sekrétuje množstvo lymfokínov, z ktorých niektoré pôsobia aktivačne na B lymfocyty, pričom Th2 zároveň i fyzicky kontaktuje B lymfocyt, čím dochádza k plnej aktivácii B lymfocytu a tvorbe IgE.

2.4.1 Senzibilizácia alergénom, tvorba Th2 lymfocytov

Pri prvom stretnutí organizmu s alergénom je tento pohltенý APC – najčastejšie DC, popr. pomocou antigén špecifického IgM na povrchu B lymfocytu (Obr.1). Následne je antigén v endozómoch spracovaný a jeho fragmenty sú vystavené na povrchu APC v komplexe s molekulou HLA II. triedy. Ideálnymi APC sú práve DC, nakoľko nesú na svojom povrchu obrovské množstvo HLA II, potrebné adhézne molekuly a kostimulačné bielkoviny CD80 a CD86. V prípade, že naivný CD4+ T lymfocyt (Th0) pomocou

svojho receptoru (TCR) rozpozná antigén na povrchu APC, tak dostane ďalšie signály k svojej diferenciácii a to prostredníctvom svojho kostimulačného receptoru CD28, ktorý sa viaže na CD80 alebo CD86 exprimovaných na povrchu APC a ďalej prostredníctvom signalizácie cez receptory pre IL-4 a IL-2.



Obr.1 Sensibilizácia organizmu alergénom

Dendritická bunka (DC) funguje ako APC – po požití alergénu / antigénu (čierna bodka), dochádza k jeho štiepeniu v endozómoch. Po naštiepení (menšie čierne bodky) sú fragmenty alergénu prezentované vo väzbe s HLA na povrchu DC – v tomto prípade na jednom jej zväčšenom dendrite. Po rozpoznaní fragmentu alergénu naivnou Th bunkou (pomocou špecifického TCR) a po následnej ďalšej kostimulácii (CD28-CD80/86, adhézne molekuly ICAM-LFA-1, IL-4) dochádza k stimulácii Th bunky, diferenciácii na Th₂ formu a sekrécii špecifickej kombinácie cytokínov. Následne, v prípade rozpoznania prezentovaného antigénu na B bunke prostredníctvom TCR, dochádza k stimulácii B lymfocytu a tvorbe IgE protilátok.

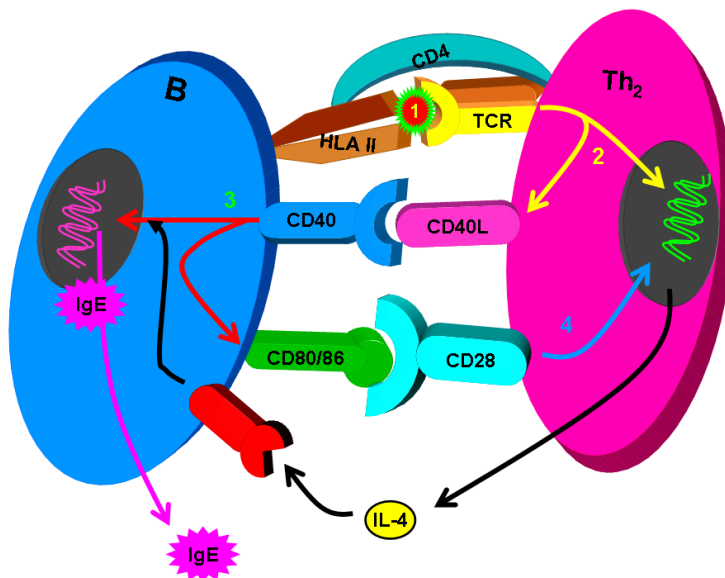
Dochádza tak k proliferácii a diferenciácii na klon zrelých efektorových Th₂ buniek, tieto produkujú rôzne lymfokíny (hlavne IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 a IL-13) a sú schopné poskytovať pomoc (špecificky i nešpecificky) B bunkám a umožniť im tak sekréciu

IgE^{19,22,23}. Pre tvorbu IgE je potrebný práve IL-4 ale i IL-13. IL-5 indukuje proliferáciu eozinofilov, IL-6 tvorbu neutrofilov a stimuluje T a B bunky, IL-9 zase indukuje proliferáciu žírnych buniek.

2.4.2 Signály vedúce k tvorbe IgE

B lymfocyty na svojom povrchu nesú pre ne typický receptor B bunky (BCR), ktorý je schopný rozoznať špecifický antigén. V prípade, že na B bunke je v komplexe s HLA II naviazaný špecifický antigén a tento je možné rozpoznať prostredníctvom TCR konkrétneho Th2 lymfocytu (jeho TCR má rovnakú antigénnu špecifikáciu), tak TCR sa naň naviaže a T lymfocyt je schopný B lymfocytu poskytnúť špecifickú pomoc (Obr.2). Po kontakte TCR s B bunkou postačuje k stimulácii produkcie IL-4 už len kontakt s adhéznymi molekulami na B lymfocyte²². Signalizácia prostredníctvom IL-4 je prvým signálom pre tvorbu IgE – IL-4 sa viaže na svoj receptor na B bunke, aktivuje signálnu dráhu v ktorej má centrálné postavenie STAT6, ten prenáša signál do bunkového jadra a jeho úlohou je iniciácia transkripcie C ϵ lokusu ťažkých reťazcov protilátok²³. B bunka ale ešte v skutočnosti netvorí funkčné ťažké reťazce.

Aktivácia TCR zároveň vedie i k expresii CD40L na povrchu T bunky (táto molekula sa vyskytuje na povrchu T buniek v pokojovom štádiu). Na B bunke je jeho receptor CD40, ktorý je na rozdiel od CD40L exprimovaný konštitutívne. CD40L sa viaže na CD40 B bunky, indukuje jeho oligomerizáciu predstavuje druhý signál, ktorý spúšťa delečný rekombinačný priešmyk k tvorbe IgE. Aktivácia CD40 na B lymfocyte zároveň vedie k expresii ďalších povrchových molekúl, a to hlavne molekúl z rodiny B7 (CD80 a pod.). Tieto sa viažu na svoj receptor CD28, konštitutívne exprimovanom na T bunke. CD28 je kostimulačnou molekulou a slúži k ďalšej amplifikácii cytokínového signálu^{19,22,23}. Aktivácia CD40 vedie taktiež k expresii CD23, čo je receptor pro IgE s nízkou afinitou.



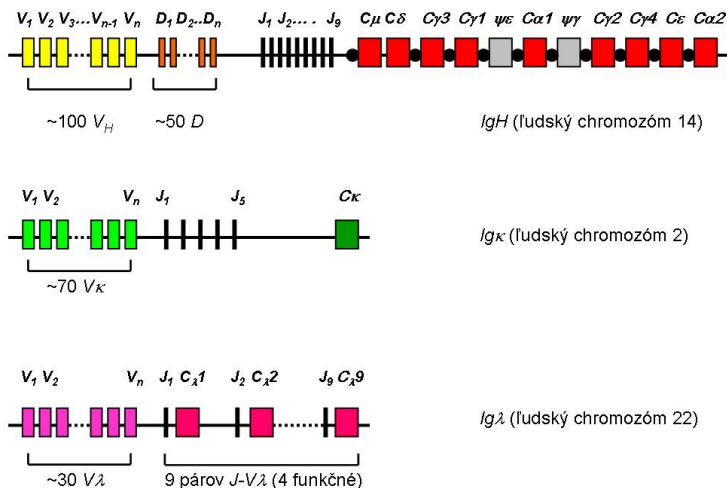
Obr. 2. Stimulácia B bunky Th2 lymfocytom

Indukcia tvorby IgE vyžaduje prítomnosť dvoch signálov. V prvom kroku rozpozná TCR Th2 bunky antigén na BCR. V dôsledku tohto dochádza jednak k indukcii tvorby IL-4 a ďalších cytokínov a súčasne sa začne exprimovať CD40L – ten sa následne viaže na CD40 B bunky. Signál z CD40 aktivuje potom 2 deje. Jednak dochádza v spolupráci so signálom z receptora pre IL-4 k tvorbe IgE a jednak väzbou ligandov kostimulačnej skupiny B7 (CD80 a CD86 na CD28) dochádza k ďalšej stimulácii tvorby IL-4 v T bunkách, čo vedie k amplifikácii cytokínového signálu.

2.4.3 Mechanizmus tvorby IgE

Protilátky sú vo všeobecnosti zložené z ľahkých a ťažkých reťazcov. Ľahké reťazce obsahujú jednu variabilnú a jednu konštantnú doménu (V_L a C_L). Ťažké reťazce triedy IgE sa skladajú z jednej variabilnej domény V_H a štyroch konštantných domén C_{H1-4} (sekrétované formy). Dodatočne ešte môžu obsahovať C terminálnu M doménu, ktorá je zodpovedná za ukotvenie protilátok v plazmatickej membráne. Jednotlivé génové lokusy pre reťazce vo všeobecnosti obsahujú väčšie množstvo génov tandemovo

usporiadaných za sebou (Obr.3), z ktorých prostredníctvom unikátneho rekombinačného procesu dochádza k zostaveniu výsledného génu kódujúceho špecifický reťazec.



Obr. 3 Štruktúra lokusov kódujúcich imunoglobulínové reťazce.

Ťažké reťazce sú kódované *IGH* lokusom, ľahké reťazce κ kóduje zase génový komplex *IGK* a reťazce λ lokus *IGL* (upravené podľa Hořejší a Bartůňková²⁶).

2.4.3.1 Antigénna špecifickosť - preskupovanie génov pre V_H a V_L domény imunoglobulínov

V priebehu svojho vývoja prechádza B lymfocyt viacerými štádiami. V štádiu pro-B začína tvorba protilátok, ktorá nie je závislá od antigénneho stimulu. Ako prvé sa začnú tvoriť ťažké (H) reťazce. Proximálna časť *IgH* lokusu obsahuje sady segmentov pre tvorbu variabilnej časti ťažkého reťazca:

- V segmenty (variabilita) – každý z V_H génov je zložený z exónu L (leader = slúži k transportu proteínu do endoplazmatického retikula) a z exónu V, ktorý tvorí prevažnú časť celého génu (jednej kazety V)

- D segmenty (diverzita)
- J segmenty (z anglického joining)

V procese tvorby variabilnej časti reťazca dochádza temer k náhodnej kombinácii V, D a J segmentov (dochádza k tendencii preferovať V segmenty najbližšie k J segmentom). Pre proces rekombinácie sú potrebné enzýmy RAG-1 a RAG-2, ktoré majú k topoizomeráze podobnú aktivitu, sú zodpovedné za štiepenie DNA a i za jej opätovné spájanie (diskutované v ref.²⁴). K presnému určeniu miesta, v ktorom má nastať štiepenie DNA, slúžia tzv. rekombinačné signálne sekvencie. Jedná sa o sekvenčne konzervované heptaméry a nonaméry, ktoré sú oddelené medzerníkom 12 alebo 23 báz (korešponduje k 1 alebo 2 otáčkam DNA závitnice). Samotné V, D a J segmenty sú týmito sekvenciami olemované – V_H gény na 3' konci, D gény po oboch koncoch a J_H gény na 5' konci. K rekombinácii môže dôjsť len medzi jedno a dvoj závitovým signálom²⁵. I keď rozpoznanie miest štiepenie je presné, tak samotná ligácia fragmentov vznikajúcich pri rekombinácii už nie je celkom presná – fragmenty DNA sú spojené tzv. N úsekom, ktorý je novo syntetizovaný a má náhodnú sekvenciu nukleotidov. Toto poskytuje ďalšiu variabilitu pri vzniku antigénnej špecifickosti protilátky²⁶.

Ako prvé sa preskupujú segmenty D a J, kedy dôjde k vyštiepeniu DNA medzi náhodným D a J_H génom. Pokiaľ ostali ešte ďalšie nevyštiepené segmenty D a J, tak tento proces sa môže opakovať. V následnom štádiu dochádza k VD preskupeniu, kedy znovu dochádza k vyštiepeniu úseku DNA medzi určitým V_H génom a prestavaným DJ_H segmentom. Pokiaľ je výsledkom štiepenia produktívny V_HDJ_H gén, čiže je podľa neho možné vytvoriť funkčný ťažký reťazec, tak proces preskupovania na druhej alele *IGH* je zastavený, dochádza k tzv. alelovej exklúzii. Dôsledkom prestavby je to, že promótor asociovaný s V_H génom sa dostane bližšie k enhaceru (zosilňovač transkripcie, je medzi J_H C_H) a novozostavený gén sa stáva transkripčne aktívnym. Pretože k J_H

segmentom je najbližšie μ germinálny C segment ($C\mu$), tak najprv vznikajú IgM protilátky. IgD protilátky môžu vznikáť neskôr v dôsledku rozdielneho splicingu.

Tvorba μ reťazcov je charakteristická pre pre-B lymfocyt. Tento sa však ešte nemôže spárovať s ľahkým (L) reťazcom, pretože ten ešte nie je vytvorený. Namiesto toho asociuje s náhradným L reťazcom (ψL), ktorý je tvorený proteínmi VpreB a $\lambda 5$. Tento komplex asociuje ešte s dimérom signálnych proteínov CD79 α a CD79 β) a takto sa ako pre-BCR objavuje na povrchu B lymfocytu. Toto je pre bunku signálom k začatiu preskupovania génov pre L reťazce²⁶.

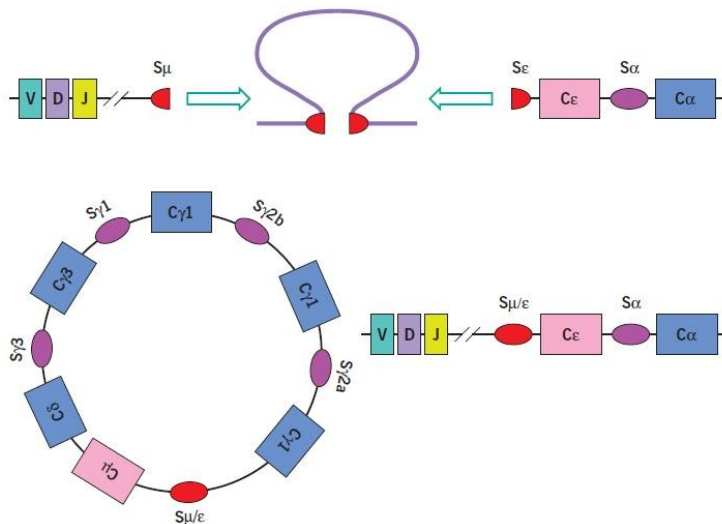
Variabilné oblasti κ a λ reťazcov (L reťazce) sú tvorené somatickými rekombináciami V ($V\kappa$ a $V\lambda$) a J segmentov ($J\kappa$ a $J\lambda$). Rekombinácia prebieha obdobne k mechanizmu rekombinácie ťažkých reťazcov, začína najprv v lokuse *Ig κ* – znovu dochádza k takmer náhodnému výberu $V\kappa$ a $J\kappa$, k určeniu miesta štiepenia sú znovu využívané sekvenčne konzervované heptaméry a nonaméry, k štiepeniu dochádza len medzi jedno a dvoj závitovým signálom, štiepené reťazce sú znovu spojené novo syntetizovaným reťazcom N. Pokiaľ rekombinácia na *IG κ* nevedie k úspešnej prestavbe (sekvencia pre funkčný proteín), tak dochádza k rekombinácii na *IG λ* . V prípade úspešnej kombinácie VJ sa znovu zastavuje rekombinácia na druhej alele (alelická exklúzia), v opačnom prípade B lymfocyt hynie. Tvorbou plnohodnotného IgM sa bunka stáva zrelým B lymfocytom.

Zrelý B lymfocyt sa pri styku s antigénom na folikulárnych DC v lymfoidných folikuloch aktivuje a zároveň dochádza k rozvoji intenzívnych somatických mutácií V segmentov preskupených génov pre protilátky. Dôležitú úlohu v tomto procese má enzým AID (aktíváciou indukovaná cytidín deamináza). Tento proces ďalej zvyšuje variabilitu imunoglobulínov, selektovaní sú mutanti s najvyššou afinitou k antigénu²⁶.

2.4.3.2 Isotypový priešmyk – terminálna diferenciácia B lymfocytu

Po rozpoznaní antigénu na povrchu B lymfocytu prostredníctvom TCR o rovnakej špecifickosti ako má BCR a za spolupráce ďalších kostimulačných signálov (viď vyššie) začína T lymfocyt mimo iné sekreťovať IL-4. Ten sa viaže na IL-4 receptor na povrchu B lymfocytu, dochádza k jeho aktivácii a predaniu signálu na STAT6, ktorý tento signál prenáša do bunkového jadra. V jadre sa viaže do promótorových oblastí IL-4 responzibilných génov. V prípade interakcie T a B lymfocytov po styku so špecifickým antigénom (alergénom) sa STAT6 viaže do promótorovej oblasti C ϵ oblasti *IGH* lokusu. *IGH* lokus obsahuje niekoľko génov pre všetky konštantné podjednotky H reťazcov (obr.3) Každý z týchto génov má I exón v promótorovej oblasti, za ktorým nasleduje špecifická intrónová S oblasť obsahujúca repetitívne sekvencie, ktoré sú dôležité pre izotypové prepnutie. Výnimkou je C μ , ktorý nemá S oblasť. Ako posledné potom nasledujú exóny kódujúce vlastnú konštantnú časť H reťazca.

Gén pre C ϵ typ protilátok obsahuje I ϵ exón, intrónovú S ϵ oblasť, ďalej 4 C ϵ exóny (kódujúce celú oblasť ťažkých reťazcov IgE) a ešte event. 2 exóny M pre transmembránovú doménu IgE (v prípade nesekrétovanej formy IgE). Promótorova oblasť C ϵ obsahuje mimo väzbové miesto pre STAT6 i miesta pre ďalšie transkripčné faktory: 2 pre NF κ B, ďalej pre BSAP (PAX5), C/EBP a PU.1²⁷. Pre správnu a dostatočnú mieru expzie je nutná i interakcia s komplexom CBP/p300 a s NCoA²⁸. Na základe tejto signalizácie dochádza k tvorbe ϵ germinálneho transkriptu (ϵ -GLT) a to z miesta promótoru. Z primárneho transkriptu je vystrihnutá S ϵ oblasť, takže ϵ -GLT obsahuje I ϵ a exóny C ϵ_{1-4} a má veľkosť 1,7 kb²⁹. Tento ϵ -GLT sa však označuje ako sterilný, pretože všetky možné čítacie rámce v I ϵ obsahujú stop kodóny a teda jeho transláciou nedochádza k tvorbe IgE^{24,29}.



Obr.4 IgE izotypový preskok (priešmyk)

V hornej časti obrázku je znázornený lokus pre ťažké reťazce imunoglobulínov, pri indukcii izotypového preskoku (IL-4 a CD40 signalizácia) dochádza k priblíženiu sekvenčne špecifických miest pre rekombináciu (oblasť génov pre konštantné reťazce) pred C μ (S μ) lokusom a pred C ϵ (S ϵ) lokusom, pričom DNA medzi týmito miestami sa vystrihne. Výsledkom (dolná časť obrázku) je vznik cirkulárneho fragmentu (ten sa degraduje) a rekombinovaného miesta S μ/ϵ , za ktorým nasleduje C ϵ lokus, a pri transkripcii sa potom budú tvoriť už reťazce pre IgE.

Pre izotypový priešmyk je dôležité, aby I ϵ a S ϵ ostali intaktné. Ďalej nedávne štúdie poukázali na význam samotného S ϵ po jeho vyštípení z ϵ -GLT mRNA pri splicingu. Zistilo sa totiž, že vo všeobecnosti sa takáto S – región obsahujúca RNA hybridizuje na komplementárnu genómovú DNA, tvorí DNA-RNA hybrid a toto vedie k vytvoreniu stabilnej „R slučky“ – DNA-RNA hybrid je spolu a protiahlý reťazec je vo forme ssDNA. Tieto R slučky sú náchylné k štiepeniu DNA prostredníctvom excízne reparačných endonukleáz XPF-ERCC1 a XPG. Výsledkom je potom výskyt zlomov na dsDNA a tieto vlákna môžu byť navzájom spojené. Tento mechanizmus

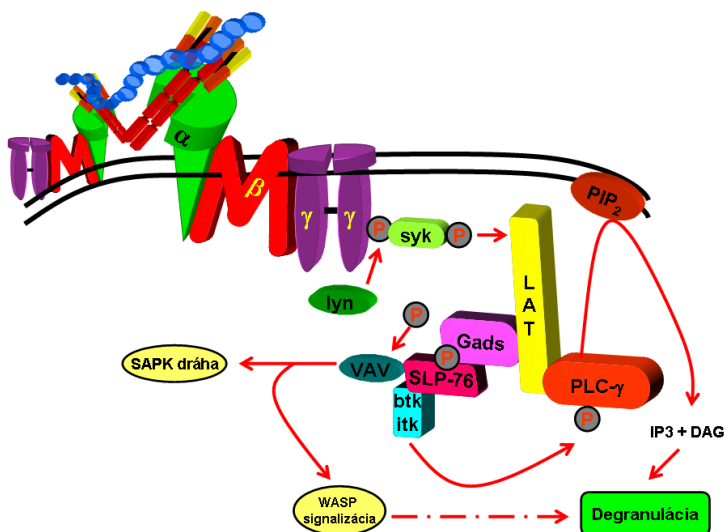
môže predstavovať indukciu izotypového prepnutia²⁷. Samotný izotypový priešmyk sa ale uskutoční až na základe druhého signálu, ktorým je signalizácia cez aktivovaný CD40 (Obr.4). Toto vedie k nasmerovaniu AID do oblasti C ϵ lokusu. Se oblasť je bohatá na cytozín a AID tu spôsobuje deamináciu cytozínov na uracily. Tieto sú nasledovne substrátom pre uracil-DNA-glykozylázu (UNG), ktorá vytvára potom zlomy jedného vlákna DNA, tzv. nicky. Vysoká hustota takýchto zlomov môže viesť k dvojvláknovým zlomom v DNA indukovaných endonukleázou. Oba tieto enzýmy majú veľmi dôležitú úlohu pri izotypovom priešmyku, nakoľko ich deficit je spojený autozomálne recesívnym typom hyperIgM syndrómu u ktorého postihnuté osoby produkujú vysoké hladiny IgM protilátok, no nie sú schopné prepnúť na tvorbu protilátky inej triedy^{19,30,31}.

2.5 Štruktúra IgE a signalizácia pomocou IgE

Protilátky triedy IgE boli objavené ako posledné, dlho po objavení ostatných imunoglobulínových izotried a štruktúrne sú podobné ostatným protilátkam. Sú zložené z dvoch ľahkých (L) a dvoch ťažkých (H) ϵ reťazcov, vytvára sa teda tetramér. H reťazce obsahujú 5 domén - N terminálne jedna variabilná a ďalej 4 konštantné (kódované exónmi C ϵ_{1-4}). V prípade membránovo viazanej formy IgE je na C konci H reťazca ešte jedna transmembránová M doména. L reťazce sú zložené z jednej variabilnej a jednej konštantnej domény.

IgE sa viažu a signalizujú prostredníctvom dvoch odlišných receptorov – Fc ϵ RI (vysoko afinitný receptor) a CD23 (Fc ϵ RII, nízko afinitný IgE receptor). Fc ϵ RI sa vyskytuje v dvoch formách: $\alpha\beta\gamma_2$ tetramér vyskytujúci sa na povrchu žírnych buniek a bazofilov, alebo vo forme $\alpha\gamma_2$ triméru prítomného na mnohých ďalších bunkách. Za väzbu IgE je zodpovedný α reťazec, dochádza k silnej a špecifickej interakcii so sekvenciami v C ϵ_{2-3} oblasti H reťazcov. Pri fyziologických hladinách IgE je Fc ϵ RI nimi konštitutívne obsadený.

β reťazec má dôležitú amplifikačnú úlohu pri signalizácii cez Fc ϵ RI. Najväčší význam pri prenose signálu má ale γ reťazec. Oba reťazce β a γ majú vo svojej vnútrobunkovej časti prítomné sekvencie zvané tyrozinom aktivované imunoreceptorové motívy (ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) a práve tieto sú fosforylované receptorovými tyrozínkinázami¹⁹.



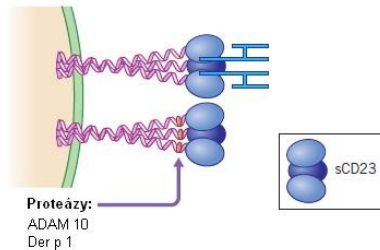
Obr. 5 Štruktúra a signalizácia cez Fc ϵ RI

Fc ϵ RI (vysoko afinitný receptor pre IgE) je zložený z α , β a 2 γ podjednotiek. V prípade väzby IgE s polyvalentným alergénom, ktorý je schopný súčasne sa viazať na viac IgE, dochádza k multimerizácii týchto receptorov, k ich aktivácii a prenosu signálu na signálny komplex Gads/LAT/SLP-76. Tento aktivuje nasledovne niekoľko ďalších intracelulárnych signalizačných dráh. Súčasťou komplexu je i fosfolipáza C γ , ktorá štiepi membránový fosfo-inozitol-bifosfát (PIP₂) na inozitol-1, 4, 5 trifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG).

IgE sa teda viažu na svoj vysoko afinitný receptor. Po kontakte s polyvalentným alergénom dochádza k agregácii Fc ϵ RI, čo je signálom pre degranuláciu mastocytov a bazofilov, zároveň dochádza i k istej novotvorbe ďalších látok podporujúcich zápalovú

reakciu (Obr.5). Po agregácii FcεRI na povrchu bunky dochádza k fosforylácii ITAM, ktorá je mediovaná pomocou lyn tyrozín kinázy z rodiny src. Na fosforylované ITAM sa nasledovne viaže syk (SH2 doménu obsahujúca tyrozín kináza) a táto potom prostredníctvom fosforylácie molekúl LAT, Gads a SLP-76 vedie k zostaveniu signálneho komplexu. Súčasťou tohto komplexu je i fosfolipáza-C γ (PLC γ), ktorá hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5-bisfosfonát na inozitol 1,4,5-trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). IP3 následne indukuje uvoľnenie kalciových iónov z endoplazmatického retikula. Elevácia intracelulárneho kalcia je potom veľmi dôležitým pokynom k degranulácii mastocytov. DAG a zvýšená hladina kalcia aktivuje zároveň i proteín kinázu C, ktorá spúšťa signalizáciu potrebnú pre génovú aktiváciu v mastocytoch. Degranuláciu a génovú expresiu tiež regulujú i ďalšie signálne dráhy simultánne aktivované agregáciou FcεRI (napr. SAPK a WASP dráhy)¹⁹.

CD23 patrí do rodiny lektínov typu C a má pri porovnaní s FcεRI úplne inú štruktúru i funkciu. V dôsledku alternatívneho zostrihu sa vyskytuje v dvoch formách: CD23a na povrchu B buniek a CD23b na povrchu T lymfocytov a mnohých ďalších buniek. Taktiež sa môže vyskytovať i v sekrétovej podobe. CD23 je vo forme triméru, s dlhou, nadmerne glykozylovanou, extracelulárnou stopkou vykazujúcou štruktúrny motív „zapletenej cievky“ (coiled coil structure), ktorá je zakončená tromi doménami tvaru hlavičky – tieto viažu IgE (Obr. 6). Expresia CD23 je taktiež ovplyvňovaná hladinou IgE a naviazaný IgE chráni CD23 pred jeho degradáciou. CD23 vykazuje väčšie množstvo funkcií – napr. na povrchu B lymfocytov sa zdá, že môže suprimovať tvorbu IgE. Ďalej môže asistovať pri prostredníctvom IgE uľahčenej prezentácii antigénu (sprostredkováva vychytávanie komplexu alergén/IgE B bunkou). V neposlednej rade môže mediovať i transcytózu potravinových alergénov vzhľadom k tomu, že je exprimovaný i na lumenálnej strane črevného epitelu¹⁹.



Obr.6 Štruktúra nízko afinitného receptora pre IgE FcεRII (CD23).

CD23 je trimérom – monómér má tvar závitnice ukončenej globulárnou hlavičkou. Celý receptor je vytvorený vzájomným zapletením sa závitnicových častí monomérov. Hlavičky potom vytvárajú väzbové miesto pre IgE. Solubilná forma CD23 je tvorená odštiepením globulárnej hlavičky z receptorovej štruktúry. Pokiaľ je na receptor naviazaný IgE, tak k jeho štiepeniu nedochádza (prevzaté z Oettgen H a Broide DH¹⁹).

2.6 Fázy alergickej reakcie

2.6.1 Fáza senzibilizácie

Pri prvom stretnutí s alergénom prebieha indukcia odpovede imunitného systému pomocou všeobecných mechanizmov, po rozpoznaní alergénu prostredníctvom APC dochádza k rozvoju špecifickej T bunkovej odpovede. Ako už bolo spomenuté, najčastejšie dochádza k senzibilizácii na slizniciach. Alergén nimi preniká a v mukóznej či submukóznej vrstve dochádza ku kontaktu s APC, poprípade dochádza k jeho zaneseniu do lymfatických uzlín. Prezentáciou antigénu na povrchu APC dochádza potom k indukcii tvorby Th1 alebo Th2 lymfocytov – od toho potom závisí i typ alergickej reakcie. Th2 lymfocyty indukujú tvorbu IgE, tie sa viažu na príslušné receptory a takto „vyzbrojujú“ hlavne mastocyty k uskutočneniu reakcie pri opakovanom styku s alergénom. Th1 lymfocyty sa uplatňujú pri kontaktnej alergii (napr. ťažké kovy). Samotná fáza senzibilizácie prebieha v skrytosti, bez klinických

prejavov, až pri opakovanou styku s alergénom dochádza k rozvoji vlastnej alergickej reakcie¹.

2.6.2 Včasná a oneskorá fáza alergickej reakcie

V prípade reakcie I. typu, polyvalentný alergén agreguje receptory pre IgE (FcεRI) a dochádza k okamžitému vyplaveniu nachystaných granúl zo žírnych buniek. Tieto granule obsahujú látky ovplyvňujúce alergickú reakciu, tzv. primárne mediátory. Medzi ne patria hlavne heparín, histamín, serotonín a chemotaktické faktory pre eozinofily a neutrofile. Zároveň začína *de novo* tvorba primárnych mediátorov. Vo svojej podstate táto reakcia tkanivá nepoškodzuje priamo, uvoľnené látky vedú k vazodilatácii, bronchokonstrikcii, sekrécii hlienu a stimulácii nervových zakončení v koži.

Na včasnú fázu plynule nadväzuje oneskorená fáza, naplno sa prejaví až po niekoľkých hodinách. Začínajú sa tvoriť sekundárne mediátory reakcie (hlavne metabolitov kyseliny arachidónovej), ktoré majú prozápalový vplyv a do miesta reakcie priťahujú eozinofily, trombocyty, neutrofile i lymfocyty. Tieto umocňujú alergickú reakciu, pričom v postihnutom tkanive už môže dochádzať i k ireverzibilným zmenám.

Tieto popísané mechanizmy platia len pre reakciu s účasťou Th2 lymfocytov a IgE. Pri preferencii reakcii s Th1 bunkami, sa táto rozvíja omnoho neskôr, až po niekoľkých dňoch, uplatňuje sa reakcia IV. typu. Samotná alergická reakcia môže prejsť do chronického štádia, ktoré už nie je závislé od primárnej príčiny vzniku alergickej reakcie¹.

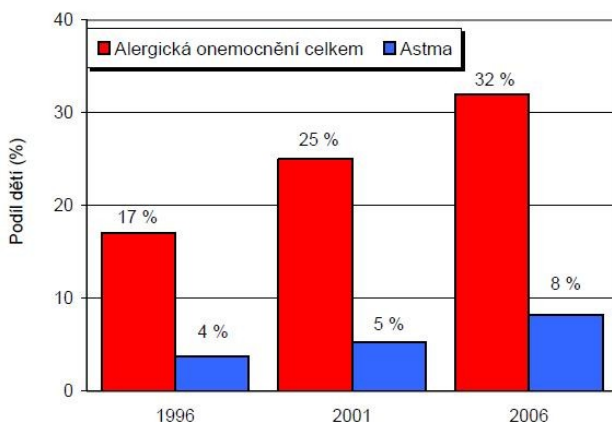
2.7 Alergické choroby

Alergická reakcia sa na klinickej úrovni prejavuje ako niektoré z alergických ochorení a to samostatne alebo v kombinácii. Alergickým procesom sú najčastejšie postihnuté sliznice a koža a podľa tohto môžeme potom rozlišovať i jednotlivé ochorenia. Medzi choroby so symptomatológiou zameranou na kožu sa radia

atopický ekzém, žihľavka (urtikária) a kontaktná dermatitída. Postihnutie slizníc respiračného traktu sa manifestuje ako polinóza (alergická nádcha), chronická celoročná nádcha a bronchiálna astma. Postihnutie slizníc spojivky sa prejavuje ako alergická konjunktivitída. Postihnuté môžu byť i sliznice gastrointestinálneho traktu. Potravinové alergie majú rôzne príznaky, ktoré sa môžu vzájomne kombinovať – napr. pri alergii na bielkovinu kravského mlieka sa vyskytujú zažívacie problémy (zvracanie, hnačky, bolesti brucha, krv a hlien v stolici) s kožnými a respiračnými problémami.

2.7.1 Výskyt alergií

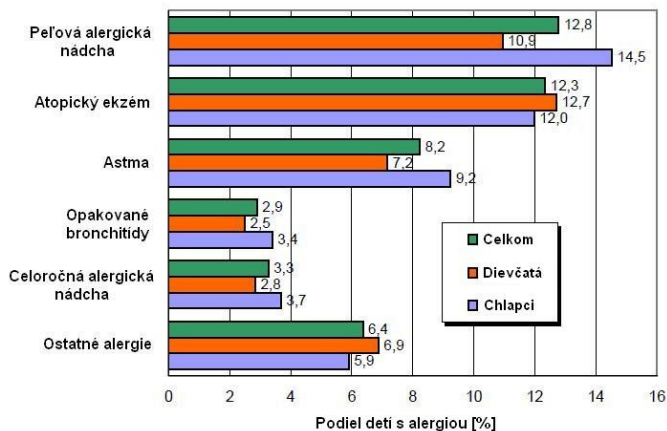
Je známym faktom, že za posledných niekoľko desaťročí došlo celosvetovo k dramatickému nárastu v prevalencii alergií³²⁻³⁶. Napr. Jarvis a spol.³² uviedli, že v roku 1998 vo Veľkej Británii dochádzalo k zvyšovaniu prevalence astmy alebo symptómov silne poukazujúcich na astmu u detí o 5% za rok a podobný trend bolo možné pozorovať napr. i v Švédsku, Švajčiarsku, Nórsku, USA, Austrálii a na Novom Zélande.



Obr.7: Výskyt alergických chorôb a astmy u detí za roky 1996, 2001 a 2006 v ČR. Z prezentované dáta demonštrujú dvojnásobný nárast v prevalencii alergických chorôb v priebehu 10 rokov. Uvádzaná hodnota v percentách predstavuje kumulatívnu prevalenciu (prevzaté z informácii SZÚ³⁷).

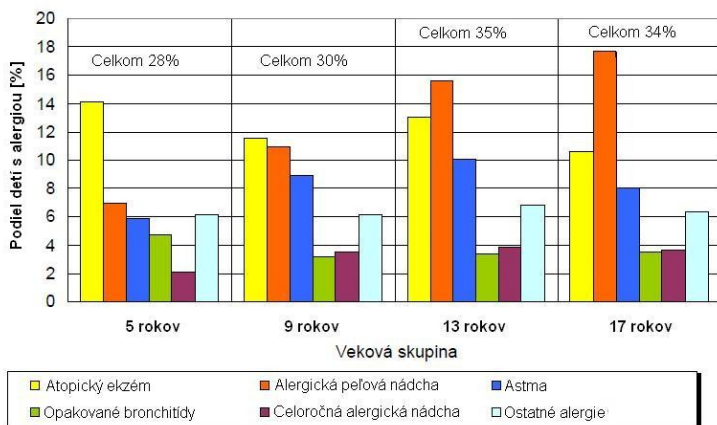
Situácia v Českej Republike je obdobná, alergie sú častejšie hlavne u detí. Podľa prieskumu Štátneho zdravotníckeho ústavu došlo v období rokov 1996 – 2006 temer k zdvojnásobeniu alergických ochorení i samotnej astmy v detskej populácii (obr.7) a tento trend je vidieť i v jednotlivých vekových kategóriách^{37,38}. Medzi najčastejšie prejavy alergie u detí v ČR patrí rhinokonjunktivitída³⁸ a najväčší výskyt medzi alergickými chorobami majú peľová polinóza (13% detí) a atopický ekzém (12 % detí, obr.8.). Ako najčastejšie alergény boli zistené peľe travín (34% alergikov), ďalšie rastlinné alergény (peľ brezy a burín), a roztoče³⁸. Výskyt alergických ochorení je závislý na veku, preto bolo pozorované, že v najmladších vekových kategóriách sa vyskytuje najviac atopický ekzém, no u starších detí sa vyskytuje hlavne peľová polinóza (obr.9).

Vzhľadom na tento výrazný nárast v prevalencii alergií sa hovorí o epidémii alergických ochorení. K tejto zmene došlo ale v relatívne krátkom období a preto je nepravdepodobné aby v priebehu 1 generácie došlo k tak výraznej zmene v genetickej výbave populácie, ktorá by bola vysvetlením takéhoto nárastu. Pretože samotné alergické choroby majú multifaktoriálnu etiológiu, tak vysvetlením tejto dramatickej zmeny musí byť zvýraznenie vplyvov vonkajšieho prostredia – zmeny životného prostredia (smog, vyššie množstvo polutantov a pod.), zmena životného štýlu populácie, nesprávne stravovacie návyky, ale i hypotéza hygienickej teórie. Táto sa dá použiť k vysvetleniu napr. i menšieho rizika alergickej senzibilizácie či výskytu alergického ochorenia pre deti s väčším počtom súrodencov oproti jedincovi s maximálne jedným súrodencom – súrodenci sa navzájom reinfikujú rôznymi komunitnými infekciami, čo potom stimuluje správnu polarizáciu vývoja imunitného systému^{39,40}.



Obr. 8: Výskyt alergických ochorení u detí v ČR v roku 2006.

Na obrázku je znázornený výskyt každého ochorenia celkovo a i zvlášť pre chlapcov a zvlášť pre dievčatá. Chlapci sú znázornení lila farbou, dievčatá oranžovou a obe pohlavia dokopy zelenou farbou (prevzaté z informácií SZÚ³⁷).



Obr.9: Výskyt alergických ochorení podľa veku u detí v ČR v roku 2006.

Výskyt celkový a pre jednotlivé alergická ochorenia je na obrázku znázornený v 4 vekových kategóriách – 5, 9, 13 a 17 rokov (prevzaté z informácií SZÚ³⁷).

2.7.2 Asthma bronchiale

2.7.2.1 Výskyt

Astma bronchiale predstavuje najčastejšiu neinfekčnú chorobu a v ČR postihuje 8 % populácie, pričom je častejšie u detí s odhadovanou prevalenciou 12-15 %⁴¹. V zahraničí sa môže táto choroba vyskytnúť i u viac než 20 % populácie⁴² a podľa odhadov je celosvetový odhad výskytu astmy u približne 300 miliónov osôb⁴³. Astma sa častejšie vyskytuje u chlapcov než u dievčat, čo sa vysvetľuje menším priemerom priedušiek a zvýšeným tonusom u malých chlapcov. Okolo puberty sa začína výskyt u oboch pohlaví vyrovnávať a v dospelosti je astma skôr častejšia naopak u žien.

2.7.2.2 Etiopatogenéza astmy

Astma je definovaná ako chronické zápalové ochorenie dýchacích ciest, na ktorom sa zúčastňuje množstvo buniek a bunkových produktov, pričom hladké svalstvo dýchacích ciest abnormálne reaguje na vonkajšie podnety a podstupuje prehnajú kontrakciu (bronchiálnu hyperreaktivitu - BHR). U tohto ochorenia prevažuje buď chronický eozinofilný alebo neutrofilný zápal v dýchacích cestách. Po kontakte dýchacích ciest s alergénom dochádza k alergickej reakcii, v dvoch fázach. Včasná fáza sa prejavuje za 10 – 30 min. po expozícii a v jej priebehu sú najdôležitejšie histamín a leukotriény – klinicky dochádza k opuchu, tvorbe hlienu a kontrakcii hladkých svalov. Zároveň sú do miesta zápalu atrahované neurofily a eozinofily. Podnetom pre tvorbu eozinofilov je hlavne IL-5 produkovaný Th2 bunkami. V oneskorenej fázy (za 4 – 8 hodín) dochádza v dôsledku zmenenej permeability ciev k prestupu eozinofilov, lymfocytov a čiastočne i neutrofilov do perivaskulárnych priestorov, kde pokračuje zápal a zväzňujú sa jeho symptómy. U pacientov potom môžeme preukázať BHR⁴⁴. Ďalej dochádza k infiltrácii epitelu a submukózy i T lymfocytmi, mastocytmi a bazofilmi. Samotný proces postupne prechádza do chronicity, kedy už Th2 reakcie nemajú na ďalej

prebiehajúcich zmenách výrazný vplyv¹. Biopsie u mladých osôb poukázali na to, že eozinofily prítomné v bronchoalveolárnej laváži sú spojené s vyšším rizikom perzistencie choroby, no závažnejšie formy choroby sú závislé od prítomnosti neutrofilov a to u detí i dospelých⁴⁵.

I keď pre astma sú dôležité alergická reakcia a chronický zápal, tak v centre diania sú dýchacie cesty. Poškodenie povrchového epitelu dýchacích ciest indukuje procesy, ktoré toto poškodenie reparujú ad integrum, s normálnym pomerom pohárikových a vlásokových buniek. Mimo iné dochádza i k aktivácii fibroblastov diferencujúcich sa na myofibroblasty sekreťujúce proteíny extracelulárneho matrixu a mediátory podporujúce zápal. Pri pretrvávajúcom strese, poškodzovaní epitelu (napr. i v dôsledku enzymatickej aktivity alergénov) sa reparačný proces zvyrazňuje a dochádza k skvamóznej metaplázii a/alebo hyperplázii pohárikových buniek. V chronickom štádiu astmy je už ale reparačný proces utlmovaný. Astmatické dýchacie cesty sú následne po poškodení opravované pomalšie a neefektívne, je porušená jemná rovnováha tvorby/degradácie extracelulárneho matrixu, čo vedie k zosilneniu zápalu a prestavbe dýchacích ciest. Remodelácia dýchacích ciest je tak charakterizovaná metapláziou sliznice, zhrubnutím mezenchýmu a hyperpláziou hladkého svalstva a drobných ciev^{46,47}.

Centrálne postavenie Th2 mediovaných procesov v mechanizme vzniku a priebehu astmy však nie je schopné vysvetliť všetky pochody prebiehajúce pri astme. Holgate a kol.⁴⁸ preto navrhli inú hypotézu a do centra záujmu v etiopatogenéze astmy postavili epitelovo – mezenchýmovú trofickú jednotku (EMTU, z anglického epithelial mesenchymal trophic unit, obr. 10). EMTU má svoje dôležité postavenie vo vetviacej morfogénéze („branching morphogenesis“) v priebehu vývoja fetálnych pľúc⁴⁹. Opakované inzulty v teréne zvýšenej náchylnosti epitelu a predĺženej opravy s veľkou pravdepodobnosťou smerujú k stavu chronickej rany, čo vedie k proliferácii mezenchýmových buniek, zhrubnutiu dýchacích

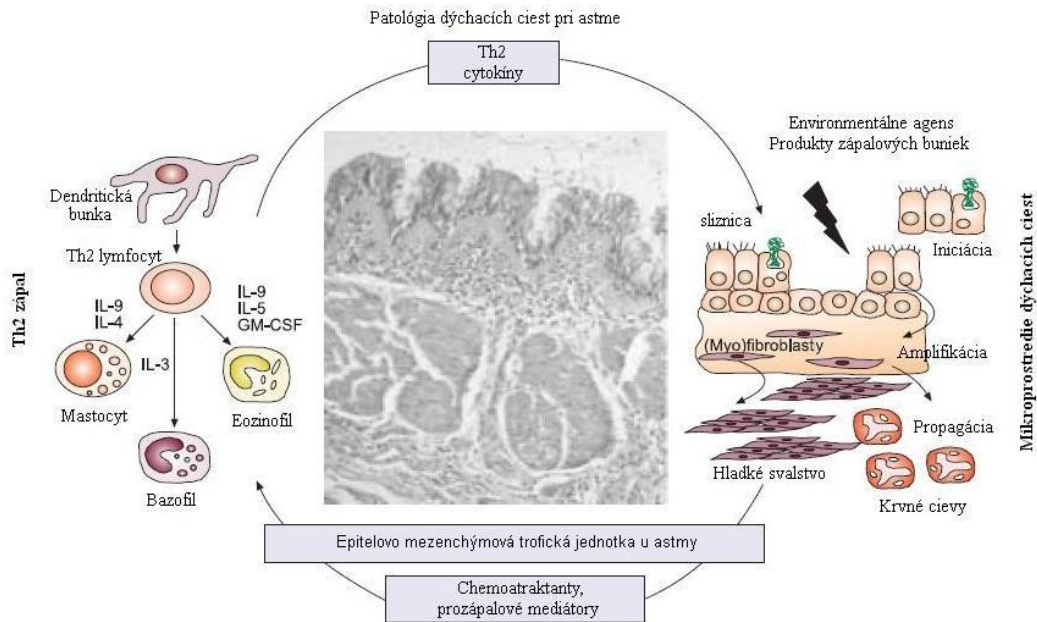
ciest a BHR. Pre dôležité postavenie EMTU v patogenéze astmy svedčí aj to, že 6 zo 7 kandidátnych génov pre astmu a bronchiálnu hyperreaktivitu je exprimovaných práve v EMTU. K zostaveniu tejto hypotézy viedli hlavne tieto poznatky⁵⁰:

1. zmeny prebiehajúce v dýchacích cestách u astmy (ich prestavba - remodelácia) sú obmedzené čisto len na oblasť mimo alveolo-kapilárnej membrány, a to i napriek prestupu zápalových buniek do alveolov a peribronchiálnych priestorov
2. väčšinu porúch v dýchacích cestách pri astme je možné pripísať na vrub BHR, kedy dochádza ku kontrakcii svalstva príliš často a jednoducho a to v reakcii na rôzne vnútorné i vonkajšie faktory
3. existujú faktory odlišné od alergénov, ktoré sú dôležité nielen v úplných začiatkoch choroby, ale hrajú významnú úlohu aj pri jej závažnosti a progresii.

2.7.2.3 *Symptómy astmy*

Medzi typické prejavy astmy patrí hvízdavé dýchanie (pískavý zvuk pri výdychu), pocit dychovej nedostatočnosti, pocit tiesne na hrudi a kašeľ, hlavne v noci. Pri fyzikálnom vyšetrení môžu byť prítomné distančné fenomény, auskultačne spastické fenomény, v ťažkých stavoch môže byť naopak zase až oslabenie dýchacích zvukov.

V diagnostike astmy má ďalej významné postavenie funkčné pľúcne vyšetrenie (spirometria, poprípade celotelová pletysmografie) s bronchoprovokačným testom k evaluácii BHR. K vyhodnoteniu aktuálnej zápalovej aktivity slúži vyšetrenie sérového ECP (eozinofilný kationický proteín – informuje o aktivite choroby) a vydychovaného NO. Vyššie uvedené vyšetrenia slúžia taktiež k monitorovaniu priebehu choroby a úspešnosti terapie. Vpichový kožný test a vyšetrenie špecifických IgE v séru slúži k odhaleniu alergénov, ktoré sa u vyšetrovanej osoby môžu spolupodieľať na alergickej reakcii.



Obr. 10 – Patológia dýchacích ciest pri astme.

V centre pozornosti stojí EMTU, kedy pri reparácii poškodených dýchacích ciest je najdôležitejšia spolupráca epitelu a mesenchymu. Poškodenie vyváženej rovnováhy tejto spolupráce môže viesť k prestavbe dýchacích ciest, zmnženiu hladkého svalstva, rozvoj BHR. Význam senzibilizácie alergénom týmto modelom nie je potlačený do úzadia, dopĺňa len celkovú mozaiku etiopatogenézy vzniku a priebehu astmy – na predisponované dýchacie cesty nasadá alergická reakcia s významnou spoluprácou ďalších environmentálnych faktorov (prevzaté a upravené podľa Holgate a spol.⁵⁰)

2.7.2.4 Klasifikácia astmy

Astma môžeme deliť podľa niekoľkých kritérií a to podľa klinického priebehu, ďalej i vzhľadom na vek (fenotypy u detí do 5 rokov), podľa vyvolávajúcej príčiny a v neposlednom rade i podľa terapeutickú úspešnosti.

1. astma podľa závažnosti⁴¹:

- intermitentná – stupeň 1
- ľahká perzistujúca – stupeň 2
- stredne ťažká perzistujúca – stupeň 3
- ťažká perzistujúca – stupeň 4

2. astma u detí do 5 rokov⁴⁴:

- prechodné pískavé dýchanie dojčiat a batoliat do 3 rokov veku
- perzistujúce hvízdanie s včasným začiatkom do 3 rokov veku bez známkov a prejavov atopie
- neskorý nástup pískania detí s atopiou a alergiou a s alergiou v rodine, pričom toto perzistuje do dospelosti

3. astma alergická a nealergická.

4. Astma podľa úrovne kontroly⁴¹:

- astma pod kontrolou – pacient je bez ťažkostí, alebo sa tieto vyskytujú len ojedinele a sú mierne
- astma pod čiastočnou kontrolou – definované počtom typických respiračných symptómov v priebehu týždňa
- astma pod nedostatočnou kontrolou

Klinické varianty astmy⁴¹:

- nočná astma - predstavuje závažnejšiu známku zhoršenej kontroly astmy
- sezónna astma – súvisí s výskytom sezónnych alergénov

- astma indukované námahou – je známkou neúplnej kontroly na astmou. Dochádza k nej za 6-10 minút od začiatku fyzickej záťaže alebo do 10-15 minút po jej ukončení.
- ťažko liečiteľná astma – vyskytuje sa asi u 5% astmatikov, má niekoľko podtypov, patria sem i:
 - premenštruačná astma – u 30-40% astmatičiek, niekoľko dní pred menštruáciou či v jej priebehu
 - aspirínom indukovaná astma – asi u 10% astmatikov. Typicky sa vyskytuje medzi 30. – 40. rokom veku. Pri kombinácii alergie na salicylát, astmy a perzistujúceho zápalu paranazálnych dutín s nosnými polypmi hovoríme o aspirínovej trias.
- kašeľ ako ekvivalent astmy
- astma seniorov – vzniká väčšinou až po 65 rokoch veku a je často poddiagnostikovaná
- profesionálna astma – vzniká v dôsledku opakovanej expozícii faktorom pracovného prostredia⁴¹.

2.7.2.5 Liečba astmy

Terapia astmy zohľadňuje etiopatogézu i symptómy pacienta, pričom logickým primárnym cieľom je dostať čo možno najrýchlejšie chorobu pod kontrolu a udržiavať ju v tomto stave, kedy pacient nemá žiadne alebo len minimálne problémy. Tento cieľ napomáha zlepšovať kvalitu života pacienta, znižuje celkovo výskyt i socio-ekonomický dopad liečby výrazných exacerbácií astmy a taktiež znižuje riziko rozvoja zmien v dýchacích cestách vedúcich k ich remodelácii. Úplné potlačenie týchto zmien nie je možné, vzhľadom na to, že v patogenéze je v poslednej dobe uznávaná teória dysfunkcie EMTU u predisponovaných jedincov a isté počiatočné zmeny v dýchacích cestách boli pozorované dlho pred vznikom symptomatológie už i v relatívne včasnom dojčenskom veku⁴⁵. Dôležité je ale dodržiavať udržiavaciu liečbu a to aj napriek tomu, že pacienti (často deti ale i ich rodičia) majú pocit, že už nie je potrebná – len trvalá kontrola astmy zabezpečuje minimálne riziko závažných

astmatických stavov a rozvoja ťažkých zmien dýchacích ciest. Táto terapia však nemusí byť celoživotná, pri dlhodobej kompenzácii ochorenia môže byť liečba ukončená.

V liečbe sa uplatňuje nefarmakologický i farmakologický prístup. Nefarmakologické postupy (režimové opatrenia) sa zameriavajú na obmedzenie expozície vyvolávajúcimi faktormi a predstavuje v podstate sekundárnu prevenciu. Mimo dôsledné vyhýbanie sa príčinnému alergénu sem patrí i vyhýbanie sa expozícii cigaretovému dymu. Farmakologický prístup je založený na podávaní uľavujúcich liekov (akútne príznaky, liečba exacerbácií – slúžia k bronchodilatácii) a v podávaní kontrolujúcich antiastmatík, ktoré je nutné podávať od 2. stupňa (ľahká perzistujúca astma) a to i v bezpríznakovom období⁴¹.

Uľavujúce antiastmatiká⁴¹:

- inhalační β_2 -agonisti s rýchlym nástupom účinku, pôsobia do 3 minút a ich účinok pretrváva 4 hodiny. Do tejto skupiny patrí napr. salbutamol.
- inhalačné anticholinergiká s krátkodobým účinkom s nástupom do 8 minút, s účinkom na 4-6 hodín. Zástupcom je ipratropium.
- inhalačné kombinácie predchádzajúcich skupín
- p.o. β_2 -agonisti
- systémové kortikosteroidy – určené pre krátkodobé podanie 10 -14 dní maximálne, a potom ich možno hneď vysadiť

Kontrolujúce antiastmatické lieky⁴¹:

- inhalačné kortikosteroidy (IKS), napr. budesonid, flutikazón apod. – používajú sa samostatne alebo od strednej ťažkej astmy vo fixnej kombinácii
- inhalačné β_2 -mimetiká s dlhodobým účinkom (LABA) s účinkom nastupujúcim do 3 minút, pričom tento trvá 12 hodín. Zástupcom je napr. formoterol.

- fixné kombinácie – kombinácia IKS + LABA, napr. budesonid/formoterol
- medzi ďalšie skupiny patria leukotriénové modifikátory (napr. montelukast), methylxantíny s predĺženým účinkom, systémové kortikosteroidy a biologická liečba (rekombinantná ľudská anti IgE protilátka).

2.7.3 Atopický ekzém

Atopický ekzém (AE) je väčšinou chronické ochorenie kože, výrazne svrbivé, s častým rodinným výskytom alergickej rhinokonjunktivitídy, astmy a atopických chorôb⁵¹.

AE sa vyskytuje hlavne detstve, najviac v dojčenskom a detskom veku – 60% postihnutých má prvý výsev AE v prvom roku života a 85% sa manifestuje do 5 rokov veku. Čím skôr sa AE vyskytne, tak tým je väčšia šanca toho, že i skôr odznie a asi u 75% pacientov dôjde k regresii AE do puberty, alebo majú len mierne symptómy. Do 20 rokov života väčšinou postupne vymizne. Perzistencia do dospelosti je málo častá a má potom tendenciu zmiznúť po 40. – 50. roku života. Osoby s AE majú riziko výskytu hlavne astmy (30-50 % v predškolskom veku) a alergickej nádchy. U AE rozoznávame tieto formy:

- dojčenská forma – začína obvykle v 2. – 6. mesiaci veku na tvári, neskôr i vo vlasoch a postupne prechádza na celú hlavu, krk, trup i končatiny. V období, keď dieťa začína liezť, tak sa vyskytuje hlavne na miestach s najväčším trením. Do 2 rokov spontánne regreduje, alebo pokračuje.
- detská forma - u dojčiat, predškolákov a školákov. Presúva sa do predilekčných oblastí (flexúry) a nemá už exsudatívny charakter.
- forma dospievajúcich a dospelých – vzniká samostatne alebo ako pokračovanie predchádzajúcich foriem, je v predilekčných oblastiach, výraznejšie ale hlavne v solárnej predilekcii a na rukách.

Terapia v detstve zahŕňa úpravu životosprávy, je dôležitá edukácia a adaptácia celej rodiny. Liečba je komplexná, kedy externá sa doplňuje systémovou terapiou. Je veľmi dôležitá starostlivosť o kožu, pravidelné masťovanie a aplikácia lokálnych kortikosteroidov. Sekundárna infekcia nasadajúca do terénu AE je liečená antibiotikami prípadne antimykotikami. Z celkovej terapie sa využívajú antihistaminiká (ovplyvňujú i svrbenie), v prípade ťažkých foriem i systémové kortikoidy. U závažnejších foriem sa uplatňuje i fototerapia. Veľmi dôležitá je i prevencia, kedy je nutné sa vyhýbať potenciálnym či zisteným iritujúcim látkam (potraviny, pracie prášky a pod.)⁵¹.

2.7.4 Ďalšie alergické ochorenia

Alergická nádcha (polinóza) je charakteristická zápalom sliznice nosa, ktorý sa prejavuje jej prekrvením, opuchom, produkciou sopl'a, kýchaním, svrbením nosu a pocitom ťažkosti s dýchaním. Polinóza je spôsobená hlavne reakciou na senzibilizujúci alergén, môže mať ale i celoročnú formu, ktorá postupne v chronickej fáze je už len málo závislá od vyvolávajúceho alergénu. V terapii sa snažíme o vyhýbaní sa kontaktu s alergénom, podávajú sa antihistaminiká a lokálne kortikoidy^{51,52}.

Alergiou môžu byť postihnuté i oči, s polinózou často súvisí výskyt alergickej konjunktivitídy – alergén rozpustený v slzách reaguje s IgE na spojovkách. K reakcii vedú najčastejšie peľové alergény. V terapii sa využívajú znovu systémové alebo lokálne antihistaminiká. Ďalej je možné použiť lokálne kromony a pri ťažkých formách i lokálne kortikosteroidy⁵¹.

Medzi ďalšie alergické choroby patria urtikária, alergické exantémy, potravinové alergie a reakcie na lieky. Prejavujú sa kombináciou kožných a slizničných symptómov. Najzávažnejšou formou je anafylaxia, kedy alergén vyvolá reakciu celého organizmu s rizikom úmrtia.

3. Genetika alergií

3.1 Dedičnosť alergií

Alergické ochorenia majú tendenciu sa vo zvýšenej miere vyskytovať v rodinách a tento fakt je všeobecne uznávaný. O rodinnom výskyte atopie vieme už zo starovekého Ríma, kde prejavy atopických ochorení boli popísané v Juliánsko – Klaudiánskej dynastii (cisár Augustus, jeho prasynovec Claudius a Claudiov syn Britannicus). Pravdepodobne prvým v literatúre dochovaným záznamom o výskyte astmy je popis jej familiárneho výskytu v rode manželky známeho a uznávaného lekára Daniela Sennerta z roku 1650. Sennert uvádza, že astma sa vyskytla u jeho svokra, ďalej u dvoch manželkiných bratov, u jej sestry a u dcéry tejto sestry⁵³. O dedičnosti astmy nepochyboval ani Salder v roku 1860², pri štúdiu rodín s výskytom astmy pozoroval rôzne typy dedičného prenosu a konštatoval, že prvostupňoví príbuzní astmatikov boli v 10% taktiež postihnutí týmto ochorením. Zároveň konštatoval, že v rodinách sa môže astma vyskytnúť u niekoľkých súrodencov bez toho, aby touto chorobou trpeli ich rodičia. V nasledujúcej štúdií 217 astmatikov pozoroval pozitívnu rodinnú anamnézu astmy u 39% postihnutých osôb (citované v ref.⁵⁴).

O astma sa komplexne zaujímal i tzv. otec astmy, významný americký lekár Robert Anderson Cook. Tento záujem bol u neho do veľkej miery určite ovplyvnený i tým, že i on sám bol astmatikom od 8 rokov. Vo svojich zápiskoch uvádza, že obdobie v priebehu školského roka, keď bol mimo domov, bolo pre neho veľkou úľavou, pretože nemal astmatické problémy. Prázdniny ale predstavovali nočnú moru, nakoľko po návrate domov zo školy sa astma ihneď ohlásila – pekne dokumentovaný vzťah prostredia a senzibilizácie pacienta s predispozíciou k alergickému ochoreniu. Cook bol významným mentorom celej plejády významných alergológov po celom svete a bol autorom viac než 200 rôznych publikácií⁵⁵. Prirodzene sa zaujímal aj o dedičnosť alergií a astmy, na základe

čoho boli publikované 2 štúdie v rokoch 1916 a 1924^{54,56}. V týchto výskumných projektoch sledovali výskyt atopie v rodinách u 504 a 462 osôb a 115 neatopických kontrol, pričom rodinná anamnéza v prvej štúdií bola prítomná v 48,4 %(ref.⁵⁶) prípadov, v druhej štúdií v 58,4 %(ref.⁵⁴), no v prípade kontrol sa jednalo len o 7% - tento anamnestický údaj teda predstavoval riziko s OR = 19 (95% CI 9-39). Odhadované rizika rekurencie atopie určené na základe výsledkov obidvoch štúdií boli 69 % v prípade, že obaja rodičia boli postihnutí, ďalej 58 % v prípade výskytu je jedného z rodičov a konečne len 2 % v prípade negatívnej rodinnej anamnézy atopie. Spôsob dedičnosti najlepšie zapadal do obrazu autozomálne dominantného typu s penetranciou 0,6 a zároveň pozoroval včasnejší výskyt choroby v prípade atopie oboch rodičov.

Monogénovo dominantný model dedičného prenosu ochorenia obhajovali i Butcher a Keeler⁵⁷. Wiener a spol.⁵³ vo svojej práci zameranej na rodinný výskyt alergických chorôb pracovali taktiež s monogénovo založenou teóriou a bimódovou distribúciou ochorenia vzhľadom k veku. V sledovaných rodinách nenašli jednoznačný typ dedičnosti – bol pozorovaný recesívny i dominantný typ. Vysvetlenie bimódového výskytu ochorenia potom postavili na dominantnom modeli, v ktorom homozygoti manifestovali ochorenie skôr v porovnaní s heterozygotmi v hypotetickom lokuse s alelami H a h. Atkinson⁵⁸ oproti tomu popisoval recesívny typ dedičného prenosu. Richards a Balyeat⁵⁹ zastávali zase kodominantný model.

Schwartz v roku 1952⁶⁰ referoval o výskyte astmy a alergických ochorení na skupine 191 astmatikov, pričom výskyt astmy alebo alergie bol vyšší u prvostupňových príbuzných. Dedičný prenos bol častejšie dominantný s inkompletnou penetranciou, pričom ale niektoré rodiny vykazovali recesívny charakter dedičnosti. Tieto rozdiely vo výskyte u príbuzných pripisoval epistáze a ďalej ako nevhodnú vyhodnotil teóriu Wienera a spol.⁵³ ohľadne skoršieho výskytu choroby u homozygotov.

Pri skúmaní dedičnej podstaty ochorenia majú dôležitý význam i štúdie dvojčiat. Tieto boli opakovane uskutočnené i v prípade alergických ochorení a potvrdili význam genetickej predispozície v procese rozvoja alergie^{3,4,61}. Postupne však na základe pribúdajúcej evidencie sa začala všeobecne uznávať teória o multifaktorálnej etiopatogenéze alergických chorôb (s výnimkou niektorých veľmi vzácných monogénových chorôb s alergickou zložkou, ako napr. hyperIgE syndróm v dôsledku mutácií v *STAT3*^{62,63}), kedy dochádza k interakcii faktorov vonkajšieho prostredia v teréne geneticky predisponovaného jedinca v dôsledku kombinácie zmien v génoch hlavne stredného účinku.

Heritabilita samotnej astmy je 48 – 78% a heritabilita hladiny celkových IgE je 47,3%^{64,65}. V bežnej klinickej praxi, kedy sa kalkuluje s multifaktoriálnym modelom dedičnosti alergií, sa pri genetickej konzultácii pre posúdenie rizika opätovného výskytu alergie v rodine využívajú tzv. riziká rekurencie. Je možné využiť nasledovné riziká:

1. Riziko narodenia dieťaťa s alergickým ochorením na základe pozitívnej rodinnej anamnézy⁵¹:

- 30 % v prípade alergickej choroby u jedného súrodenca,
- 40 % v prípade alergie u jedného z rodičov,
- 50 % v prípade alergie oboch rodičov,
- 70 % v prípade, že obaja rodičia trpia rovnakým alergickým ochorením.

2. Pravdepodobnosť výskytu astmy pre dieťa je uvádzaná rôzne:

A

a) len na základe výskytu choroby u rodičov⁶⁶:

- 6 % pre dieťa, ktorého rodičia netrpia astmou,
- 20 % v prípade, že jeden z rodičov je astmatik,
- 60 % v prípade výskytu astmy u oboch rodičov.

b) alternatívne je možné využiť i riziko (OR) na základe výskytu astmy i u ďalších príbuzných⁶⁷:

- 2 – 4,3x vyššie v prípade astmy jedného z rodičov
- 3,2-12,1x v prípade ochorenia u oboch rodičov
- 1,9 – 5,7x vyššie v prípade astmy u jedného súrodenca
- 2,5 – 5,8x vyššie, pokiaľ sa astma vyskytuje u rodiča alebo súrodenca

3.2 Prehľad genetických štúdií zameraných na výskyt astmy a atopie.

3.2.1 Výskyt astmy a atopie vo vzťahu k HLA systému

Alergické ochorenia sú spôsobené patologickou odpoveďou imunitného systému na vonkajšie podnety. Preto snaha odhaliť gény zodpovedné za vznik atopie alebo astmy bola v prvom rade smerovaná na HLA systém. Už v roku 1977 Saito a spol.⁶⁸ v štúdií 30 rodín s výskytom astmy aspoň u jedného člena našli silnú väzbu medzi piatimi lokusmi HLA-B a jedným lokusom pre fenotyp B buniek. V štúdií 62 pacientov s peľom indukovanou astmou a polinózou sa významne častejšie nachádzal HLA haplotyp A1 B8 pacientov než u kontrol⁶⁹. Ďalšia štúdia 57 osôb z rodín s výskytom astmy u jedného rodiča a najmenej u jedného z detí bola s nejednoznačnými výsledkami, nakoľko nebola schopná definitívne potvrdiť, ale ani vyvrátiť väzbu HLA s astmou alebo hypotetickým lokusom pre astmu⁷⁰. Autori upozorňovali na to, že táto štúdia pracovala s relatívne malým súborom pacientov, čo mohlo skresliť výsledky. Nakai a spol.⁷¹ skúmali taktiež malú skupinu 23 japonských astmatikov s vysokou hladinou celkových IgE a silno pozitívnymi kožnými testami proti americkým domácim roztočom (*Dermatophagoides farinae*). V tejto skupine však nepozorovali významne odlišnú distribúciu HLA-A, -B a -DR antigény oproti zdravým kontrolám. Relatívne veľkú väzbovú analýzu 21 markérov, mimo iné i HLA, v spojitosti s hladinou celkových IgE uskutočnili

Meyers a spol.⁷² na 2 subpopuláciach v USA. Skúmali 316 osôb z 5 mormónskych príbuzných vetví a 204 Amišov. Analýza prenosu HLA neodpovedala žiadnemu zo skúmaných modelov dedičnosti pre hladinu IgE. A navyše nebola ani zistená väzba žiadneho z analyzovaných markérov k hladine celkového IgE.

Analýza 41 astmatikov so sezónnou precitlivosťou k ambrózií s neastmatickými kontrolami párovanými na základe podobných hladín IgE odhalila signifikantne vyššie zastúpenie HLA-B5 u kontrolnej skupiny nonastmatikov⁷³. V kontrolnej skupine sa ďalej častejšie vyskytovali alely HLA-B8 a A1, avšak tento rozdiel nebol signifikantný. I keď Blumenthal a spol.⁷⁴ primárne taktiež nezistili asociáciu odpovede imunitného systému na ambróziové alergény s HLA systémom, v nasledujúcej štúdii 133 osôb s pozitívnou reakciou na antigén Ra3 zistili významnú pozitívnu reakciu u osôb s nízkou hladinou IgE a negatívnu asociáciu u osôb s vysokou hladinou IgE⁷⁵. Quiralte a spol.⁷⁶ sa taktiež zaoberali vzťahom peľovej alergie k HLA systému, vybrali si však reaktivitu proti peľu olivovníka u 146 osôb so sezónnou nádchou a / alebo astmou od apríla do júna, pričom ich celkové i špecifické IgE signifikantne korelovali s astmou. V súbore týchto osôb našli významnú väzbu HLA-DR7 a DQ2 s reakciou proti Ole e 2 antigénu a DR2(15) s reakciou proti Ole e 10 antigénu. Ďalšia pozitívna asociácia HLA-DR7 a DQ2 so špecifickými IgE, tento krát proti Ole e 1 bola pozorovaná u 40 sezónnych polinotikov (pri porovnaní s 179 zdravými kontrolami)⁷⁷.

Dotazníková štúdia uskutočnená Stephanom a spol.⁷⁸ sa zamerala na vzťah HLA II molekúl s reguláciou imunitnej odpovede na senzibilizáciu roztočmi. Pri analýze kontrolnej skupiny bez špecifických IgE (n = 20), skupiny senzibilizovanej iným alergénom (n = 22) a skupine so špecifickými IgE proti Der p 1 antigénu nenašli žiaden významný rozdiel v distribúcii HLA alel medzi skupinami s a bez reakcie proti roztočom (antigén Der p 1). Napriek tomuto však našli asociáciu DRB- a DPB-haplotypov s anamnézou astmy, polinózy a atopie (definované ako výskyt astmy a/alebo polinózy

a/alebo ekzému). V protiklade s tým zase analýza 102 atopických a 87 neatopických astmatikov so 150 zdravými kontrolami z roku 2000 zlyhala v snahe nájsť asociáciu HLA I alebo II s atopickou / neatopickou astmou⁷⁹.

Všetky tieto výsledky poukázali na to, že HLA systém má určitú úlohu pri vzniku alergií a to aj s ohľadom na opakovanú asociáciu relevantnej oblasti na 6p s výskytom alergických chorôb. Táto úloha však nie je úplne jasná a význam HLA by mohol byť skôr v procese vzniku špecifickej senzibilizácie na peľové alergény.

V poslednej dobe dochádza k určitej renesancii záujmu o úlohu HLA pri vzniku alergií. Nedávna väčšia štúdia chorvátskych detských astmatikov sa zaoberala znovu asociáciou HLA s výskytom alergie⁸⁰. Do výskumu bolo zaradených 143 atopických astmatikov a 163 nepríbuzných zdravých kontrol, pričom sa zohľadňovali celkové i špecifické IgE proti bežným vzdušným alergénom. HLA-B8 antigén bol signifikantne častejšie prítomný u astmatikov, ďalej i v podskupine pacientov s elevovanou hladinou celkových IgE i špecifických IgE proti alergénom Der p, Der p + Dact g a Amb a. Z HLA II triedy vykázal pozitívnu asociáciu s astmou a atopiou haplotyp HLA-DRB1*01, s hladinou totálnych IgE nad 400 kU/l u pacientov bol asociovaný zase haplotyp HLA-DRB1*03. Naopak haplotyp HLA-DRB1*016 bol s astmou asociovaný negatívne⁸⁰. Asociácia HLA II haplotypov bola potvrdená i v štúdiu 40 astmatických farmárov vo Fínsku senzibilizovaných alergénmi kravských šupín⁸¹. Frekvencia aliel DRB1*0101, DRB1*0404, DQB1*0302, a DQB1*0501 bola významne vyššia práve u osôb senzibilizovaných antigénom Bos d 2. Naopak alely HLA-DRB1*0301 a DQB1*0201 sa u alergikov vyskytovali významne menej v porovnaní s kontrolami. Spojenie HLA s výskytom alergií potvrdili i recentné celogenómové asociačné štúdie (GWAS), pričom štatistický významnú väzbu s celkovými IgE v metaanalýze dosiahli oblasti s HLA-G, HLA-DQA2, HLA-A a HLA-DRB1^{82,83}.

3.2.2 Väzbové a celogenómové štúdie hľadajúce lokusy pre astmu a atopiu

Astma i atopia z pohľadu dedičnosti patria medzi komplexné znaky. Štúdium dedičnosti takýchto znakov je komplikované napríklad i tým, že v sledovaných rodinách nevykazujú konzistentný typ mendelovskej dedičnosti a za ich rozvoj odpovedá interakcia viacerých génov spolu s vplyvmi prostredia. Pre štúdium týchto ochorení je preto dôležité vyberať i vhodné prístupy analýzy. Najčastejšie sa využívajú 2 postupy, ktoré sa v dnešnej dobe v dôsledku revolúcie molekulárnych biotechnológií používajú často spoločne (tzv. pozične kandidátsky prístup) a v podstate obe v rôznej miere využívajú väzbovú analýzu (v tomto prípade neparametrickú). Jedná sa o metódu funkčného a pozičného klonovania⁸⁴.

Metóda funkčného klonovania pracuje s už známym génom, u ktorého už je známy vzťah k chorobe, alebo sa tento vzťah dá predpokladať vzhľadom k jeho funkcii. U takéhoto génu uskutočníme asociačnú / kosegregačnú analýzu jeho polymorfizmov so skúmaným znakom. Druhá metóda (pozičné klonovanie) naproti tomu priamo nadväzuje na výsledky väzbových analýz. Sledujeme v nej rodiny / osoby s opakovaným výskytom skúmaného znaku, u týchto osôb určíme genotypy vybraných markérov (väčšinou sa jedná o STR polymorfizmy) rozprestretých po celom génome a sledujeme charakter ich distribúcie na chromozómoch u sledovaných osôb. Miesta vykazujúce najvyššiu väzbu k sledovanému znaku sa označujú ako lokusy a v ich blízkosti by sa mal nachádzať potenciálne kauzálny gén / gény. Takéto gény sa snažíme pomocou rôznych prístupov analyzovať a evaluovať ich vplyv na sledovaný znak / chorobu (analýza výskytu mutácií, asociačné štúdie polymorfizmov a pod.).

Prvou štúdiou, ktorá úspešne popísala lokus odlišný od HLA systému, bola analýza rodín s IgE odpoveďou proti bežným inhalačným alergénom. Cooksom a spol.¹⁷ v nej študovali rodiny vykazujúce dominantný typ prenosu a u 7 rodín našli väzbu s lokusom v oblasti 11q13 (polymorfizmus D11S97). Vzhľadom

k zisteniu, že atopia sa omnoho častejšie vyskytovala u detí matiek s atopiou, než u detí atopických otcov, tak sa Cookson a spol.⁸⁵ následne venovali vplyvu parentálnemu pôvodu lokusu na vznik alergie. Sledovali rodiny s výskytom atopie – súrodenecké páry, u ktorých atopia bola definovaná ako reaktivita pri kožných testoch so zostavou bežných alergénov cez 2mm, zvýšená hladina celkových IgE, alebo pozitívny RAST (z angličtiny radioallergosorbent test) na prítomnosť špecifických IgE. Postihnuté súrodenecké páry zdieľali alelu na 11q13 zdedenú od matky v 62% a v 32% od otca ($p=0.001$). Analýza len paternálne prenesených aliel nezistila žiadny rozdiel v distribúcii medzi týmito súrodeneckými párami. Pozorovaný fakt závislosti výskytu choroby na maternálnom pôvode alely si autori vysvetľovali paternálnym genómovým imprintingom alebo maternálnymi vplyvmi na vyvíjajúci sa imunitný systém dieťaťa. V tretej štúdii pokračovala táto autorská skupina v analýze 155 súrodeneckých párov s alelou na 11q13 zdedenou maternálne a v tejto lokalite sa snažili nájsť ďalšie markéry predisponujúce k atopii. Zistili, že β podjednotka Fc ϵ RI tiež leží v tejto lokalizácii (11q13) a je v silnej väzbe k hypotetickému génu pre atopiu⁸⁶. V neskoršej štúdii 1004 osôb z 230 dvoj generáčnych rodín zameranej na dva polymorfizmy v géne pre Fc ϵ RI β našli prítomnosť oboch polymorfizmov (Leu181/Leu183) u 4,5% osôb a všetky deti, ktoré toto zdedili od matky, boli atopické⁸⁷. Takéto deti v porovnaní s ostatnými v štúdii mali zvýšené riziko výskytu pozitívnych výsledkov kožných testov (roztoče, trávy), špecifických IgE (pozitívny RAST) a pre výskyt BHR (provokácia metacholínom). Deti, ktoré tieto polymorfizmy zdedili od otca boli negatívne pri všetkých testoch. Na základe týchto testov navrhli, že Leu181/Leu183 polymorfizmy v géne pre Fc ϵ RI- β zdedené od matky predstavujú riziko pre rozvoj atopie a BHR. Pozitívnu asociáciu len samotného polymorfizmu Leu181 s hladinou celkových IgE i špecifických (traviny) bola neskôr zistená i v štúdii ďalších 10 britských rodín a to znovu len v prípade prenosu Leu181 od matky⁸⁸. Vplyv maternálne preneseného Leu181/Leu183

a ďalších sledovaných polymorfizmov v FceRI β bola potvrdená i v talianskej štúdií 77 atopických detí⁸⁹.

Asociácia 11q13 s atopiou zároveň odštartovala celý rad následných replikačných štúdií. Prvé však neboli presvedčivé⁹⁰. Coleman a spol.⁹¹ svojou väzbovou analýzou 95 rodín s aktívnym atopickým ekzémom vylúčili 11q13 ako majoritný lokus pre atopiu. Ďalej nepozorovali ani signifikantný rozdiel v distribúcii aliel medzi súrodeneckými pármí vzhľadom k ich parentálnemu pôvodu, maternálny vplyv na dedičnosť atopie ale nemohli vylúčiť. Väzba tejto oblasti k hladine IgE (celkových i špecifických – roztoče a traviny) nebola preukázaná ani v holandskej populácii, jediná slabá pozitívna väzba bola pozorovaná s BHR⁹². Asociáciu atopie s 11q13 sa pokúsili replikovať i Hizawa a spol.⁹³ v 4 veľkých rodinách s autozomálne dominantným typom prenosu atopie, ich snaha však bola neúspešná. V ďalšej štúdií pracujúcej so 14 atopickými rodinami a 120 nepribuznými japonskými osobami však našli asociáciu D11S97/PstI 0,96 kb alely so zvýšenou hladinou celkových IgE. S využitím mnoho-početovej väzbovej analýzy však už lokus 11q13 nebol potvrdený ako hlavný lokus pre kontrolu atopie v japonskej populácii. Určitý vplyv na kontrolu IgE tým autori nevylúčili, poukázali však na evidentnú heterogenitu pri porovnaní s britskou populáciou⁹⁴. Naproti tomu úspešne dopadla štúdiá 270 atopických astmatikov a 4 rozsiahlych rodín, keby v japonskej populácii bola potvrdená asociácia 11q13 (markér D11S97 a gén pre FceRI β) s ťažkou atopiou za predpokladu nevyvážených pomerov maternálnych a paternálnych meióz, čím tiež poukázali na úlohu genómového imprintingu v tomto lokuse⁹⁵. Pozitívna väzba 11q13 bola replikovaná i v juhokórejskej populácii, ale len s pozitívnosťou kožných testov, táto väzba nebola zistená pre BHR⁹⁶. Replikácia tohto lokusu sa podarila aj v samotnej britskej populácii pri rozšírení skúmanej skupiny na 64 mladých nukleárných rodín⁹⁷. Väzbu 11q13 s atopiou u astmatikov potvrdila i štúdiá holandských 26 jadrových rodín so súrodeneckými pármí s astmou a atopiou. Rozdiel v distribúcii sledovaných markérov vzhľadom k parentálnemu

pôvodu nebol pozorovaný⁹⁸. Výsledky týchto replikačných štúdií naznačujú, že lokus 11q13 má význam pri vzniku atopie, gény z tejto oblasti však nebudú zo skupiny génov veľkého účinku.

Oblasť na 5q obsahuje mnohé kandidátne gény, ktoré môžu ovplyvňovať IgE a zápalovú reakciu. Meyers a spol.⁹⁹ sa preto rozhodli pre analýzu markérov na 5q u súrodeneckých párov a väzbu tohto lokusu k zvýšeným hladinám IgE a to s recesívnym typom dedičnosti. Xu a spol.¹⁰⁰ uskutočnili dvoj - lokusovú analýzu u 92 rodín s výskytom astmy a našli väzbu IgE hladiny do oblasti 5q31-q32, pričom väzba bola silnejšia práve pri použití modelu s dvomi lokusmi. Pokus o zmapovanie tohto druhého lokusu si vzala za cieľ nasledujúca štúdia rozšírená o 108 probandov a ich rodiny a to na základe rovnakej metódy výberu. Autori v tejto štúdii za použitia zmiešaného modelu s dvomi hlavnými génmi zistili, že druhý lokus modifikuje efekt toho prvého, pretože väzba k elevovaným hladinám IgE bola pozorovaná len v prípade kombinácie homozygotného rizikového genotypu v prvom lokuse s aspoň jednou rizikovou alelou v druhom. Celogenómovým screeningom všetkých 200 holandských rodín našli väzbu k lokusom na 7q (LOD skóre 3,65, $p=0,00002$), 5q (LOD 2,73, $p=0,0002$) a 12q (LOD skóre 2,46, $p=0,0004$). LOD skóre nad 2,0 bolo pozorované ešte pre lokusy na chromozómoch 3 a 13¹⁰¹. Väzbu tohto lokusu však nepozorovali Blumenthal a spol.¹⁰² v štyroch veľkých rodinách s výskytom atopie, predpokladali teda existenciu niekoľkých génov veľkého účinku, ktoré spolupracujú s vplyvmi vonkajšieho prostredia pri vzniku výsledného fenotypu astmy alebo alergie. V celogenómovej štúdii skupiny vedenej Danielsom¹⁰³ však, i navzdory nálezu 6 možných väzieb k fenotypom súvisiacim s astmou, nebola potvrdená väzba IgE alebo BHR s vyšetrenými markérmami na 5q. Väzba oblasti 5q32-q33 s hladinou IgE alebo s BHR nebola pozorovaná ani v prípade výzkumu 67 rodín zo Škótska¹⁰⁴.

Ďalší významný stimul k hľadaniu lokusov a následne i génov zodpovedných za vznik astmy alebo IgE, mimo prístup pomocou štúdia kandidátskych génov, priniesli celogenómové

štúdie. Tieto zaznamenali svoj skutočný rozmach s širokou dostupnosťou moderných technológií s obrovskou rozlišovacou schopnosťou (dostupnosť obrovského množstva sledovateľných markérov v rámci jedného vyšetrenia), vo výskume chorôb s komplexnou etiopatogenezou sa začali využívať tzv. celogenómové asociačné štúdie (GWAS – genome wide association study). Na základe tohto prístupu boli určené, ďalšie potenciálne lokusy pre astmu alebo atopiu. Štúdia Danielsa a spol.¹⁰³ našla celkovo 6 lokusov asociovaných s astmou (atopickou) alebo súvisiacimi fenotypmi, mimo iné i 11q13 (už známy z predchádzajúcich štúdií⁸⁵) a 7p. Celogenómová analýza z roku 1997, ktorá skúmala 140 rodín s 2 a viacerými súrodencami s astmou z 3 rozličných rás sa zamerala na vyhľadávanie nových lokusov s väzbou k výskytu astmy¹⁰⁵. Celkovo sa im podarilo odhaliť väzbu astmy so 6 novými lokusmi: 11p15 (p=0.0089) a 19q13 (p=0.0013) v skupine belošskej populácie, 2q33 (p=0.0005) a 21q21 (p=0.0040) u Hispáncov a lokusy 5p15 (p=0.0008) a 17p11.1-q11.2 (p=0.0015) v rodinách afro - amerického pôvodu.

Populačne izolované skupiny, s malým množstvom „zakladateľov“, sú veľmi obľúbené pri hľadaní genetických faktorov prispievajúcich k vzniku choroby a to už od 70. rokov 20. storočia^{106,107}. Ober a spol.¹⁰⁸ sa rozhodli hľadať nové lokusy asociované s astmou v populácii Huteritov. Jedná sa o nábožensky izolovanú skupinu, ktorá má svoj pôvod z Tyrolských Álp, do severnej Ameriky sa odsťahovali v 80. rokoch 18. storočia. Pre celogenómovú analýzu boli vybrané 4 príbuzné kolónie Huteritov, v ktorých sa v zvýšenej miere vyskytuje astma. K analýze použili 292 autozómových markérov a 3 z pseudoautozómovej oblasti, a analýzu uskutočnili v 2 veľkých skupinách – v primárnej (361 osôb) a v skupine k replikácii výsledkov (292 osôb, z ďalších 5 kolónií v Južnej Dakote). V každej skupine boli osoby bez astmy, s astmou, symptomatické osoby s nejednoznačnou BHR a osoby s BHR a nejednoznačnou anamnézou. V primárnej skupine našli 10 oblastí s možnou väzbou k astme. Väzbu s astmatickými fenotypmi

v oboch skupinách, primárnej i pre replikáciu, však vykazovali len 4 lokusy: 5q23–31, 12q15–24.1, 19q13 a 21q21. Možná väzba ďalšieho lokusu 3p24.2–22 bola u Huteritov pozorovaná po prvý krát. Tieto výsledky poukázali na to, že i v populácii s relatívne malou genómovou diverzitou (malé množstvo pôvodný, rozdielnych genómov) je za vznik astmy zodpovedných viacero lokusov.

Celogenómová štúdia 58 rodín afro-amerického pôvodu hľadala lokusy asociovateľné s hladinou špecifických IgE a výsledkami kožných testov proti vybraným alergénom. Hizawa a spol.¹⁰⁹ v nej našli väzbu lokusu 5q31-q33 so špecifickou odpoveďou proti alergénu psov. Lokus 11q13 bol spojený s hladinou špecifických IgE proti peľu bermudskej trávy (troskut prstnatý, *Cynodon dactylon*), alergénu mačiek a roztočom (*Dermatophagoides farinae*). Obidva tieto lokusy boli ďalej spojené s pozitívnym výsledkom kožných testov proti aspoň jednému z 30 bežných alergénov.

Výskyt lokusov spojených s alergickou astmou bol sledovaný i na myšacom modeli. Zhang a spol.¹¹⁰ v tejto štúdií našli 5 potenciálnych lokusov viazaných na výskyt fenotypov asociovaných s astmou, z nich 4 (s potenciálnou väzbou k BHR) korešpondovali ľudským lokusom 11q23, 12q22-q24, 17q12-q22 a 6p21, ktoré už boli predtým asociované so znakom súvisiacim s astmou.

V 97 nemeckých rodinách s výskytom astmy bolo sledovaných celkovo 156 súrodeneckých párov. Celogenómová štúdia našla potenciálnu väzbu lokusov na chromozómoch 2, 6, 9 a 12 s astmou a aj s hladinou celkových či špecifických IgE¹¹¹. V rozsiahlej talianskej štúdií detí zo 172 rodín, 189 sporadických prípadov s výskytom hlavných atopických chorôb a 77 nepríbuzných kontrol bol uplatnený prístup analýzy kandidátnych génov i celogenómová analýza¹¹². Táto štúdia zistila väzbu lokusu pre FcεRI s BHR a pozitívnym kožným testom u súrodeneckých párov, ďalej i väzbu mutácie NcoI v géne pre lymfotoxín α (LTα) s astmou a genotyp 2/2 NcoI v LTα bol pozorovaný u všetkých dievčat

s elevovanými IgE. Žiadna väzba nebola nájdená pre variantu -308 v TNF α ani pre mutáciu Q576R v géne pre IL4 receptor. Zvýšená hladina IgE, astma a BHR boli spojené s PAR2 lokusom na chromozóme X. S astmou bol spojený lokus na chromozóme 12, BHR s miestom na chromozóme 14 a atopia s chromozómom 19¹¹². Alcaïs a spol.¹¹³ skúmali astmatické deti nemeckého pôvodu, uskutočnili GWAS zameranú na lokusy pre astma a vek nástupu pískanie. Mimo lokusy, ktoré už boli predtým spojené s výskytom astmy, našli väzbu lokusu 12q24-q25 práve k veku nástupu pískotov u astmatikov.

Vplyv prostredia pri vzniku alergických chorôb a hlavne astmy má nezanedbateľnú úlohu. Colilla a spol.¹¹⁴ sa preto vo svojej GWAS zamerali na spojitosť genetickej predispozície a cigaretového dymu. Signifikantná väzba ($p < 0,05$) sa prejavila v lokusoch 1p (markéry D1S1669-D1S1665), 5q (markéry D5S1505-D5S816) a 9q (markér D9S910). Lokusy 1q a 17p síce nedosiahli nominálnu signifikanciu, ale stále dosiahli významného rozdielu od základnej hladiny LOD skóre pri kalkulácii s cigaretovým dymom v analýze. Táto štúdia poukázala na vplyv expozície faktorom vonkajšieho prostredia pri vzniku astmy.

Pomyselným vrcholom pri hľadaní génov zodpovedných za vznik astmy a atopických ochorení sú meta-analýzy a potom i moderné GWAS štúdie pracujúce s obrovským súborom skúmaných osôb i študovaných polymorfizmov a plne využívajúce metódy NGS (z angl. Next Generation Sequencing). Wise¹¹⁵ v roku 2001 referoval o výsledkoch meta-analýz, ktoré určili silnú väzbu predispozície k astme s lokusom na 6p a ďalej s lokusmi na chromozómoch 2, 9, 10 a 15. Denham a spol.¹¹⁶ v roku 2008 uskutočnili meta-analýzu 11 GWAS, ktoré vyhoveli ich selekčným kritériám – humánne štúdie kaukazských populácií, práca písaná v angličtine, obdobie 1996 – 2006, vylúčenie prehľadových článkov, dostupnosť celogenómových dát a dostupné údaje o LOD skóre. Dôkaz významnej väzby BHR bol zistený s lokusmi 2p12-q22.1, 6p22.3-p21.1 a 11q24.1-qter (989 rodín). S pozitívnosťou kožných testov boli spojené lokusy 3p22.1-

q22.1 a 17p12-q24.3 (1093 rodín). Hladina celkových IgE bola v signifikantnej väzbe s lokusmi 5q11.2-q14.3 a 6pter-p22.3 (729 rodín). Astma ako taká (fenotyp = astma, bez ďalšej definície) nebola na celogenómovej úrovni v signifikantnej väzbe k žiadnemu lokusu (hladina celogenómovej významnosti bola určená ako $p < 0,000417$), avšak analýza našla 8 lokusov naznačujúcich väzbu s astmou ($p < 0,0083$). Tento výsledok potvrdzuje prítomnosť genetickej i fenotypovej heterogenity astmy. Súčasne po prvý raz boli lokusy 5q11.2-q14.3 a 11q24.1-qter určené ako predisponujúce k alergickému ochoreniu / fenotypu.

Meta-analýza z roku 2010 hodnotila 20 nezávislých GWAS uskutočnených v etnicky rozdielnych populáciách (celkovo nad 3024 rodín). V týchto GWAS bola sledovaná väzba k astme, atopickej astme, BHR a 5 atopickým znakom: celkové IgE, pozitívnosť kožných testov (SPT) k najmenej jednému alergénu či k roztočom, kvantitatívne skóre SPT (QSPT) a eozinofília. V európskych rodinách (2 astmaticí súrodenci) bola astma na celogenómovej úrovni spojená s lokusmi 2p21-p14 a 6p21. V týchto rodinách boli súčasne určené i ďalšie lokusy vo väzbe k atopickým fenotypom: 3p25.3-q24 oblasť vo všetkých rodinách s SPT a ďalej 5q23-q33 lokus s SPTQ, lokus 2q32-q34 s eozinofiliou a oblasť 17q12-q24 bola vo väzbe s SPT. V teste heterogenity medzi všetkými štúdiami a európskymi štúdiami boli s astmou spojené lokusy 2p21-p14 a 6p21 a s atopickou astmou zase lokus 1q23-q25¹¹⁷.

Meta-analýza etnicky rozličných populácií severnej Ameriky (euro americká, afro – americká / karibická a latinského pôvodu) našla 5 lokusov pre náchylnosť k astme¹¹⁸. Z týchto lokusov 4 boli potvrdené už predtým (v oblasti 17q21 v blízkosti génov pre IL1RL1, TSLP a IL33), pričom ale podľa autorov po prvý raz boli tieto lokusy potvrdené vo všetkých troch populáciách súčasne. Táto meta-analýza zároveň odhalila nový lokus 1q23 s náchylnosťou k astme a síce *PYHINI*, ktorý bol špecifický pre osoby afrického pôvodu ($p = 3,9 \times 10^{-9}$).

Obrovská GWAS štúdia tzv. GABRIEL konzorcium z roku 2010 študovala 582 892 jednonukleotidových polymorfizmov (SNP) 10 365 astmatikov a 16 110 kontrol, čo predstavovalo približne 15,4 miliardy určených genotypov. Celogenómová asociácia bola zistená pre polymorfizmy rs3771166 na chromozóme č. 2 (oblasť IL1RL1/IL18R1, $p = 3 \times 10^{-9}$), rs9273349 na chromozóme č. 6 (oblasť HLA-DQ, $p = 7 \times 10^{-14}$) a ďalej polymorfizmy rs1342326 na chromozóme č. 9 (lemujúci lokus pre IL33, $p = 9 \times 10^{-10}$), rs744910 na chromozóme č. 15 (v lokuse pre SMAD3, $p = 4 \times 10^{-9}$) a polymorfizmus rs2284033 na chromozóme č. 22 v géne pre IL2RB ($P=1.1 \times 10^{-8}$). V tejto analýze bol určený i lokus špecifický pre astma s nástupom v detskom veku a to konkrétne v mieste s ORMDL3/GSDMB na chromozóme 17q21 (rs2305480, $P=6 \times 10^{-23}$)(ref.¹¹⁹). Spycher a spol.¹²⁰ na výsledky tejto štúdie nadviazali a ďalej ju rozšírili o genotypizáciu 8365 detských astmatikov z ALSPAC štúdie. Pre stanovenie hladín významnosti v tejto kohorte ALSPAC detí použili genotypizačné dáta astmatických detí z GABRIEL štúdie, sledované SNP rozdelili na s vysokým a nízkym hodnotením / stupňom. Ich cieľom bolo posúdiť tiež i vplyv SNP s nízkym stupňom, ktoré často môžu byť v množstve sledovaných SNP prehliadané (tzv. falošná negatívnosť). Alecké skóre hodnotené z 46 SNP s najvyšším hodnotením bolo asociované s fenotypom včasného nástupu perzistujúceho pískania ($p < 10^{-11}$) a intermediárnej doby nástupu pískania ($p < 10^{-3}$). V skupine SNP hodnotených nízkym stupňom bola zase nájdená asociácia s diagnózou astmy ($p < 10^{-4}$) a atopiou ($p < 10^{-5}$).

Zatiaľ posledná meta-analýza, súčasne kombinovaná s GWAS, študovala taktiež lokusy zodpovedné za vznik astmy. U sledovaných osôb potvrdila asociáciu s už predtým zistenými lokusmi v prípade miernej až stredne závažnej astmy. Najsilnejšie asociáciu vykazoval lokus s *ORMDL3/GSDMB* na chromozóme 17q12-21 a to s celogenómovou signifikanciou. I keď tesnú, ale celogenómovú významnú asociáciu bolo možné potvrdiť i pre locus

s *IL1RL1/IL18R1* v oblasti 2q12. Boli nájdené aj ďalšie nové lokusy so suspektnou väzbou, avšak nedosiahli celogenómovú významnosť. V tejto štúdie teda nebol nájdený žiadny nový lokus, ktorý by naplnil podmienky celogenómovej signifikancie¹²¹.

3.2.3 Prehľad vybraných lokusov / kandidátskych génov

3.2.3.1 chromozóm 4

V rozličných typoch buniek dýchacích ciest priedušiek je endotelín 1 (ET1, gén *EDN1*, 6p24.1¹³²), ktorý je zapojený do patogenézy astmy na mnohých miestach, ako napr. proliferácia a kontrakcia bronchiálneho svalstva či spolupráca na aktivácii mitogenézy v dýchacích cestách¹³³. ET1 účinkuje cez 2 receptory – typ A (ET-RA, gén *EDNRA*, 4q31.22¹³⁴) a typ B (ET-RB, gén *EDNRB*¹³⁵).

Mao a spol.¹³⁶ sa rozhodli analyzovať tieto 3 gény v skupinách vybraných z britskej (150 osôb s atopickou astmou, 150 kontrol) a japonskej populácie (100 osôb s atopickou i neatopickou astmou, atopickou nádchou a atopickým ekzémom; 100 kontrol). Analýzou frekvencií genotypov variant v týchto génoch ale nenašli väzbu atopickej astmy s *EDN1* ani s *EDNRB*. Táto väzba však bola hranične určená pre *EDNRA* ($p = 0,022$; $P_c = 0,066$) a ešte výraznejšie s hladinou špecifických IgE proti roztočom a zmesi trávín ($p = 0,006$; $P_c = 0,018$) v britskej populácii¹³⁶.

3.2.3.2. chromozóm 5

Oblasť 5q31-q33 bola niekoľkými štúdiami určená ako spoluzodpovedná za reguláciu hladiny IgE^{99,137} a taktiež bola spojená s predispozíciou k vzniku BHR¹³⁸.

Tabuľka č.1 Výsledky GWAS zameraných na výskyt astmy alebo atopických chorôb do roku 2004.

Autor	Populácia	Chromozóm / lokus							
Blumenthal a spol. ¹²²	zmiešaná USA	5q	8p	10p	11q	12p	14q	17q	20p
Bouzigon a spol. ¹²³	francúzska	6q14	12p13	17q22-q24	21q21				
Bradley a spol. ¹²⁴	švédska	3p24-22	3q14	13q14	15q14-15	17q21	18q21		
Colilla a spol. ¹²⁵		6	2	12					
Colilla spol. ¹¹⁴	zmiešaná USA	1p, 1q	5q	9q	17p				
Eederwagh a spol. ¹²⁶		20q13							
Jiang spol. ¹²⁷	nemecká / CSGA	5p13.1	6p22.1	11p15.4	12q21.32-21.33				
Koppelman a spol. ¹²⁸	holandská	11q	17q	22q					
Malerba a spol. ¹¹²		12q13.13	14q32.12	19q13.41					
Ober a spol. ¹⁰⁸	Hutteriti	3p24.2-22	5q23-31	12q15-24.1	19q13	21q21			
Stassen, Scharfetter. ¹²⁹		1	3	4	5	6	8	12	13
Wjst a spol. ¹¹¹	nemecká	2pter	6p21.3	9q31	12q13				
Xu a spol. ¹³⁰	zmiešaná USA	5q31	8p23	12q22	15q13				
	európski belosi	6p21							
	afro-američania	11q21							
	hispánska	1p32							
Yokouchi a spol. ¹³¹	japonská	4q35	5q31-q33	13q11					
		6p22-p21.3	12q21-q23	13q14.1-q14.3					

 FEV1
 kožné testy
 at. ekzém
 at. ekzém 2
 astma
 šIgE
 ekzém + šIgE
 BHR
 atopia
 astma+IgE+šIgE

Vysvetlivky: šIgE – hladina špecifických IgE; astma+IgE+šIgE – lokus asociovaný s astmou, i celkovými IgE i šIgE; at. ekzém = atopický ekzém; ekzém + šIgE = lokus asociovaný s výskytom atopického ekzému i šIgE; at. ekzém 2 = lokus asociovaný s atopickým ekzémom, kedy sa navyše hodnotilo i množstvo alergénov, na ktoré pri testoch vyšetovaná osoba reagovala; FEV1 – spirometrický parameter

Gén pre β 2-adrenoreceptor (ADRB2) sa nachádza práve v tejto oblasti, konkrétne v 5q32¹³⁹. V ADRB2 bolo popísaných niekoľko polymorfizmov, ale len niektoré majú i skutočný klinický dopad. V prípade Arg-Gly 16 substitúcie dochádzalo *in vitro* k zvýrazneniu down - regulácie β 2 adrenoreceptorov po provokácii agonistami, zatiaľ či v prípade Gln-Glu 27 substitúcie dochádza k oslabeniu down regulácie tohto receptora^{140,141}. Gly 16 forma receptora bola spojená s nočným poklesom spirometrických parametrov a zvýšenou BHR^{142,143}. Glu 27 forma bola naproti tomu spojená so zníženou reaktivitou dolných dýchacích ciest u miernych až stredne závažných astmatikov¹⁴⁴. Štúdia 60 rodín s astmatikmi našla asociáciu Glu 27 v *ADRB2* a zvýšenou hladinou IgE¹⁴⁵. Asociácia týchto dvoch variant v pozíciách 16 a 27 však nebola zistená s výskytom astmy a atopie ako takej. I keď tieto 2 polymorfizmy neprispievajú zásadne k rozvoju astmy, tak určite budú mať modifikujúci vplyv na priebeh choroby¹⁴⁵.

V lokuse 5q je lokalizovaný i gén pre IL-9, konkrétne v oblasti 31.1¹⁴⁶. V experimente na myšiach bol lokus pre IL-9 spojený s BHR a expresia IL9 bola znížená u myši so zníženou bronchiálnou reaktivitou¹⁴⁷. Ba čo viac, i u transgénnych myši s konštitutívnou expresiou IL-9 bol pozorovaný výskyt fenotypov podobných astme – prítomnosť eozinofilného a lymfocytového zápalu, nadprodukcia hlienu a hyperplázia pohárikových buniek. Zároveň bola zistená i prítomnosť Th2 cytokínov (napr. IL-4, IL-5, IL-13), pričom ale najdôležitejšiu úlohu z nich v tomto prípade v dýchacích cestách má IL-13 – u RAG1 deficitných myši s konštitutívnou produkciou IL-9 bola pozorovaná zvýšená produkcia IL-13 v epiteli dýchacích ciest¹⁴⁸.

Laitinen a spol.¹⁴⁹ sledovali 157 rodín s výskytom astmy z izolovanej fínskej oblasti Kainuu a hľadali v nich väzbu 6 markérov z 5q (mimo iné i IL-9) s výskytom astmy. Túto však nenašli ani pomocou podrobnej permutačnej analýzy, ani pomocou sekvenovania IL-9 a preto dospeli k názoru, že je nepravdepodobné, aby oblasť 5q31 prispievala k dedičnosti sérových IgE alebo

k rozvoji astmy vo fínskej populácii¹⁴⁹. Význam IL-9 v patogenézy astmy bol potvrdený v experimente s myšami, ktorým bol IL-9 instilovaný intratracheálne po dobu 10 dní. U týchto myší bola následne zistená zvýšená sérová hladina IgE a v bronchoalveolárnej laváži bola zistená pľúcna eozinofília¹⁵⁰.

Niimy a spol. objavili v oblasti 5q31-q34 gén pre uteroglobínu príbuzný proteín (*UGRP1*) a jeho exprimáciu pozorovali v priedušnici a pľúcach, pričom zníženie hladiny *UGRP1* mRNA bolo pozorované v pľúcach myší s antigénom indukovanou pneumóniou¹⁵¹. Ďalej zistili, že genotypy -112A/-112A a -112A/-112G v tomto géne boli signifikantne asociované s astmou¹⁵². V replikačnej štúdii 47 japonských rodín s astmatickými deťmi však asociáciu týchto genotypov ani jednotlivých aliel s astmou nepotvrdili¹⁵³.

3.2.3.3 chromozóm 6

V oblasti 6p21.3 sa nachádza TNF génový komplex, a to medzi skupinami génov pre HLA II/III a HLA I. triedy¹⁵⁴. V tomto komplexe sa nachádzajú gén pre lymfotoxín- α (LTA, LT α , TNFSF1, TNF β), za ním nasleduje tumor nekrotický faktor (TNF, TNF α) a v protismernej orientácii potom ešte lymfotoxín- β (LT β)¹⁵⁵. TNF bol určený ako silný prozápalový cytokín zvyšujúci BHR u ľudí^{156,157}.

Zvýšené hladiny TNF boli nájdené v dýchacích cestách i v broncho – alveolárnych výplachoch^{158,159}. Jeho zvýšená sekrecia by mohla byť v súvislosti s alelou č. 1 NcoI polymorfizmu (zámena G na A, intrón č.1) v *LTA*¹⁶⁰ a ďalej s alelou č. 2 varianty v pozícii -308 v promótorovej oblasti *TNF*, pri ktorej bola pozorovaná 6 – 7x vyššia expresia v porovnaní s bežnou variantou¹⁶¹. V štúdii 88 austrálskych nukleárných rodín s 92 astmatikmi, sa preukázal významne častejší výskyt uvedených polymorfných aliel práve u osôb s astmou. Táto asociácia bola zároveň obmedzená na haplotyp zložený z týchto variant (LT α NcoI*1 / TNF-308*2

haplotyp) a preto nebolo možné rozlíšiť samostatný efekt jednotlivých polymorfnych aliel¹⁶².

Ďalšia austrálska štúdia taktiež potvrdila asociáciu týchto dvoch polymorfizmov s výskytom astmy, avšak v inverznom vzťahu než predchádzajúca štúdia – s astmou boli asociované alely *LTα* NcoI*2 a *TNF*-308*1. Autori ďalej pozorovali lineárny trend zvyšujúceho sa rizika výskytu astmy v závislosti od všetkých možných genotypov (homozygoti pre uvedené asociované alely mali riziko najväčšie), a to v prípade oboch polymorfizmov¹⁶³.

K podobným záverom došla i štúdia 131 talianskych rodín s deťmi s atopickou astmou¹⁶⁴. Táto našla významnú asociáciu *LTα* NcoI*2 s pozitívnosťou kožných testov a atopiou (definovaná ako zvýšené hladiny IgE, pozitívnosť kožných testov, alebo prítomnosť oboch týchto fenotypov). Asociácia síce nebola potvrdená pre polymorfizmus v *TNF*, ale haplotypová analýza týchto polymorfizmov bola s pozitívnym výsledkom. Autori konštatovali významné rozdiely v alelových frekvenciách v týchto troch populáciách (talianska, 2 austrálske), pričom si to vysvetľovali možným vplyvom HLA lokusu (*TNF* lokus je v silnom disekvilibriu s HLA DR). Zároveň poukázali na to, že austrálske štúdie pracovali s osobami, ktoré nezdiedali rovnaké ale veľmi odlišné prostredie, čo mohlo viesť k rozdielnej imunologickej polarizácii osôb v nich zaradených a tým aj k ovplyvneniu výsledkov asociácie analýzy¹⁶⁴.

Vplyv HLA bol pozorovaný i pri náchylnosti k potravinovým alergiám – v 37 rodinách s výskytom alergie na arašidy bol pozorovaný významne vyšší výskyt genotypov DRB1*08, DRB1*08/12 tyr16 a DQB1*04 v porovnaní s kontrolnou skupinou¹⁶⁵. Distribúciu HLA-DRB1 v 230 rodinách z Busseltonu sledovala skupina Moffattovej a spol.¹⁶⁶, pričom našli väzbu tohto génu k hladine celkových i špecifických (roztoče, mačky) IgE. Väzba HLA-D oblasti (6p21) bola pozorovaná i v štúdiu 299 osôb z 45 beloškých rodín so zvýšenou hladinou špecifických IgE proti roztočom¹⁶⁷. Špecifiké IgE boli vyššie významne častejšie sa u osôb s 196 bp alelou markéru D6S1281 a 104 bp alelou markéru DQCAR.

Naopak 200 bp alela markéru D6S1281 a 204 bp alelou markéru D6S291 sa u takýchto osôb vyskytovali oveľa menej často a preto by mohli predstavovať protektívny účinok¹⁶⁷.

3.2.3.4 chromozóm 7p

V štúdií fínskej populácie z izolovanej Kainuu oblasti našli Laitinen a spol.¹⁶⁸ významnú väzbu lokusu 7p14-p15 s astmou, vysokou hladinou IgE alebo kombináciou oboch týchto fenotypov. Táto väzba bola najvyššia pre hladinu IgE. V pokračujúcej štúdií sa Polvi a spol.¹⁶⁹ zamerali na vytvorenie fyzickej mapy tohto lokusu a ďalej uskutočnili asociačnú štúdiu génu pro γ reťazec heterodimérického γ / δ receptora T buniek (TCRG). V dvoch nezávislých zostavách fínskych rodín však nebola nájdená asociácia *TCRG* ani s celkovými IgE ani s astmou¹⁶⁹.

Laitinen a spol.¹⁷⁰ skúmali 133 kb segment určený ako suspektne ovplyvňujúci vznik astmy v oblasti na 7p. V tejto oblasti našli 2 gény – *AAAI* a *GPR154*. Vzhľadom k tomu, že rozličná distribúcia proteínových izoform GPR154 bola zistená vo vzorkách z biopsií v bronchoch, tak na tento proteín upriamili svoju ďalšiu pozornosť. GPR154 (taktiež známy i ako GPR154) je sirotský receptor spriahnutý s G proteínom. Autori štúdie zistili, že v 3 kohortách z Kanady a Fínska sa vyskytovali SNP haplotypy asociované s vysokou hladinou IgE alebo astmou. Ďalej v experimente na myšom modeli stimulovanom ovalbumínom bola pozorovaná zvýšená expresia génu homologického práve k *GPR154*¹⁷⁰.

Asociácia GPR154 bola potvrdená aj v talianskej populácii, kde sledovali výskyt 7 polymorfizmov u pacientov s alergickou astmou. Asociácia s hladinou IgE bola zistená s polymorfizmami SNP 546333 a rs740 347, P=0.006 a s haplotypom H4. S astmou boli asociované haplotypy H5 a H6¹⁷¹. Asociácia SNP haplotypov v *GPR154* bola nasledovne potvrdená aj v ďalších, rozličných európskych populáciách¹⁷².

3.2.3.5 chromozóm 11q

Väzba lokusu 11q s výskytom atopie bola popísaná Cooksonom a spol.¹⁷ už v roku 1989 a ďalšie štúdie venovali tejto oblasti značnú pozornosť. V štúdií 123 súrodeneckých párov s astmou a súvisiacimi fenotypmi (atopia, BHR), van Herweden a spol. pozorovali väzbu mikrosatelitného polymorfizmu v piatom intróne génu pre FceRI β s diagnózou astmy a BHR. Táto väzba s BHR bola signifikantná i po vylúčení atopických osôb^{92,173}. Zámena izoleucínu za leucín v pozícii 181 tohto génu, ktorá bola asociovaná s atopiou v britskej štúdií, nebola pozorovaná v skupine japonských pacientov⁹⁴. Pozorovaná asociácia s astmou a BHR však bude možno spojená s výskytom zmien v regulačných oblastiach tohto génu alebo v dôsledku mutácií v iných príbuzných génoch¹⁷⁴.

CC10 (10 kDa proteín Clarových buniek) je proteín s vysokou expresiou v dýchacích cestách a taktiež môže mať dôležitú úlohu v modulácii zápalu (protizápalový účinok) v stene dýchacích ciest¹⁷⁵. Lokalizácia génu pre tento proteín bola určená do oblasti medzi markéry D11S16 a D11S97 (11q12-q13) – oblasť do ktorej bol mapovaný hypotetický lokus pre atopiu a ďalej i gén pre FceRI β ¹⁷⁶.

IL-8 je uznávaný ako dôležitý mediátor zápalovej reakcie v dýchacích cestách. Funguje ako chemotaktický faktor neutrofilov, ktoré láka do miesta zápalu a potom indukuje fagocytózu¹⁷⁷. IL-8 zároveň indukuje i angiogénu¹⁷⁸. IL-1b aktivuje NF-kB a následne dochádza k aktivácii expresie IL-8¹⁷⁹. Samotný proteín CC10 je konštitutívne exprimovaný bunkami epitelu všetkých slizníc, ktoré sú v styku s vonkajším prostredím, napr. aj v dýchacích cestách¹⁸⁰. CC10 je známy pre protizápalové účinky, ovplyvňovaním IL-8. CC10 knock-outované myši vykazovali známky zvýšenej zápalovej aktivity dýchacích ciest v reakcii na alergén¹⁸¹.

Long a spol.¹⁸² v experimente na bunkách nosnej sliznice a na CC10 knock-outovaných myšiach zistili, že CC10 inhibuje expresiu IL-8 indukovanú IL-1b a že CC10 reprimuje aktiváciu NF-kB indukovanú cestou IL-1b, priama interakcia medzi CC10 a p56

ale nebola pozorovaná. V kultúrach z explantátov nosnej sliznice u ľudí mala hladina CC10 inverzný vzťah k k IL-1b indukovanej expresii IL-8¹⁸².

Asociácia *CC10* s astmou v skupine 275 osôb britského a 300 osôb japonského pôvodu však nebola potvrdená a to bez ohľadu na atopický stav¹⁸³. Avšak v indickej populácii bola nájdená signifikantná väzba intragénového repetitívneho polymorfizmu s astmou pričom vo väzbe bol aj haplotyp A_18 zostavený z polymorfizmu A38G (ten samostatne nebol asociovaný) a uvedeného repetitívneho polymorfizmu. Na základe týchto údajov je možné predpokladať, že tento gén nebude patriť medzi gény silného účinku predisponujúceho k vzniku astmy¹⁸⁴.

3.2.3.6 chromozóm 12q

Oblasť 12q bola s výskytom astmy prvý raz spojená v roku 1996 v štúdií kaukazskej a afro-karibskej populácii¹⁸⁵. Väzba chromozómu č. 12 s astmou bola následne hlásená i v štúdií 3 rozličných amerických rás¹⁰⁵ a väzbu k atopii popísala i jedna nemecká štúdia¹⁸⁶. Ďalšia štúdia zameraná na nemeckú populáciu asociovala oblasť 12q13 s výskytom astmy i atopie spoločne¹¹¹. Dôležité postavenie lokusu 12q pri náchylnosti k astme alebo s ňou súvisiacich fenotypov potvrdili i ďalšie, celogenómové štúdie^{131,187,188}. Raby a spol.¹⁸⁹ vykonali podrobnejšiu analýzu lokusu 12q13-q24 pomocou 32 mikrosatelitných markérov. V tomto lokuse našli 3 samostatné oblasti – jednu s väzbou k astme, druhú k BHR a tretia súvisela so zmenami pľúcnych funkcií (FEV1, BDPR indexy).

Do oblasti 12q bolo mapovaných niekoľko kandidátskych génov pre atopiu (napr. gén pre interferón γ - *IFNG*, či rastový faktor mastocytov – *MGF* apod.). Z tohto dôvodu sa Barnes a spol.¹⁸⁵ zamerali na túto oblasť v skupinách astmatikov z Barbadosu (afro - karibská populácia, prostredie s vysokou záťažou alergénmi) a z Pensylvánie (belošská populácia Amišov starého poriadku). Sledovaním polymorfnych markérov z 12q našli v oboch skupinách

väzbu lokusu 12q15-q24.1 k astme, zvýšeným IgE i kombinácii oboch¹⁸⁵. Asociáciu tohto lokusu s IgE potvrdila i nemecká štúdia, v ktorej sledovali deti s perzistujúcimi vysokými hladinami IgE, presne definovali extrémny fenotyp (IgE nad 85% hodnôt atopickej populácie) a našli tak väzbu s markérmí D12S379, D12S1064, D12S351 a PAH¹⁸⁶. S astmou bol asociovaný i markér D12S390 (lokus 12q13.13) v talianskej populácii¹⁹⁰.

V oblasti 12q24 sa nachádza i gén pre neuronálny NOS (NOS1), ktorý hrá dôležitú úlohu v pri vzniku astmy – napr. v experimentoch na myšiach vykazoval dôležitú úlohu pri vzniku BHR, pretože myši deficitné pre tento gén boli menej náchylné odpovedať na bronchoprovokačné stimuly, než wt myši. A čo viac, polymorfne markéry v *NOS1* boli pozorované vo zvýšenej miere u astmatikov a intrónový (AAT)n polymorfizmus bol spojený so zvýšenou koncentráciou NO v dýchacích cestách^(rozoberané v 191).

Shao a spol.¹⁹² sa zamerali na polymorfizmy v génoch, ktoré boli aspoň 1x spojených s astmou v detstve, či s ňou súvisiacich fenotypov, nachádzajúcich sa v lokuse 12q13-q24. Repetície GT v druhom intróne *NOS1* a GT repetície v prvom intróne *STAT6* boli v asociácii s astmou, no CA opakovanie v intróne č. 1 génu pre IFN γ a polymorfizmus 465C>T v géne pre AID (*AICDA*) nevykázali žiadnu väzbu s astmou.

3.2.3.7 chromozóm 13q

V 86 rodinách s výskytom atopickej astmy bola uskutočnená podrobná analýza chromozómu č. 13, ktorou bola nájdená väzba astmy s lokusom 13q14.2 v japonskej populácii¹⁹³. Väzbu lokusu 13q14 s atopiou zistili i Daniels a spol.¹⁰³ vo svojej celogenómovej štúdii. Väzbu tohto lokusu asociovali i Hizawa a spol.¹⁹⁴ a to s výskytom detskej astmy s precitlivosťou k roztočom. Ober a spol.¹⁰⁸ zase v populácii Hutteritov asociovali lokus 13q21.3 s astmou v prvej etape hodnotenia rodín, avšak už nie v druhej.

Bhattacharyya a spol.¹⁹⁵ analýzou 59 polymorfných markérov spresnili lokalizáciu lokusu pre a atopiu do oblasti okolo markéru D13S161, s hranicami medzi markérmí D13S328 a D13S1269. V nasledujúcej štúdií táto skupiny našla v tomto lokuse asociáciu nového mikrosatelitného markéru USAT24G1 s hladinou celkových IgE¹⁹⁶. Zhang a spol.¹⁹⁷ nakoniec v tejto oblasti asociovali polymorfizmy v *PHF11* s hladinou IgE i ťažkou astmou. Mimo *PHF11* leží v tejto oblasti i *SETDB2* a to hneď pred ním. Štúdia austrálskych rodín s výskytom atopického ekzému skúmala SNPy v týchto 2 génoch a s touto chorobou asociovala polymorfizmy v *PHF11*, konkrétne rs2247119 v intróne č.3 ($p = 0,029$) a rs1046295 v 3'UTR ($p = 0,007$)¹⁹⁸. Tieto výsledky priložili ďalší z kamienkov do mozaiky dôkazov poukazujúcich na významu lokus 13q14 v regulácii atopických chorôb.

3.2.3.8 chromozóm 14q

V oblasti 14q11.2 leží TCR α/δ génový komplex, ktorý obsahuje gény pre tvorbu α a δ reťazcov TCR¹⁹⁹. V štúdií asociácie špecifických IgE (proti antigénom roztočov, srsti mačiek a psov, trávín a *Alternaria alternata*) Mofattová a spol.²⁰⁰ nepozorovali významnú väzbu IgE k lokusu s génmi pro TCR δ . U postihnutých súrodeneckých párov (populácia z UK a z Austrálie) však našli významnú väzbu sledovaných mikrosatelitných sekvencií z oblasti TCR α , prenesených od oboch rodičov. Tento výsledok podľa autorov poukazuje na prítomnosť génu / génov z oblasti TCR α , ktoré modifikujú špecifickú IgE odpoveď²⁰⁰.

3.2.3.9 chromozóm 19

Chromozómová oblasť 19q bola spojená s astmou v niekoľkých GWAS^{108,112}. Analýzou 22 markérov z chromozómu č. 19 v 111 rodinách s výskytom alergickej astmy bola odhalená väzba oblasti 19q13.3 k atopii, pozitívnosti kožných testov a hladine IgE²⁰¹.

V oblasti 19p13.3 leží gén pre nízko – afinitný IgE receptor²⁰². Laitinen a spol.²⁰³ skúmali asociáciu tohto génového

lokus vo fínskej populácii s 3 fenotypmi: celkové IgE, astma a špecifické IgE. Haplotypovou analýzou sledovaných SNP našli väzbu k vysokej IgE odpovedi a u časti rodín (s výskytom astmy u 2 a viacerých detí) i k astme.

Zložka komplementu C5 má silný zápal podporujúci účinok, ktorý uplatňuje cez svoj receptor C5R1, ktorý je členom rodopsínovej rodiny²⁰⁴. C5R1 je exprimovaný na mnohých bunkách imunitného systému, ale taktiež i v mnohých bunkách dýchacích ciest^{205,206}. Gén kódujúci C5R1 sa nachádza na lokuse 19q13.3-q13.4²⁰⁷. Barnes a spol.²⁰⁸ našli polymorfizmus v promótoře génu pre C5R1. Uskutočnili asociačnú štúdiu tohto polymorfizmu s astmou alebo fenotypom atopie v troch rozličných štúdiách, avšak nepozorovali žiadnu asociáciu k týmto fenotypom. A čo viac, nebola zistená ani zmena promótorovej aktivity asociovateľná s týmto SNP²⁰⁸. Je preto nutné uskutočniť ďalšie štúdie, ktoré definitívne zhodnotia mieru vplyvu tohto génového lokusu pri vzniku alergických ochorení.

3.2.3.10 chromozóm 20q

Převratnú celogonómovú štúdiu predstavuje práca van Eerdeghe a spol.¹²⁶, ktorá v skupine 460 súrodeneckých párov (belošská populácia, kombinovaná z US a UK populácie) odhalila 2 peaky v oblasti 20q13 a ďalšou presnejšou analýzou (väzbová analýza, sekvenácia prilahlých génov a na záver asociačná analýza polymorfizmov týchto génov) preukázala asociáciu *ADAM33* s astmou a BHR. Táto práca odštartovala množstvo replikačných štúdií a iných štúdií zaoberajúcich sa funkciou *ADAM33* v dýchacích cestách a pri vzniku astmy.

Väzba lokusu 20q13 k hladine špecifických IgE (roztoče) i k astme (či k jej rozličným fenotypom) bola neskôr potvrdená i v GWAS pracujúcej s 202 austrálskymi rodinami²⁰⁹.

3.2.3.11 chromozóm Xq

Veľmi dôležitú úlohu v mechanizme spustenia tvorby IgE – pri indukcii samotného izotypového prepnutia – má interakcia medzi CD40 ligandom a jeho receptorom (CD40). Z tohto dôvodu bola študovaná ich úloha pri vzniku alergickej reakcie. Gén pre CD40L sa nachádza na Xq26.3²¹⁰. Lokus génu pre CD40 je zase v oblasti 20q13.12²¹¹.

Úloha interakcie CD40L – CD40 v patogenéze astmy a pri zápale asociovanom s tvorbou IgE bola skúmaná na myšacom modeli stimulovanom antigénom *Aspergillus fumigatus*. Takéto myši potom vykazovali eleváciu IgE a eozinofilný zápal v pľúcnych tkanivách a v materiáli z broncho-aleveolárnej laváže²¹². V kmeňoch s knock-outovaným jedným alebo druhým génom bola významne znížená tvorba IgE, zápal v pľúcnych tkanivách však pozorovaný nebol. K rozvoju BHR došlo, ale len u myši s vyradeným génom pre CD40L²¹².

3.3 Charakteristika vybraných kandidátskych génov

Posledné 3 desaťročia boli svedkami obrovského pokroku v molekulárne genetickej podstate vzniku alergických chorôb. Za toto obdobie došlo k výraznému nárastu počtu lokusov a následne i génov (kandidátskych či určených pomocou pozičného klonovanie) asociovaných s výskytom astmy a atopických chorôb. V 80. rokoch minulého storočia sa začalo so skúmaním vplyvu HLA systému na vznik alergických ochorení, napr. Saito a spol.⁶⁸ našli silnú väzbu niektorých lokusov HLA-B s rodinným výskytom astmy, usilovný výskum na poli HLA vo vzťahu k alergiám pretrváva dodnes. Úplne nový lokus (11q13) asociovaný s atopiou bol popísaný v roku 1989¹⁷. Od tohto okamihu došlo v dôsledku väzbových analýz, štúdií kandidátskych génov i celogenómových štúdií k zvýšeniu počtu asociovaných génov a v roku 1998 tak už bolo známych 6 lokusov spojených s výskytom alergií. S nástupom moderných biotechnológií, ukončením sekvenácie a resekvenácie celého ľudského génu súčasne s extrémnym rozšírením databáz

polymorfizmov v ňom, a tým pádom i nástupom celogénomových štúdií na kvalitatívne i kvantitatívne vyššom stupni došlo k ďalšej expanzii asociovaných lokusov, v roku 2008 ich bolo známych už viac než 200¹⁸. Medzi gény asociované s astmou v poslednej dobe tak patria napr. *PERLD1* asociovaný s astmou hneď niekoľkými GWAS^{119,213-215}, *ORMDL3* asociovaný s detskou astmou^{214,216}, či *GSDMB* taktiež spojený s výskytom detskej astmy^{119,216}, pričom tieto 3 gény sa nachádzajú na 17q21.

Asociácia génov je potvrdzovaná v replikačných štúdiách – u niektorých génov tieto boli s negatívnym výsledkom, asociácia ďalších génov bola replikovaná v 1-2 štúdií. Replikácia v 6-10 štúdiách bola úspešná pre 15 kandidátskych génov a asociácia s alergickým ochorením vo viac než 10 replikačných štúdiách bola uskutočnená len v prípade 10 génov. Medzi gény s replikovanou asociáciou v 6 – 10 štúdiách patrí *STAT6* a medzi gény s replikáciou vo viac než 10 štúdiách patrí zase *ADAM33*²¹⁷. Vzhľadom na tento fakt sa nasledujúca časť bude venovať charakteristike týchto 2 génov a v nadväznosti na to budú v experimentálnej časti popísané výsledky asociačnej štúdie týchto génov s astmou a atopiou u detí vybraných z českej populácie.

3.3.1 STAT6

Atopiu charakterizuje sklon k zvýšeným hladinám IgE a to v reakcii na bežné, neškodné alergény vonkajšieho prostredia. Za tvorbu IgE sú zodpovedné plazmocyty (bunky v terminálnom štádiu diferenciácie B buniek). K tvorbe IgE však dochádza až po spolupráci dvoch signálov – stimulácia B lymfocytov prostredníctvom IL-4 a zároveň na základe pomoci Th2 lymfocytov prostredníctvom interakcie CD40L (povrch T buniek) s CD40 (B lymfocyty). U ľudí tak dochádza k izotypovému preskoku a tvorbe IgE a IgG4²¹⁸, pričom prednostná tvorba IgE môže byť pravdepodobne ovplyvnená interakciou CD23/CD21²¹⁹. Expresia germinálnych transkriptov z génov *Cε* a *Cγ4* môže v relatívne nízkej miere prebiehať aj bez stimulácie prostredníctvom IL-4

(mechanizmom závislým od interakcie CD40/CD40L). Dostatočná tvorba ε -GLT a následný efektívny izotypový prešmyk po stimulácii CD40 prostredníctvom CD40L na T bunkách je však úplne závislá od funkčnosti STAT6 – v experimentoch so *STAT6*^{-/-} myškami bolo zistené extrémne zníženie tvorby zárodkových transkriptov C ε a C γ 1, kompletne porušenie synergizmu signálov z IL4 receptoru a z CD40 a u takýchto myšiek neboli detekovateľné hladiny IgE²²⁰. A navyše, jeden nedávny experiment popísal zaujímavé pozorovanie, a síce že nematurované B bunky sa preferenčne prepínajú z IgM priamo na IgE, než cez IgG1 medzistupeň v úplne diferencovaných B bunkách²²¹.

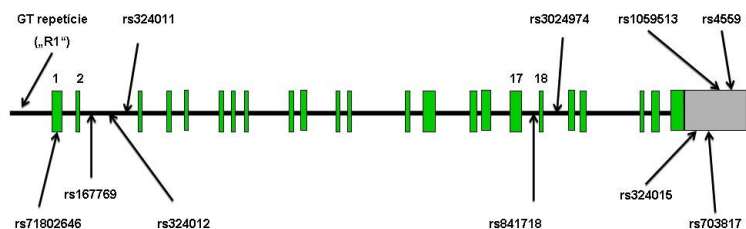
3.3.1.1 Štruktúra *STAT6*

STAT6 patrí do rodiny proteínov prenášajúcich signál a aktivujúcich transkripciu v reakcie na väzbu ligandu na príslušný receptor (*STAT* = z angl. Signal Transducer and Activator of Transcription). Hou a spol.²²² v roku 1994 ako prví úspešne identifikovali a klonovali *STAT6*. Pomocou vyhľadávania v elektronickej databázy ľudských cDNA a hľadania homológie k už známym proteínom z rodiny *STAT*, popísali *STAT6* i Quelle a spol.²²³ a to nezávisle od skupiny okolo Houa. Gén pre *STAT6* je mapovaný do oblasti 12q13.3²²⁴, má veľkosť o niečo väčšie než 19 kb a je zložený z 23 exónov²²⁵. Exón č. 1 a proximálna časť druhého exónu tvoria 5'UTR a translácia tak začína od 22. nukleotida v exóne č. 2 a končí za 189. nukleotidom v poslednom exóne, ktorý tak tvorí 3'UTR. (Obr.11). Transkripciou *STAT6* môže vznikáť niekoľko mRNA izoforiem²²⁶⁻²²⁸.

- *STAT6* – mRNA zostavená zo všetkých relevantných exónov,
- *STAT6a* – izoforma bez časti 3'UTR,
- *STAT6b* – forma bez exónu č.4,
- *STAT6c* – časť exónu č. 16 je súčasťou intrónu

Neskôr boli popísané ešte ďalšie 2 izoformy vznikajúce retenciou intrónu: *STAT6d* obsahuje mimo exónové sekvencie

i intrón č. 17 a STAT6e obsahuje i sekvencie intrónov č. 17 a č. 18²²⁹.



Obr. 11 Štruktúra STAT6

Na obrázku je znázornená štruktúra STAT6 – 23 exónov, exón 1 a časť exónu 2 tvoria 5'UTR, časť posledného exónu (sivá farba) predstavuje 3'UTR. Na obrázku sú ďalej znázornené i pozície polymorfizmov v STAT6, ktorých asociácia k hladine IgE a k astme bola posudzovaná najčastejšie.

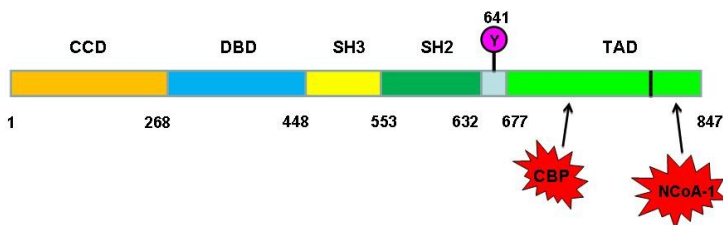
3.3.1.2 Štruktúra STAT6 proteínu

STAT6 patrí do rodiny proteínov STAT, ktorú tvorí celkovo 7 členov: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT6b a STAT6. Všetky tieto proteíny zdieľajú homológiu v štruktúre domén (Obr. 12) i väčšiu či menšiu sekvenčnú homológiu. STAT proteíny tak obsahujú postupne za sebou uložené N terminálnu doménu, (NTD), doménu viažucu sa na DNA (DBD), doménu podobnú SH3, SH2 podobnú doménu a transaktivačnú doménu na C konci²³⁰. Reťazec STAT6 je tvorený celkovo 847 aminokyselinami.

N terminálna doména má tvar tzv. zapletenej cievky (CCD – z angl. coiled coil domain). Prvých 130 aminokyselin v tejto doméne je silne konzervovaných medzi proteínmi rodiny STAT a táto časť proteínu predstavuje dôležitú funkciu v dimér – dimérových interakciách, pri tetramerizácii medzi dimérami STAT a následnej spolupráci pri väzbe k DNA^{231,232}. V tejto oblasti sa taktiež nachádza Arg v pozícii 32, ktorý je zásadný pre metyláciu STAT6. V prípade mutácie postihujúcej práve tento arginín alebo pri

inhibícii jeho metylácie dochádza k úplnému zrušeniu fosforylácie, transportu do jadra a väzby STAT6 na DNA²³³.

Oblasť DBD je taktiež pomerne vysoko konzervovaný medzi proteínmi STAT rodiny a slúži k naviazaniu na GAS sekvencie²³¹. GAS sú sekvencie DNA aktivované všeobecne v odpovedi na signalizáciu iniciovanú INF γ .



Obr. 12. Štruktúra proteínu STAT6

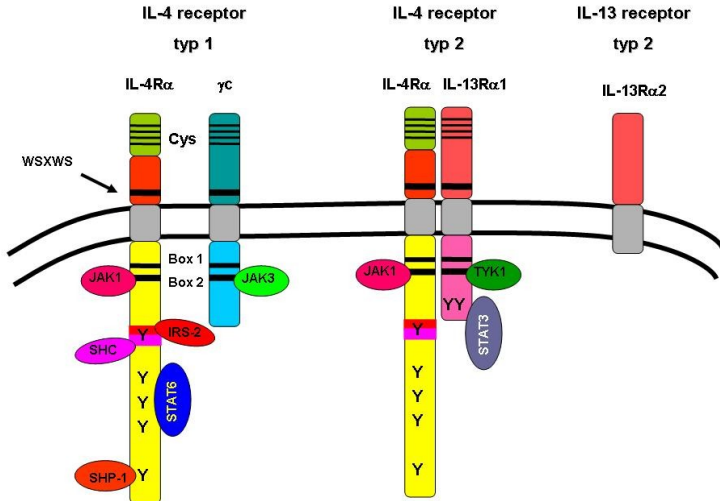
Obrázok zobrazuje štruktúra STAT6 – zloženie vlastných domén je spoločné pre všetky proteíny z rodiny STAT. CCD – doména zapletenej cievky (coiled coil domain), DBD – DNA väzba doména, SH3 – doména s podobnosťou k SH3, SH3 – doména so sekvenčnou podobnosťou k SH2, TAD – transaktivačná doména. Y641 – tyrozín v pozícii 641, ktorý je v prípade STAT6 dôležitú úlohu, je fosforylovaný a následne umožňuje dimerizáciu. CBP a NCoA-1 – koaktívatory SAT6, pričom čiernou zvislou čiarou v TAD sú znázornené dve časti, ktoré majú rozdielnu, pritom ale dôležitú funkciu pri transaktívácii, viažu CBP a NCoA-1. Čísla predstavujú označenie poradia aminokyselín v STAT6 na rozhraní jednotlivých domén. Podrobnosti viď text.

Domény SH3 sa vo všeobecnosti nazývajú molekulárne suché zipsy, nakoľko majú schopnosť interagovať s oblasťami bohatými na prolin^{234,235}. Konzervovaná doména s homológiou k Src typ 2 je schopná asociovať s receptorom pre cytokín a interagovať s proteínmi obsahujúcimi fosfotyrozín a tým pádom môže dochádzať k dimerizácii s ďalším STAT a ovplyvňovať transaktíváciu^{236,237}. Doména TAD má dve rozdielne oblasti, pričom prítomnosť oboch je dôležitá pre transaktíváciu. Časť tejto domény bližšia k N koncu bielkoviny spolupracuje s CBP (proteín väzuci CREB) a distálna

časť (bližšia k C konci) interaguje s NCoA1 (koaktivátor jadrového receptora 1, člen p160/SRC rodiny koaktivátorov), ktorý je špecifickým STAT6 koaktivátorom²³⁸. Väzba oboch je dôležitá pre úplne funkčnú transaktiváciu.

3.3.1.3 Funkcia STAT6 proteínu

STAT6 má dôležitú úlohu vo funkciách T buniek a zároveň i pri diferenciácii smerom k Th2 bunkám a pri proliferácii stimulovanej IL-4. Rôzne aspekty vplyvu STAT6 v T bunkách, i postihnutie tvorby samotných IL-4 a IL-13 boli demonštrované v experimentoch s *STAT6*^{-/-} myškách²³⁹⁻²⁴¹. STAT6 mimo iné ovplyvňuje i expresiu Gata3, ktorý je zásadným faktorom v diferenciácii smerom k Th2 bunkám²⁴². V B bunkách je STAT6 zodpovedný za tvorbu buniek v spolupráci zo signalizáciou aktivovaného CD40²²⁰ a hladiny IgE boli významne redukované v myšom *STAT6*^{-/-} modeli po alergénnej senzibilizácii²³⁹⁻²⁴¹. Expresia rôznych molekúl B buniek, ktoré hrajú dôležitú funkciu v procese spracovania antigénu (za situácie, keď B bunka sa súčasne chová ako APC), je taktiež indukovaná IL-4, signál ktorého prenáša práve STAT6 – jedná sa mimo iné o HLA II. triedy, CD80 a CD86²³⁹⁻²⁴¹. No a v neposlednom rade IL-4 prostredníctvom signalizácie cez STAT6 má dôležitú úlohu v záchrane B buniek od programovanej smrti²⁴³. STAT6 sa uplatňuje i mimo B a T bunky. Zúčastňuje sa difereciacie alternatívne aktivovaných makrofágov prostredníctvom IL-4 stimulácie a sprostredkováva v nich expresiu génov indukovaných IL-13^{244,245}. V dentritických bunkách vyvoláva tvorbu IL-12, ktorý je dôležitý pre Th1 imunologické pochody a znižuje produkciu IL-10²⁴⁶. V bunkách prsných žliaz zase v IL-4/IL-13/STAT6 dráhe indukuje vývoj lumenálneho epitelu²⁴⁷. V dýchacích cestách je zase zapojený do signálnej dráhy spúšťanej IL-13, ktoré ovplyvňuje vznik BHR²⁴⁸.



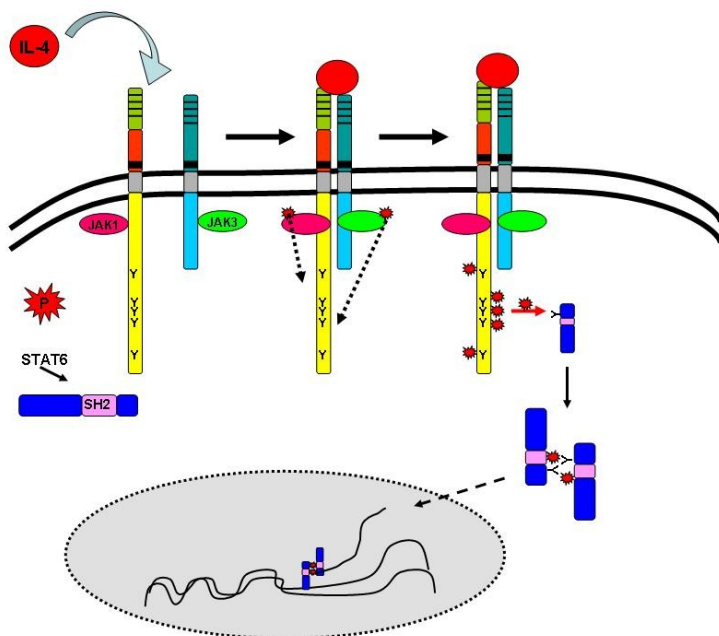
Obr. 13. Štruktúra IL-4 / IL-13 receptorov

Receptor pre IL-4 patrí do skupiny cytokínových receptorov typu 1, pre ktoré je charakteristická prítomnosť extracelulárne uložených 4 konzervovaných cysteinov (Cys) a WSXWX motívu. V intracelulárnej časti sa nachádzajú 2 domény limitovanej homológie medzi cytokínovými receptormi typu I, nazývajú sa box 1 (bližšie k cytoplazmatickej membráne, je zložený z 8 aminokyselín a bohatý na prolín) a box 2. Box 1 súvisí viacej s aktiváciou receptoru, box2 viacej s asociáciou s JAK – tie sa sem viažu prostredníctvom svojej N koncovej časti²⁵². Vysvetlivky: IL-4Rα - reťazec špecifický pre väzbu IL-4; IL-13Rα1 – reťazec špecifický pre IL-13; IL-13Rα2 – reťazec klamlivého receptoru pre IL-13 (typ 2 receptor pre IL-13); JAK1, JAK3, TYK1 – kinázy zo skupiny JAK; IRS-2 – proteín substrátu pre inzulínový receptor 2, ktorý aktivuje dráhy vedúce k proliferácii a tiež fosforyluje DNA viažuci proteín HMG-I/Y (moduluje transkripciu v lokuse Cε); SHC – SH2 obsahujúci transformujúci proteín, je tzv. adaptorový proteín, ktorý aktivuje MAPK signálnu dráhu; oba tieto proteíny interagujú s tyrozínom v pozícii 497; SHP-1 (SH2 obsahujúca tyrozín fosfatáza 1) – viaže sa na piaty na obrázku znázornený tyrozín a negatívne reguluje signalizáciu týmto receptorom²⁵³.

3.3.1.4 Signálna dráha STAT6

Ako už bolo naznačené, tak STAT6 je zapojený do signálnej dráhy indukovanej IL-4 alebo IL-13. Receptor pre IL-4

patrí do skupiny cytokínových receptorov typu 1^(vid' prehľad 249). IL-4 má možnosť signalizovať prostredníctvom 2 receptorov (Obr. 13).



Obr. 14 IL-4 - STAT6 signálna dráha.

Na obrázku je znázornená signálna dráha IL-4 – STAT6, farebné značenie zodpovedá obrázku č. 13. Po naviazaní IL-4 na jeho špecifický receptorový reťazec dochádza k dimerizácii receptoru, ten sa aktivuje, dochádza k vzájomnej transfosforylácii kináz JAK a tie vytvoria dokovacie miesta pre STAT6. Dochádza k fosforylácii STAT6, ten sa následne dimérizuje, translokuje do jadra, kde sa viaže na STAT6 špecifické sekvencie (GAS elementy) a v komplexe s nukleárnymi faktormi spúšťa transkripciu.

Typ 1 IL-4 receptoru je zložený z IL4-R α a γ c reťazca (bežný reťazec cytokínových receptorov) a je špecifický práve pre IL-4. Je exprimovaný hlavne v hematopoetických bunkách, na T i B bunkách. Typ 2 receptor (taktiež zvaný i receptor typ pre IL-13) je

spoločný pre IL-4 i IL-13, je zložený z IL4-R α a IL-13R α 1. Nachádza na povrchu rôznych buniek, z lymfocytov ho však exprimujú len B bunky. Druhý receptor pre IL-13 je zložený z IL-13 α 2 reťazca, ktorému chýba intracelulárna časť a tak neprenáša signál – funguje ako „klamlivý“ (decoy) receptor a reguluje tak IL-13 indukovanú signalizáciu^{250,251}.

IL-4 špecificky rozpoznáva IL-4R α a preto typ 1 IL-4 receptoru viaže len IL-4. Po jeho naviazaní dôjde k dimérizácii receptorových jednotiek (IL-4R α s γ c reťazcom) čím dochádza k tesnému priblíženiu sa kináz triedy JAK. JAK1 je asociovaná s IL-4R α a JAK3 je asociovaná s γ c reťazcom. V reakcii na toto JAK fosforylujú samé seba alebo seba navzájom. Aktivované JAK následne fosforylujú špecifické tyrozíny IL-4R α reťazca, jedná sa konkrétne o Y575, Y603 a Y6033 ľudského IL-4 receptoru. Tieto tyrozíny predstavujú „prístavné / dokové miesto“ pre STAT6, ktorý sa s receptorom asociuje prostredníctvom jeho SH2 domény a dochádza tak k fosforylácii konzervovaného Y641. V ďalšom kroku dochádza k dimérizácii STAT6 monomérov – fosforylovaný Y641 jedného STAT6 interaguje s doménou SH2 druhého monoméru. Diméry STAT6 sú následne prenesené do jadra a viažu sa na GAS elementy (sekvencie aktivované IFN γ), v prípade STAT6 dochádza k rozpoznaní TTCN₄GAA sekvencie^{237,prehľad 251,254, prehľad 255}. Táto konsenzusová sekvencia pre STAT6 môže uprostred obsahovať 3 alebo 4 nukleotidový medzerník^{256,257}. Ďalším spresnením sa zistilo, že na základe palyndrómového rozšírenia konsenzusovej sekvencie, môže STAT6 rozlišovať tieto sekvencie: TTC CNNG GAA a TTC ANNT GAA pre miesta so sekvenciami obsahujúcimi 4 nukleotidy uprostred, a ďalej CTTC NNN(N) GAAG a TTTC NNN(N) GAAA s 3 alebo 4 nukleotidmi uprostred^{prehľad 228}. Celogenómová analýza skúmajúca gény regulované STAT6 zistila, že v T bunkách až 79% miest pre väzbu STAT6 obsahovalo konsenzusové sekvencie – 50% z nich obsahovalo 4 nukleotidový medzerník a 23% ich obsahovalo 3 nukleotidový medzerník²⁵⁸.

STAT6 teda omnoho viacej preferuje sekvenciu s 4 nukleotidovým medzerníkom, pričom žiadny z ďalších testovaných STAT sa na takúto sekvenciu neviazal²⁵⁹. Zároveň bolo zistené, že 66% väzbových miest pre STAT6 sa nachádza vo vnútri génov (hlavne v prvých dvoch intrónoch), zvyšok je pred štartom alebo za koncom transkripčného miesta²⁵⁸.

3.3.1.5 Aktivácia transkripcie závislej na STAT6

I keď STAT6 je špecifický faktor potrebný k spusteniu tvorby IgE, len jeho samostatné naviazanie sa do oblasti promotóra C_ε nestačí, je nutná väzba a spolupráca s ďalšími jadrovými a transkripčnými faktormi. V oblasti o rozsahu 20 – 90 nukleotidov pred I_ε exónom sa nachádzajú postupne IL-4 reponzibilný element (IL-4RE - miesto naviazania pre STAT6 so špecifickou TTCN₄GAA sekvenciou), miesto pro PU.1, dve miesta pre naviazanie NF-κB (NF-κB1 a NF-κB2) a miesto pre BSAP. Pred väzbovým miestom pre STAT6 je ešte miesto pre naviazanie sa C/EBP-β, v pozícii -105 – -96 pred miestom začiatku transkripcie εGLT. Samotná transkripcia je výsledkom funkčnej synergie medzi STAT6 a C/EBP-β, táto je závislá na interakcii ich TAD i keď priama interakcie STAT6 C/EBP-β nebola doložená. Prítomnosť C/EBP-β pravdepodobne pomáha stabilizovať väzbu STAT6^{prehľad230}.

C_ε promotór je tiež aktivovaný i signalizáciu z CD40 – pomocou NF-κB. Jedná sa o skupiny transkripčných faktorov, ktoré synergicky s STAT6 aktivujú transkripciu, pričom neporušené väzbové miesta v C_ε sú nevyhnutné pre transkripciu. Tieto faktory pravdepodobne zvyšujú afinitu STAT6 k IL-4RE a fyzicky priamo kontaktujú STAT6. Do prvého miesta (NF-κB1, proximálne od IL4-RE) sa viaže klasický komplex NF-κB zložený z p50/65 heterodimérov a do druhého miesta (NF-κB2) sa viaže heterodimér p50/relB^{28,230}. V experimente zameranom na C_ε promotór bolo zistené, že bodová mutácia v mieste pre NF-κB2 vedie k výraznému zníženiu odpovede na stimulácii IL-4, obdobná mutácia v NF-κB1

naopak aktivitu promotóra zvýšila. NF- κ B2 má teda dôležitý význam, ale pre spustenie transkripcie musí interagovať so STAT6²⁶⁰. Transkripciu podporuje i BSAP, pri jeho over-expressii dochádza k zvýšenému IgE izotypovému preskoku²⁶¹. Promótor je taktiež regulovaný transkripčným faktorom PU.1, špecifickým pre monocyty, ktorý spolupracuje so STAT6. Miesto pre PU.1 sa nachádza pred NF- κ B1, pričom ich väzbové miesta sa čiastočne prekrývajú (sekvencia GGGAA). Mutácia miesta pre PU.1 alebo pre NF- κ B2 nemala žiadny alebo len minimálny vplyv na transkripciu po stimulácii IL-4, mutácia oboch miest zároveň zrušilo vplyv IL-4 na transkripciu²⁶².

Jednou z hlavných úloh transkripčných faktorov je prilákať špecifické transkripčné faktory, ktoré modifikáciou histónov podporujú transkripciu a premostujú enhancer s transkripčným komplexom – dochádza tak k tvorbe tzv. enhanceozómu. Za bežných okolností je na oblasť IL-4RE naviazaný PARP-14, člen rodiny poly-ADP ribóza polymeráz, ktorý na seba viaže histón deacetylázy HDAC2 a 3. V tomto stave je gén neaktívny. Po naviazaní sa STAT6 na IL-4RE, modifikuje PARP-14 seba i HDAC2, HDAC3 (a navyše i prítomný p100), dochádza k ich disociácii, čím umožňujú aktiváciu génu. STAT6 následne priláka koaktivačné proteíny komplexu p300/CBP pričom s CBP asociuje pomocou svojej C terminálnej časti²⁸. V enhanceozóme sa taktiež nachádzajú i koaktivátory patriace do skupiny jadrových koaktivátorov p160 steroidového receptora (NCoA), v prípade STAT6 sa jedná o NCoA1, interagujúci s C terminálnou doménou STAT a táto asociácia je závislá na LXXLL motíve TAD v STAT6²⁶³. Na koaktivácii transkripcie riadenej STAT6 sa nepriamo zúčastňuje i NCoA3, ktorý sa neviaže na STA6 ale na p300. V tomto komplexe sa nachádzajú i už spomenutý p100/SND1 (obsahujúci stafylokokovú nukleázovú a tudorovú doménu 1) a RNA helikáza A (rekrútovaná prostredníctvom SND1), ktorá je naviazaná práve na p100. Proteín p100 pomocou svojej SN-podobnej domény interaguje s TAD STAT6 a taktiež asociuje

s veľkou podjednotkou RNA polymerázy II, čím vytvára premostenie medzi komplexom polymerázy a STAT6^{28,264,265}.

3.3.1.6 Polymorfizmy v *STAT6*

V roku 1996 bola prvý krát popísaná asociácia lokusu 12q s hladinou celkových IgE a s astmou¹⁸⁵. Od tej doby bola venovaná veľká pozornosť výskumu vplyvu polymorfizmov a ich haplotypov v *STAT6* na hladinu IgE a výskyt astmy, čo potvrdzuje i fakt, že *STAT6* patrí do skupiny niekoľko málo génov, u ktorých bola táto asociácia potvrdená v 6 – 10 replikačných štúdiách²¹⁷.

Neprekladaná oblasť *STAT6* na 5'konci obsahuje niekoľko polymorfizmov, do centra pozornosti sa dostali napríklad GT repetície (rs71802646) popísané Tamurom a spol.²⁶⁶ v Japonskej populácii, kde alela nesúca 13 GT opakovaní (a hlavne potom 13/15GT heterozygotný genotyp) bola asociovaná s výskytom alergických chorôb (astma, atopický ekzém a potravinová anafylaxia). Alela (GT)₁₃ však v Japonskej populácii nebola asociovaná s hladinou IgE. V nemeckej populácii zase (GT)₁₇ alela vykazovala trend zvyšovať hladinu IgE, ďalej mala významný vplyv na eozinofiliu, avšak s astmou alebo BHR nebola táto alela asociovaná²⁶⁷. V britskej populácii bola alela (GT)₁₃ v asociácii s atopickou astmou no a alela (GT)₁₆ bola recipročne výrazne častejšou medzi osobami s neatopickou astmou²⁶⁸. Nagarkatti a Ghosh²⁶⁸ popísali ďalší GT repetičný polymorfizmus v *STAT6* promótoru, označili ho ako R1 a ďalej popísali alelové frekvencie GT polymorfizmu v exóne č. 1 *STAT6* (ten si označili ako R3). V následnej štúdií našli Nagarkatti a spol.²⁶⁹ asociáciu 16 GT repetícií v R3 a 15 GT repetícií v R1 s astmou v indickej populácii. 16 repetícií GT v R3 malo negatívnu asociáciu v indickej populácii. Funkčnou analýzou Gao a spol.²⁶⁸ zistili, že (GT)₁₃ alela v exóne č. 1 (lokus R3) vykazovala najvyššiu promótorovú aktivitu v porovnaní s kratšími či dlhšími alelami. Zároveň vyslovili hypotézu, že čím dlhšia alela, tým môže mať relatívne stabilnejšiu väzbu na nukleárne faktory. S prihliadnutím k efektu GT repetícií v iných génoch, Gao

a spol.²⁶⁸ vyslovili domnienku, že tieto repetície by mohli ovplyvňovať formáciu sekundárnych štruktúr DNA a teda i viazanie transkripčných faktorov.

Celogénomovým sekvenovaním odhalili Duetschová a spol.²⁶⁷ (mimo iné) i 3 polymorfizmy v intróne č. 2: rs167769, rs324012 and rs324011. I keď ani jeden z nich nebol asociovaný s astmou, tak polymorfizmus rs324011 bol asociovaný s hladinou IgE v nemeckých populáciách^{267,270,271}, avšak nie vo fínskej populácii²⁷². Vplyv tohto polymorfizmu skúmali i Huang a spol.²⁷³, asociáciu s hladinou špecifických IgE nenašli. Prekvapivo však popísali asociáciu alely C (normálna „wild type“ alela) s alergiou na penicilín a s urtikou. Schedel a spol.²⁷⁰ vo svojej práci počítačovou analýzou sekvencií *STAT6* zistili, že v intróne č. 2 sa nachádzajú 2 pravdepodobné miesta pre väzbu NF-κB a polymorfná alela rs324011 SNP je zodpovedná za tvorbu distálnejšieho z nich. V následnej funkčnej štúdií preukázali, že táto alela je zodpovedná za zvýšenú tvorbu IgE²²⁹.

Leung a spol.²⁷⁴ posudzovali asociáciu polymorfizmov piatich génov s výskytom astmy v ich populácii a vyšetrovali i polymorfizmy T1309C (rs841718) a C1507T (rs3024974) v *STAT6*. Polymorfizmus C1507T s významnou mierou v tejto populácii ovplyvňoval pokles FEV1 (spirometrické merania boli uskutočnené s ročným odstupom). Tento SNP však nebol v asociácii s IgE v čínskej populácii v predchádzajúcej štúdií týchto autorov²⁷⁵ a ani v beloškých populáciách nemeckého pôvodu²⁷⁰. Avšak ďalšia štúdia na nemeckej populácii popísala slabo významný vplyv T1309C a silný vplyv C1507T na hladinu IgE²⁶⁷.

Polymorfizmy, ktoré by eventuálne mohli ovplyvňovať *STAT6* funkciu sa nachádzajú i v 3'UTR. Duetsch a spol.²⁶⁷ skúmali 5 takýchto polymorfizmov, pričom zistili významnú väzbu 3'UTRSNP3 (rs1059513) s BHR a 3'UTRSNP4 (rs4559) s hladinou IgE. V populácii čínskych detí nebola nájdená žiadna asociácia s astmou, bola však zistená významná interakcia medzi tromi SNP - GT repetície v intróne č. 1, C258T (rs4559) a T710C (rs324015)

v čínskej populácii²⁷⁶. Vo framingtonskej GWAS štúdií bol nájdený signifikantný vplyv rs1059513 na dysreguláciu IgE²⁷⁷.

V tejto oblasti sa nachádza ešte jeden, extenzívne skúmaný polymorfizmus - 2964 G>A SNP (rs324015). Gao a spol.²⁷⁸ ho asociovali s hladinou IgE alebo miernou atopickou astmou v japonskej populácii, avšak bez asociácie zostal tento polymorfizmus v prípade významnej astmy (detí i dospelých) a to v japonskej i britskej populácii. V japonskej populácii bol však tento polymorfizmus asociovaný s eozinofiliou, detským atopickým ekzémom a potravinovou alergiou²⁷⁹. V populácii britských detí taktiež nebola potvrdená asociácia s hladinou IgE, bola zato ale nájdená významná spojitosť s potravinovou alergiou proti orieškom²⁸⁰. Naproti tomu, žiadna asociácia nebola nájdená s astmou či atopiou v nemeckej, čínskej alebo fínskej populácii^{267,272,281}. Vzhľadom na tieto výsledky možno predpokladať najviac tak nepriamy vplyv polymorfizmov v 3'UTR na *STAT6*²⁷⁶.

3.3.2 ADAM33

ADAM33 je prvým génom asociovaným s výskytom astmy, ktorý bol identifikovaný pomocou pozičného klonovania, na základe výsledkov predchádzajúcej celogenómovej asociačnej štúdie¹²⁶. Úloha *ADAM33* v patogenéze astmy bola následne extenzívne študovaná, samotný *ADAM33* patrí medzi niekoľko málo génov, ktorých asociácia s astmou bola úspešne replikovaná vo viac než 10 replikačných štúdiách²¹⁷. Jeho dôležitú úlohu pri vzniku astmy alebo BHR zvyrazňuje aj jeho expresia v dýchacích cestách a ďalej i význam pri embryonálnom vývoji dýchacej sústavy – je preferenčne exprimovaný v pľúcach v priebehu tzv. „vetviacej“ sa morfofenézy (branching morphogenesis) a sugestívne tak má dôležitú úlohu v EMTU.

3.3.2.1 Štruktúra *ADAM33*

ADAM33 patrí do rodiny približné 40 proteínov s dizintegrínovou a metaloproteinázovou aktivitou (z angl. A

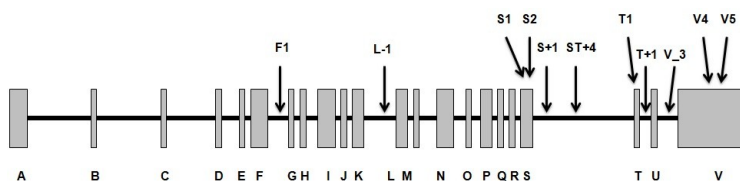
Disintegrin And Metalloproteinase), ktoré sa zúčastňujú rôznych biologických procesov. Samotný gén pre ADAM33 sa nachádza v oblasti 20p13 a je tvorený 22 exónmi, ktoré sú prerušené 21 intrónmi a dlhý viac než 14 kb. Celá kódujúca sekvencia dohromady má dĺžku 2541bp, z čoho 87bp tvorí 5'UTR a 2442 bp kóduje vlastnú sekvenciu ADAM33 o dĺžke 813 aminokyselín²⁸².

I keď sa exóny (a analogicky potom i intróny) podľa systematického prístupu označujú číslom vzostupne v smere 5' → 3', tak *ADAM33* z tohto pohľadu predstavuje výnimku. V dobe objavu *ADAM33* a popisu jeho štruktúry si autori označili exóny v uvedenom smerovaní pomocou písmeniek abecedy¹²⁶. Podľa klasického (systematického) postupu majú i intróny svoje označenie – dohodou sa intróny označujú skratkou IVS, za ktorou sa pripojí číslo exónu, po ktorom daný intrón bezprostredne nasleduje. V prípade *ADAM33* sa intróny označujú kombináciou písmeniek označujúcich exóny, medzi ktorými daný intrón leží. S využitím tohto postupu potom napr. medzi exónmi „S“ a „T“ leží intrón „ST“ (Obr.15). Toto označenie, i keď z pohľadu súčasne platnej nomenklatúry v molekulárnej genetike „netradičné“, sa vžílo a stále sa používa. Toto je vidieť hlavne v prípade označovania polymorfizmov, ktoré je doposiaľ silne vžitá a používané, kedy meno polymorfizmu je tvorené písmenom označujúcim exón/intrón, v ktorom sa nachádza, s pripojením čísla podľa polohy, v ktorej sú tieto polymorfizmy postupne v rade za sebou uložené v sekvencii génu (Obr. 15).

3.3.2.2 Štruktúra *ADAM33* proteínu

ADAM33 patrí do rodiny *ADAM* proteínov, ktorá tvorí podskupinu super rodiny metaloproteináz závislých od Zn²⁸³. Svoj názov majú odvodený od 2 funkčných domén (dizintegrínová a metaloproteázová domény), ktoré zdieľajú so svojimi najbližšími príbuznými – PIII trieda metaloproteináz hadieho jedu (SVMP). Všetky proteíny skupiny *ADAM* majú rovnakú organizáciu, obsahujú signálnu sekvenciu, prodoménu a domény: katalytickú

(metaloproteázovú), dizintegrínovú, na cysteín bohatú, EGF (epidermálny rastový faktor) podobnú, transmembránovú a cytoplazmatickú (obr. 16). Tak ako i niektoré ďalšie ADAM proteíny, tak i ADAM33 obsahuje konsenzusový sekvenčný motív HEXGHXXGXXHD pre väzbu zinku v ich metaloproteínázovej doméne, ktorý je potrebný pre ich katalytickú aktivitu²⁸⁴.



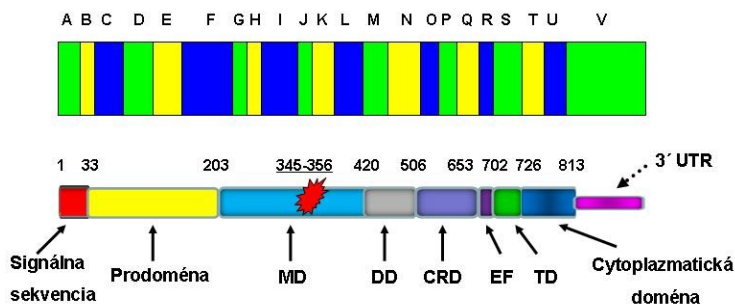
Obr. 15. Organizácia *ADAM33* a jeho polymorfizmy.

Na obrázku je znázornená štruktúra exónov a intrónov *ADAM33*. Ďalej je označená pozícia polymorfizmov, ktoré boli často sledované v replikačných štúdiách a ktorých asociácia sa zároveň posudzovala v českej populácii.

Signálna sekvencia je umiestnená na N – konci proteínu a je dôležitá pre nasmerovanie ADAM proteínov do sekrétorických dráh. Prodoména nasleduje hneď za signálnou sekvenciou a je dôležitá pre maturáciu ADAM bielkovín. Primárnou funkciou prodomény je udržiavať metaloproteázovú doménu v inaktívnom stave. Činí tak prostredníctvom cysteínového preskoku, kedy konzervovaný cysteín prodomény interaguje s aktívnym miestom proteínu pre zinok. Sekundárnou úlohou prodomény je funkcia šaperónu a je tak zodpovedná za poskladanie ADAM proteínu do správnej konformácie, čo sa týka hlavne metaloproteázovej domény. Metaloproteázová doména (MP) *ADAM33* je aktívna, má proteolytickú aktivitu. Jej aktívne miesto obsahuje atómy zinku a vody potrebné pre hydrolytické procesy a tieto molekuly sú vo vzájomnej koordinácii s 3 konzervovanými histidínmi a distálnejšie uloženým metionínom. Katalytické miesto MP je do veľkej miery konzervované, i keď je u každého aktívneho ADAM trochu iná –

tento rozdiel v štruktúre by mohol súvisieť so substrátovou špecifickosťou²⁸⁵. Medzi substráty ADAM33 patrí mimo iné i napr. beta amyloidný prekursor APP²⁸⁶.

Dizintegrínová doména (DD) má svoj názov odvodený od toho, že je taktiež prítomná v štruktúre SVMP, kde sú zapojené do väzby integrínových receptorov krvných doštičiek. Blokováním týchto receptorov nedochádza k väzbe ich prirodzených ligandov ako je napríklad fibronektín, čo vedie k inhibícii tvorby agregácie doštičiek v mieste poranenia. Za interakciu s fibronektínom je zodpovedná konsenzusová RGD sekvencia 13 aminokyselín v tzv. dizintegrínovej slučke a mnoho ADAM proteínov zdieľa RX6DEVF sekvenciu. Väčšina ADAM proteínov sa môže vďaka tejto sekvencii viazať na $\alpha 9\beta 1$ integríny. Interakcia s týmito integrínmi má význam vo fúzii buniek, ako bolo zistené napríklad v prípade ADAM12 a $\alpha 9\beta 1$ v procese diferenciacie myogénnych prekursorov. Význam EGF podobnej domény a domény bohatej na cysteín (CRD) nie je úplne jasný. Je však pravdepodobné, že CRD dopĺňa funkčne DD a zároveň by mohla dodávať špecifickosť interakciám riadeným pomocou DD. Pri posudzovaní vlastností CRD má však pravdepodobne najväčší význam jej schopnosť fungovať ako špecifický ligand pre syndekany (adhézne molekuly). Predpokladá sa, že i EGF podobná doména by mohla mať význam v bunkovej adhézii. Cytoplazmatický koniec ADAM proteínov je silne variabilný v sekvencii i dĺžke a predpokladá sa, že má úlohu v regulácii metaloproteázovej aktivity a bunkovej signalizácie riadenej z vnútra buniek smerom von alebo v kontrole maturácie a subcelulárnej lokalizácie týchto proteínov²⁸⁵. Zároveň môže predstavovať väzbové miesto pre proteíny asociované s cytoskeletom⁴⁶.



Obrázok 16. Štruktúra proteínu ADAM33

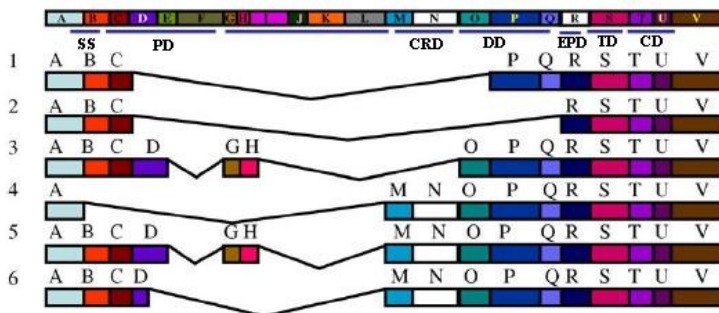
Obrázok znázorňuje štruktúru ADAM33 vo vzťahu k odpovedajúcim exómom *ADAM33*, ktoré kódujú jednotlivé domény. Číslo označujú poradie aminokyselín na rozhraní domén, je znázornená i 3'UTR. Červená hviezda označuje miesto väzby zinku a miesto konsenzusovej sekvencie je podčiarknuté. MD – metaloproteázová doména, DD – dizintegrínová doména, CRD – doména bohatá na cysteín, EF – doména s podobnosťou k EGF, TD – transmembránová doména.

3.3.2.3 Isoformy *ADAM33* a možné funkcie proteínu *ADAM33*

ADAM33 má niekoľko izoforiem. Medzi hlavné patrí α -izoforma, ktorá je vytvorená podľa celej cDNA. Naproti tomu β -forma je vytvorená na základe alternatívneho zstrihu s vynechaním exónu č. 17 (exón Q), v dôsledku čoho v tejto forme chýba 26 aminokyselín na rozhraní CRD a EGF podobnej domény²⁸⁴. Ďalšou (predpokladanou) izoformou je pravdepodobne sekrétovaná varianta, s*ADAM33*, ktorá vzniká deléciou 37 bp v exóne R, čím dochádza k posunu čítacieho rámca a vzniká proteín bez transmembránovej jednotky.

Expresia *ADAM33* bola pozorovaná v rozličných ľudských tkanivách (mimo tkanivo pečene), no relatívne najvyššia expresia pri vyšetrení adultných tkanív bola zistená v pľúcach, slezine, cievach a placente²⁸⁴. V dýchacích cestách je expresia *ADAM33* obmedzená na mezenchýmové bunky a už Eerdewegh a spol.¹²⁶ pozorovali prítomnosť *ADAM33* len v pľúcnych fibroblastoch a hladkom

svalstve bronchov, avšak nie v epiteliálnych bunkách. Nortern blotovou analýzou objavili prítomnosť dvoch transkriptov o veľkosti 5 a 3,5 kb. 5kb transkript nebol prítomný v cytoplazme a preto pravdepodobne predstavuje formu s nevystrihnutými intrónmi, nakoľko 3,5 kb produkt obsahuje všetky exóny *ADAM33*.



Obr. 17. Varianty *ADAM33*

Vysvetlivky: SS – signálna sekvencia; PD – prodoména; CRD na cystein bohatá doména; DD – dizintegrínová doména; EPD – doména s podobnosťou k EGF; TD – transmembránová doména; CD – cytoplazmatická doména (upravené podľa Holgate ST a spol.²⁸⁸).

S výskytom astmy boli spojené i intrónové polymorfizmy v *ADAM33*, čo logicky viedlo k predpokladu, že by mohli ovplyvňovať zosťrih génu a tak ovplyvňovať jeho expresiu, či poprípadе viesť k vzniku rôznych izoforiem *ADAM33*. Táto hypotéza viedla k čínorodému výskumu zameranému na miesto expsie i prítomnosť izoforiem *ADAM33*. Mimo prvé dve hlavné izoformy α a β ²⁸⁴, bola v expresnej analýze vzoriek z bronchiálnej biopsii zistená prítomnosť i ďalších izoforiem *ADAM33*. Powell a spol.²⁸² v nej pozorovali prítomnosť 2 foriem *ADAM33* obsahujúcich dlhý D exón – ten bol predĺžený prítomnosťou 39 bp, čím sekvencia prodomény bola obohatená o 13 aminokyselín. Obom variantom *ADAM33* však chýbala funkčná MD. Ďalšia analýza zameraná na prítomnosť jednotlivých exónov / domén odhalila zaujímavú skutočnosť a síce, že izoformy s takmer kompletným reťazcom

obsahujúce i MD sú exprimované len v malej miere. A navyše, napr. mRNA pre predpokladanú sADAM33 formu tvorila len približne 2% zo všetkých izoformiem detegovaných v pľúcnych fibroblastoch. Všetky novo identifikované izoformy *ADAM33* nekódovali funkčnú MD (Obrázok 17). Proximálna časť MD (exóny G a H) bola prítomná len v izoformách s dlhým exónom D a funkčná MD bola prítomná len u menej než 5% všetkých detegovaných izoformiem²⁸². Analýza mRNA transkriptov *ADAM33* v cytoplazme a jadre priniesla ďalší zaujímavý poznatok, pretože až 90% všetkých transkriptov sa nachádzalo v jadre. V cytoplazme sa vo väčšom množstve nachádzala mRNA pre izoformy kódujúce proteíny s MD a ďalej bol detegovaný i amplikón zodpovedajúci sADAM33. V cytoplazme nebola detegovaná forma s dlhým exónom D – táto bola len v jadre a vykazovala pomerne dlhý životný polčas a bude tak najskôr predstavovať jadrovú zostrihovú predformu. Ďalšie detegované izoformy mali relatívne rovnaké zastúpenie v oboch sledovaných kompartmentoch. Western blotová analýza bola využitá k zisteniu, či detegované mRNA sú i translatované. Pomocou tejto analýzy bola zistená prítomnosť 120 kD bielkoviny (nematurovaný produkt) a ďalej bielkovín o veľkosti 100 kD (odpovedajúcej maturovanému proteínu), 37 kD - najčastejšia z foriem bez MD (zodpovedá klonu 1 z obr. 17) a nakoniec skupina bielkovín o veľkosti 50 – 60 kD, ktoré zodpovedali klonom 3 – 6 (obr. 17) s chýbajúcou funkčnou MD. β -forma *ADAM33* tvorila až 30% všetkých transkriptov a mala rovnomerné zastúpenie v cytoplazme i jadre²⁸². Je známa svojou možnosťou inhibície maturácie ADAM33 a teda by mohla mať dominantne negatívny efekt na proteázovú aktivitu²⁸⁹. Analogicky k situácii s ADAM19, by izoforma bez signálnej sekvencie mohla mať vlastnosť cytoplazmatickej lokalizácie²⁹⁰. Zostrihové varianty, ktorým chýbajú prodoména a MD, sú štruktúrne podobné syntetickému ADAM12-S, ktorý je *in vivo* schopný vyvolávať myogénezu²⁹¹.

Tento autorský kolektív následne študoval význam *ADAM33* pri vzniku astmy, sledovali jeho expresiu v zdravých,

astmatických a fetálnych pľúcach²⁸⁷. I táto štúdia odhalila prítomnosť viacerých izoform ADAM33, jednalo sa o formy s hmotnosťou 22, 37, 50 a 65 kD, pravdepodobná sADAM33 izoforma však v cytoplazme nebola nájdená. Analýza materiálu z fetálnych pľúc našla navyše ešte 25 kD formu²⁸⁷. V hladkej svalovine dýchacích ciest boli detegované i formy α a β , pričom β forma bola prítomná v menšej miere v porovnaní s predchádzajúcim experimente, ktorý ale študoval primárne fibroblasty²⁸². Imunohistochemické vyšetrenie materiálu z bronchiálnych biopsií lokalizovalo u dospelých osôb ADAM33 do hladkého svalstva a izolovaných buniek submukózy, spoločne s α -aktínom hladkých buniek²⁸⁷. V prípade analýzy fetálnych pľúc (materiál z I. trimestrálnych potratov, 8. – 10. g.h.) bol ADAM33 prítomný okolo bronchiálnych tubulov, bol však prítomný v širšom okolí - v nediferencovanom mezenchýme než α -aktín hladkých buniek²⁸⁷. Lokalizácia v zväzkoch hladkých svalov a v okolí fetálnych bronchov teda naznačuje dôležitú úlohu pri vývoji pľúc (bronchiálne, neurálne i vaskulárne štruktúry) a teda i potenciálny vplyv na „modeláciu“ dýchacích ciest s ich nasmerovaním k astmatickému fenotypu. V tejto štúdii nebola zistená lokalizácia ADAM33 v epitely dýchacích ciest a ďalej nebol ani zistený významný rozdiel mRNA foriem *ADAM33* či izoform ADAM33 medzi astmatikmi a kontrolami²⁸⁷.

Významným poznatkom postupne rozširujúcim určite rozsiahlu a komplexnú mozaiku funkcií a interakcií ADAM33 v dýchacích cestách, pri ich vývoji a pri vzniku astmy, je i zistenie toho, že tento proteín sa neobjavuje v epitely dýchacích ciest a to i napriek niekoľkým prácam popisujúcim jeho výskyt v tejto lokalite^{292,293}. Yang a spol.²⁹⁴ sa zamerali práve na expresiu *ADAM33* celkovo, sledovali distribúciu tejto expresie a s využitím i bioinformatických prístupov analyzovali predpokladaný promótor *ADAM33*. Jeho umiestnenie sa predpokladá v oblasti -550 – +80 vzhľadom k miestu transkripcie. Zistili, že promótor v tejto oblasti bol skutočne transkripčne aktívny a predpokladaný CpG ostrovček

(určený na základe bioinformatickej analýzy) ležiaci v oblasti -362 – +80 bol hypermetylovaný v bunkách epitelu a naopak hypometylovaný vo fibroblastoch exprimujúcich ADAM33. K demetylácii promotóra v *ADAM33* nedošlo ani po expozícii epitelialnych buniek efektu 5-aza-2'-deoxycytozínu (demetylačné činidlo). Vplyvom TGF- β 1 na epitel docielili jeho epitelovo-mezenchymálny prechod (z angl. EMT – epithelial-mesenchymal transition), bunky vykazovali redukovanú expresiu epitelových a zvýšenú expresiu mezenchymových markérov (napr. metaloproteináz), no expresia ADAM33 nebola pozorovaná a ani *ADAM33* promotór nebol hypometylovaný. Súčasne porovnali expresiu (bez skúmania izoforiem) *ADAM33* vo vzorkách od 15 osôb s ťažkou astmou a s 8 kontrolami a nenašli žiadny signifikantný rozdiel medzi porovnávanými skupinami. Autori na základe týchto výsledkom usúdili, že je nepravdepodobné, aby porušená regulácia expsie ADAM33 v epitelových bunkách prispievala k patogenéze astmy²⁹⁴. Predchádzajúce nálezy ADAM33 v epitely si vysvetľovali napr. i skříženou reaktivitou protilátok, ktorú pozorovali i oni sami (napr. s cytokeratínmi).

Ďalším kúskom do mozaiky úlohy ADAM33 pri astme bol nález 55 kD solubilnej formy ADAM33 (sADAM33) vo vzorkách z broncho-alveolárnej laváže (BAL) v prípade osôb s astmou avšak nie u zdravých kontrol, pričom množstvo sADAM33 inverzne korelovalo so stupňom astmy i s hodnotou FEV1% pri spirometrickom vyšetrení²⁹². sADAM33 má MD a preto by mohol využívať metaloprotézovú aktivitu i na substráty, ktoré sú membránovým formám odopreté. Nakoľko prítomnosť sADAM33 v dôsledku alternatívneho zostrihu nebola pozorovaná vôbec²⁸⁷ alebo len minimálne²⁸², tak sa Puxeddu a spol.²⁹⁵ zamerali na možnosť výskytu ektodoménového zhadzovania (z angl. ectodomain shedding) u ADAM33, tak ako to bolo preukázané napr. v prípade adam13 žiab rodu *Xenopus*²⁹⁶. Vo svojom experimente na rekombinantných bunkách zistili prítomnosť 55 kDa ADAM33 (sADAM33), bez prítomnosti prodomény (teda katalyticky aktívna

forma) a teda tento proteín vzniká spracovaním ektodomény s následnou posttranslačnou glykozyláciou²⁹⁵. A ešte mimo spontánne odhadzovanie ektodomény, nárast indukovaného odhadzovania ektodomény ADAM33 bol pozorovaný po expozícii TGF- β 2, pričom tento efekt bol závislý časovo i od koncentrácie TGF- β 2. S využitím vysoko purifikovaného proteínu zistili, že MD v ADAM33 má schopnosť veľmi rýchlo vyvolať diferenciaciu endoteliálnych buniek *in vitro* a zároveň stimulovala tvorbu nových ciev *in vivo* i *in vivo* preparátach²⁹⁵. Angiogenéza je zvýšená u detských i dospelých astmatikov, koreluje so zníženou funkciou pľúc a samotný sADAM33 by tak mimo iné mohol zaistiť potrebnú výživu pre rozvíjajúce sa hladké svalstvo.

V poslednej dobe sa uvažuje, že počiatky astmy je nutné hľadať už prenatálne a i samotný *ADAM33* je exprimovaný vo fetálnych pľúcach. Haitchi a spol.²⁹⁷ zistili, že k výraznému zvýšeniu expresie *ADAM33* dochádza 2x v priebehu vývoja pľúc (v dobe skorého pseudoglandulárneho štádia a tesne po pôrode) a IL-13 výrazne suprimuje mRNA z *ADAM33*. Na myšom modeli potom zistili, že alergický stav vyvolaný u matky viedol taktiež k supresii *Adam33* mRNA, avšak došlo k zvýšeniu množstva spracovaného ADAM33. Súčasne bola pozorovaná i prítomnosť niekoľkých malých izoforiem s podobnosťou k sADAM33²⁹⁷.

Fyziologické funkcie ADAM33 ani jeho presné zapojenie do patogenézy astmy nie sú úplne jasné. Funkcie ADAM33 možno odvodzovať na základe jeho similarity k ďalším ADAM proteínom, hlavne členom podskupiny, do ktorej patrí – túto tvoria ADAM12, ADAM13 a ADAM19. Funkcie proteínu je také možno posudzovať na základe jeho domén, porovnaním s ich homológmi v ADAM proteínoch so známou funkciou. Ďalším vodítkom k pochopeniu úlohy ADAM33 v procese vzniku astmy je i prítomnosť rôznych izoforiem ADAM33 a zároveň i prítomnosť solubilnej formy ADAM33. Prítomnosť sADAM33 vo forme pravdepodobne čiastočne degradovaného proteínu o veľkosti 25 kDa bola pozorovaná i u pacientov s pľúcnou sarkoidózou, čo naznačuje úlohu

sADAM33 v procese rozvoja zápalu a remodelácii dýchacích ciest vo všeobecnosti a nie len pri astme²⁹⁸.

3.3.2.4 Polymorfizmy v ADAM33

ADAM33 je prvým génom asociovaným s astmou, ktorý bol identifikovaný pozičným klonovaním. Eederwegh a spol.¹²⁶ pri celogenómovom screeningu našli asociáciu astmy s oblasťou 20q13 a pri následnej analýze polymorfných markérov našli dva signály vo vnútri ADAM33. Sekvenovaním tohto génu identifikovali celkom 55 jednonukleotidových polymorfizmov (SNP), pričom 14 z nich bolo asociovaných s výskytom astmy v kaukazskej populácii (skupina z UK, skupina z US a spojená skupina), no distribúcia asociovaných SNP v jednotlivých skupinách a v kombinovaných dátach bola rôzna. Pretože predpokladali kumulatívny vplyv identifikovaných polymorfizmov na funkciu ADAM33 a tým aj na vznik astmy, uskutočnili ešte haplotypovú analýzu (kombináciu vždy 2 SNP do haplotypu) z polymorfizmov, ktoré boli samostatne asociované s astmou. Tieto zaujímavé výsledky vzbudili veľký záujem o štúdium úlohy ADAM33 pri vzniku astmy, množstvo prác sa pokúsilo asociovať SNP v ADAM33 s astmou v rôznych populáciách. Prvou štúdiou, ktorá úspešne replikovala asociáciu SNP v ADAM33 bola štúdia na vzorku nemeckej populácie²⁹⁹. V prípade familiárneho výskytu boli s astmou asociované F+1, ST+4 a ST+5 polymorfizmy. Niektoré z týchto SNP boli ešte súčasne spojené aj s eleváciou hladiny celkových IgE (F+1, ST+5), s BHR (F+1, S2) alebo s fenotypom astma + BHR (F+1, S2). Pri posudzovaní skupiny prípadov/kontrol bol s astmou asociovaný polymorfizmus ST+7 a s BHR polymorfizmus ST+5. Haplotypová analýza (dvoj- a trojlokusová kombinácia) v skupine s familiárnym výskytom ochorenia asociovala 1 haplotyp s astmou a ďalších 5 haplotypov s BHR²⁹⁹.

Spojitosť medzi SNP ADAM33 a výskytom astmy sa pokúšali nájsť aj Lee a spol.³⁰⁰ v súbore kórejských astmatikov. Uskutočnili genotypizáciu piatich polymorfizmov zo 14 pôvodne

asociovaných polymorfizmov¹²⁶ – S1, T1, V_1 V1 a V4. V skupine 326 astmatikov a 151 kontrol sa im však nepodarilo nájsť signifikantný rozdiel v distribúcii SNP ani haplotypov medzi skúmanými skupinami a ani väzbu na hladinu IgE. Jedinou výnimkou bola väzba T1 polymorfizmu a haplotypu h4 na hladinu BHR vyjadrenej pomocou PC₂₀ (pokles FEV₁ o 20% pri provokácii metacholínom)(ref.³⁰⁰). Hirota a spol.³⁰¹ skúmali vplyv SNP *ADAM33* na výskyt astmy dospelých osôb v súbore 504 astmatikov a 651 kontrol z japonskej populácie. Pomocou sekvenácie identifikovali celkovo 48 SNP, z ktorých 29 už predtým popísal Eederwegh a spol.¹²⁶ Do asociačnej analýzy zaradili 14 polymorfizmov, pričom signifikantnú asociáciu s astmou v dospelosti vykazoval polymorfizmus T1 a po korekcii vzhľadom k počtu analyzovaných SNP bola nájdená i hraničná asociácia pre S2 a V_3 polymorfizmy³⁰¹. Ďalej zostavili haplotypy zo štyroch SNP – S2, T1, T2 (SNP, ktorý nebol signifikantný po korekcii na mnohopočetný výber) a V_3 a zistili štatisticky významnú väzbu haplotypu CCTG na výskyt astmy v dospelosti. V protiklade k týmto výsledkom, nebol ani jeden zo študovaných polymorfizmov asociovaný s astmou v islandskej populácii³⁰². Autori však ešte uskutočnili meta-analýzu s využitím dostupných literárnych údajov, a našli signifikantnú asociáciu polymorfizmov ST+7, F+1, Q_1, S2 a T1 s astmou. Prvé dva z týchto polymorfizmov boli vo veľmi tesnej väzbe (linkage disequilibrium = 0.965).

Howard a spol.³⁰³ hľadali asociáciu medzi astmou (+ event. súvisiacim fenotypom) a 8 polymorfizmami v 4 rôznych populáciách – holandskej, beloškejskej z US, afroamerickej a hispánskej. I keď našli asociáciu piatich polymorfizmov s astmou, tak ani jeden polymorfizmus nebol asociovaným s daným fenotypom vo všetkých populáciách. Drobnou výnimkou bol len S2 SNP, ktorý nebol asociovaný len v holandskej populácii. Haplotypovou analýzou odhalili vždy 2 haplotypy so signifikantnou asociáciou v holandskej a afroamerickej populácii. V ostatných populáciách signifikantná väzba sledovaných haplotypov k výskytu astmy nebola zistená³⁰³.

Veľká austrálska štúdia neobjavila asociáciu medzi žiadnym z 10 skúmaných polymorfizmov, odhalila však niekoľko haplotypov, ktoré boli významne spojené s astmou – za tento trend boli najviac zodpovedné polymorfizmy V-1 a ST+7³⁰⁴. Lind a spol.³⁰⁵ sa pokúsili replikovať asociáciu šiestich SNP (S1, T1, V-1, V1, V4 a T2) s astmou, jej závažnosťou, odpoveďou na bronchodilatačné látky a hladinou celkových IgE v populáciách z Mexika a Portorika. Asociáciu sa im však nepodarilo nájsť ani pre jeden polymorfizmus či haplotypy (kombinácie 2 – 6 SNP). Jongepier a spol.³⁰⁶ sa zamerali na vzťah SNP v *ADAM33* k progresii astmy. V skupine 200 astmatikov sledovaných viac než 20 rokov zistili, že vzácna alela polymorfizmu S2 bola asociovaná s výrazným ročným poklesom parametra FEV₁. Táto práca poukázala teda na možný vplyv SNP v *ADAM33* nielen na rozvoj astmy, ale aj na priebeh choroby.

Asociáciu detskej astmy s polymorfizmami v *ADAM33* skúmali Simpson a spol.³⁰⁷ v britskej populácii detí vo veku 3 a 5 rokov. Vzácna alela F+1 SNP bola v tejto populácii vo väzbe na zníženú funkciu pľúc u trojročných detí. S využitím recesívneho modelu dedičnosti bola pozorovaná asociácia F+1, S1, ST+5 a V4 s meraním špecifickej rezistencie v dýchacích cestách u päť ročných detí. S rizikom výskytu nízkeho FEV₁ boli zase asociované polymorfizmy F+1, M+1, T1 a T2 a riziko výskytu prechodného skorého pískania predstavovala alela A polymorfizmu F+1 v heterozygotnom stave³⁰⁷. Raby a spol.³⁰⁸ sledovali 652 nukleárných rodín s výskytom astmy a posudzovali asociáciu 17 SNP v *ADAM33* s výskytom detskej astmy. I keď v belošskej a afro-americkej populácii z USA nebol s astmou asociovaný ani jeden zo sledovaných SNP, tak polymorfizmy T1 a T+1 vykazovali hraničnú asociáciu ($p = 0,04$) v podskupine hispánskej populácie. Haplotypovou analýzou odhalili v belošskej populácii z USA asociáciu haplotypu č. 16 ($p=0,006$). Tieto štúdie poukazujú na to, že vplyvy SNP v *ADAM33* začínajú už prinajmenšom v ranom detstve.

Medzi posledné asociačné štúdie patrí i výzkum vzťahu astmy a fajčenia s polymorfizmami v *ADAM33* v skupine mladých

japonských žien. Pri uvažovaní kodominantného modelu bola nájdená asociácia AA genotypu polymorfizmu Q-1 (rs612709) s astmou pri porovnaní s genotypom GG. Signifikantnú väzbu s výskytom astmy vykazoval haplotyp CCGGAAGA (obsahuje mimo iné i alelu A polymorfizmu Q-1 a G alelu polymorfizmu S2). Hranicu signifikancie pre vzájomnú interakciu s fajčením pri vzniku choroby takmer dosiahli polymorfizmy V-3 a S2³⁰⁹. Signifikantne zvýšené riziko pre astmu u detí predstavovali v populácii zo Saudskej Arábie polymorfizmy T1 a T2 (pri využití dominantného modelu). Polymorfizmy S1 a ST+4 neboli s astmou v tejto populácii asociované³¹⁰. Navyše v meta-analýze z dát populácií v UK a z Islandu, ktorá analyzovala celkovo 1299 pacientov a 1665 kontrol, bola nájdená asociácia F+1 a ST+7 polymorfizmov s výskytom astmy³¹¹. Skutočná a najsilnejšia asociácia spomedzi polymorfizmov sledovaných v jednej z posledných GWAS štúdií bola zistená pre S2 polymorfizmus v *ADAM3*³¹².

4. Ciele dizertačnej práce

Medzi gény najčastejšie spojené s atopiou a hladinou IgE patrí *STAT6* a medzi gény najčastejšie asociované s astmou a/alebo BHR patrí zase *ADAM33*. Pretože SNP v týchto génoch môžu ovplyvňovať ich funkciu a viesť tým pádom k rozvoju astmy a alergie, tak táto dizertačná práca mala nasledujúce ciele:

1. určiť genotypy vybraných polymorfizmov (SNP) v *STAT6* a *ADAM33* v sledovaných rodinách s výskytom astmy a v skupine kontrol, následne štatisticky zhodnotiť ich asociáciu s astmou, hladinou celkových IgE a BHR,
2. zo získaných genotypov SNP v *STAT6* a v *ADAM33* vytvoriť haplotypy *STAT6* a *ADAM33* a štatisticky zhodnotiť ich asociáciu s astmou, hladinou celkových IgE a BHR,
3. posúdiť možný rozdielny vplyv zostavených haplotypov v závislosti od ich rodičovského pôvodu (maternálny vs. paternálny prenos).

5. Materiál a metódy

5.1 Charakteristika sledovaných skupín

Do výskumu bolo zaradených 109 detí s diagnózou asthma bronchiale. Súčasne boli vyšetrení aj ich príbuzní (rodičia a súrodenci), celkove 375 osôb z 108 rodín. Kontrolnú skupinu tvorilo 45 náhodne vybraných osôb z bežnej populácie. Projekt bol schválený etickou komisiou pri fakultnej nemocnici v Olomouci. Rodičia všetkých detí zaradených do výskumu podpísali informovaný súhlas. Diagnóza atopickej astmy bola určená podľa doporučení GINA z roku 2002 u všetkých 109 pacientov vyšetrených na Detskej klinike v rokoch 2003 – 2005. Podľa rovnakých doporučení bol u pacientov vyhodnotený stupeň závažnosti ochorenia a na základe klinického obrazu a výsledkov laboratórnych vyšetrení (absolútny počet eozinofilov, celková hladina IgE v sére, percentuálne množstvo eozinofilov s CD44 na povrchu). Do súboru pacientov bolo zaradených celkove 75 chlapcov a 34 dievčat s vekom 0,4 – 20,2 rokov (medián 11 rokov). Deti s vrodenou chybou dýchacích ciest alebo so závažnou chorobou respiračného traktu neboli do výskumu riešeného touto dizertačnou prácou zaradené.

5.1.1 Posúdenie atopie v sledovaných skupinách

Atopický status bol posúdený u všetkých pacientov pomocou kožného prick testu s využitím extraktov bežných alergénov (pele trávín a stromov, roztoče, plesne, extrakty srsti psov a mačiek). Hladiny celkových IgE protilátok boli určené nefelometrom BN II, Dade Behring s kitom N Latex IgE mono, firmy Siemens. Podstatou tejto metódy je to, že polystyrénové častice obalené špecifickými protilátkami proti ľudskému IgE sú agregované po pridaní vzorku obsahujúceho ľudské IgE. Tieto zrazeniny rozptyľujú lúč svetla prechádzajúci vyšetrovanou vzorkou. Koncentrácia vyšetrovaného analytu je úmerná intenzite rozptýleného

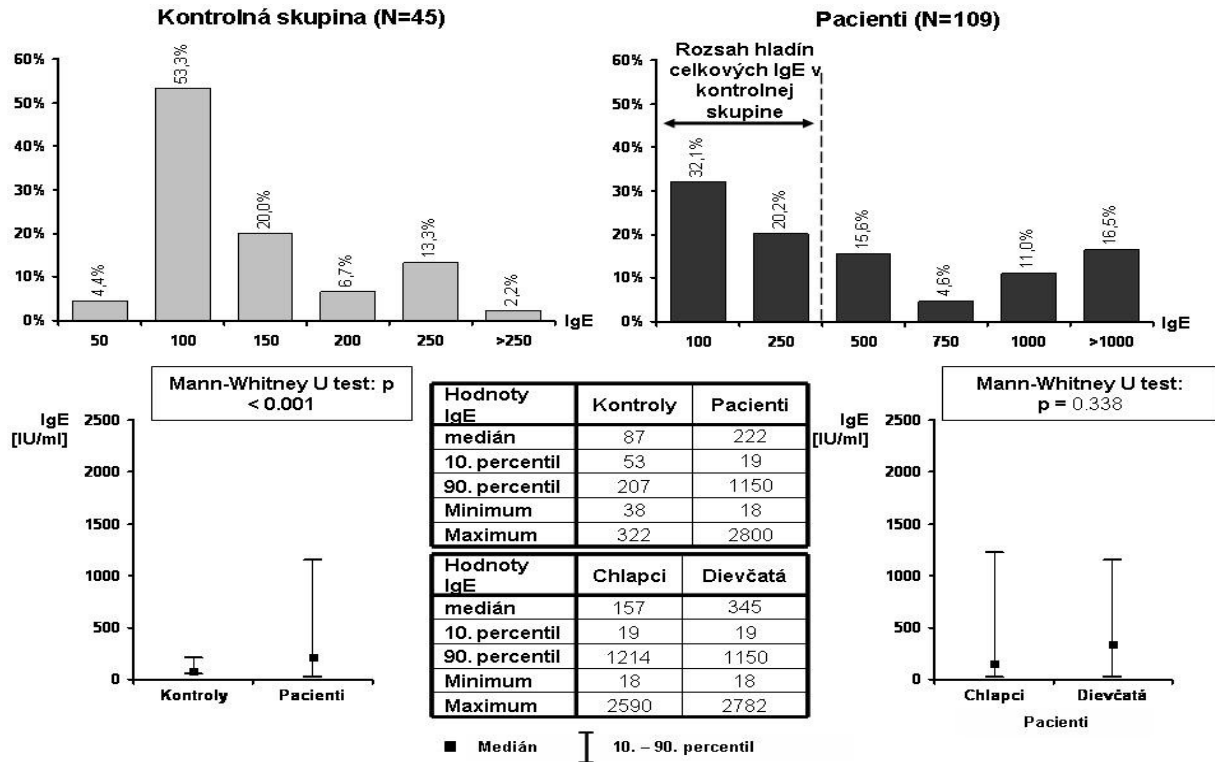
svetla, meranie musí byť vždy porovnané so vzorkou o známej koncentrácii. Meraním hladiny celkových IgE v skupine pacientov i kontrol a medzi týmito skupinami bol signifikantný rozdiel ($p < 0,01$. Obr. 18).

5.1.2 Posúdenie pľúcnych funkcií a BHR pomocou spirometrie

Spirometria bola u sledovaných osôb uskutočnená pred nasadením protizápalovej terapie. Všetky sledované deti boli bez známkov infekcie respiračného traktu a to po dobu 4 týždňov pred uskutočnením spirometrického vyšetrenia. U všetkých vyšetrovaných subjektov sa požadovalo vysadiť liečbu kortikosteroidmi, antihistaminikami i antileukotriénami 72 hodín pred samotným vyšetrením. Podanie krátkodobo účinkujúcich β -mimetík v prípade potreby bolo povolené. Ráno v deň testovania nebolo povolené podávanie salbutamolu. Osoby, u ktorých bola základná hodnota FEV1 pod 80% predpokladanej hodnoty, boli zo štúdie vylúčené. Spirometrické vyšetrenie sa uskutočnilo pomocou prístroja Jaeger MasterScreen Spirometry system (Jaeger Co., Nemecko). Pľúcne funkcie boli vyšetrené v polohe po sediačky. Všetky vyšetrované osoby museli mať základnú hodnotu FEV1 nad 80% s menej než 5% variabilitou medzi tromi nasledujúcimi meraniami. Hodnoty pľúcnych funkcií boli vyjadrené ako absolútne hodnoty a percentá z predpokladaných hodnôt. Predpokladané hodnoty pre každý testovaný subjekt boli určené pomocou šandardizovanej metódy s prihliadnutím k pohlaviu vyšetrovaných osôb, ich veku, hmotnosti a výšky.

Samotná bronchoprovokácia bola vykonaná pomocou histamínu a metacholínu, vždy s využitím dvoch rozličných metód podávania:

- metóda bolusového podania dozimetrickým MedAid nebulizátorom (Jaeger Co, Nemecko) – elektronicky riadený ventil dávkuje kalibrované množstvo aerosólu pri nádychu alebo v priebehu časti nádychu, kedy je prietok v dýchacích cestách najefektívnejší



Obr. č. 18 Hodnoty IgE v skúmaných súboroch celkovo a podľa pohlavia v skupine pacientov.

- metóda pokojného dýchania – aerosól je vytváraný dozimetrickým DeVilbiss 646 nebulizátorom (DeVillbis, Bornemouth, Veľká Británia) a konštantné množstvo 1 ml každej koncentrácie je inhalované 2 minúty pokojným vdychovaním.

Po uplynutí 60 sekúnd od ukončenia inhalácie testovanej koncentrácie látky sa uskutočnilo vyšetrenie FEV1. Pokles FEV1 o 20% z pôvodnej hodnoty a viac bol považovaný za pozitívny a vyšetrenie bolo ukončené. Pacientom boli následne podané 2 vstreky Salbutamolu a záverečné vyšetrenie spirometrie prebehlo opakovane po 2, 5 a 15 minútach od inhalácie salbutamolom. Tabuľka č. 2 sumarizuje podávané množstvá bronchoprovokačných látok. Bronchoprovokačné testy s oboma látkami a súčasne podané oboma spôsobmi sa podarilo vyšetriť u 96 detí.

Tab. č.2 Prehľad podávaných dávok látok pri bronchostimuláciách.

Inhalácia s Histamínom							
MedAid	koncentrácia [mg/ml]	0,600	1,000	2,000	4,000	8,000	16,000
	jednotlivá dávka [mg]	0,024	0,032	0,080	0,159	0,320	0,640
	kumulatívna dávka [mg]	0,025	0,056	0,136	0,295	0,615	1,255
	úroveň BHR	ťažká		stredná		mierna	
de Villbis	koncentrácia [mg/ml]	0,010	0,100	0,300	0,600	1,000	2,000
	jednotlivá dávka [mg]	0,004	0,028	0,101	0,202	0,672	1,334
	kumulatívna dávka [mg]	0,005	0,032	0,133	0,335	1,370	2,714
	úroveň BHR	heavy		stredná		mierna	

Inhalácia s Metacholínom							
MedAid	koncentrácia [mg/ml]	2,00	4,00	8,00			
	jednotlivá dávka [mg]	0,03	0,06	0,20			
	kumulatívna dávka [mg]	0,03	0,09	0,29			
	úroveň BHR	ťažká		mierna			
de Villbis	koncentrácia [mg/ml]	2,00	4,00	4,00	8,00	8,00	16,00
	jednotlivá dávka [mg]	0,05	0,10	0,30	0,60	1,00	1,50
	kumulatívna dávka [mg]	0,05	0,15	0,45	1,05	2,05	3,55
	úroveň BHR	ťažká		stredná		mierna	

V tabuľke je uvedené i primárne rozdelenie závažnosti BHR podľa množstva inhalovanej látky nutnej k prejavom BHR.

5.2 Genotypizácia

DNA bola izolovaná zo vzorky periférnej krvi štandardnou vysoľovacou metódou (Millerova metóda). Na základe literárnych zdrojov bolo pre asociačnú analýzu primárne vybraných viacero SNP v *STAT6* a v *ADAM33*, ich prehľad prináša tabuľka č.3. Vo všeobecnosti, genotypy pacientov, ich príbuzných i kontrol boli určené pomocou real-time PCR s využitím sekvenčne špecifických sond typu TaqMan. Správnosť genotypizácie bola overená pomocou priamej sekvenácie oblastí obsahujúcich sledované polymorfizmy u 15 pacientov a ich príbuzných, celkovo u 50 osôb.

5.2.1 Izolácia DNA z leukocytov periférnej krvi Millerovou metódou

Vzorka odobranej krvi sa preleje do 50 ml Falcon skúmavky, doplní sa LB pufrom do objemu 50ml, premieša sa a inkubuje sa 10 min. pri izbovej teplote alebo 45 min. na ľade. Následne sa realizuje centrifugácia pri 2000 rpm po dobu 30 minút. Po opatrnom odliatí supernatantu tak, aby na dne zostal pelet leukocytov, sa pridá 5 ml LB pufru, premieša sa a opäť scentrifuguje 10 min. pri 2000 rpm. Supernatant sa odleje, pelet sa znovu zľahka opláchne LB pufrom, skúmavka sa otočí a nadbytočný pufr sa nechá vykvapkať na servítku. Potom sa pridajú 3 ml NBL pufru, 50µl proteinázy K, 150µl 20% SDS, zmes sa dôkladne pretrepe (cca 15s) a cez noc sa pri 37°C inkubuje v termostate.

Po inkubácii sa pridá 1 ml 6M NaCl, dôkladne pretrepe (cca 15s) a centrifuguje 15 min při 5000 rpm. Supernatant sa po centrifugácii preniesie do čistej 10 ml skúmavky a v nej sa opäť centrifuguje po dobu 10 min. pri 4500 rpm. Vzniknutý supernatant sa preniesie do čistej 15 ml skúmavky a doplní sa 96% ethanolom do objemu 15 ml a opatrne premieša (otáčaním skúmavky v rukách). Do skúmavky typu Eppendorf sa napipetuje cca 1 ml 70% ethanolu a precipitovaná DNA sa pomocou sterilného skleneného háčika do nej preniesie. Túto skúmavku potom centrifugujeme 5 min pri 14 000 rpm., ethanol následne opatrne odlejeme a DNA necháme vyschnúť

pri pokojovej teplote po dobu cca 1 hod. Po vyschnutí DNA sa do skúmavky pridá TE pufor (100 – 500 μ l podľa veľkosti precipitátu DNA) a nechá sa rozpustiť cez noc pri pokojovej teplote alebo 1 hod pri 65°C. S takto pripravenou DNA je potom možné ďalej manipulovať.

5.2.2 Sekvenácia

Sekvenácia bola zahájená štandardnou amplifikáciou úsekov v skúmaných génoch, obsahujúcich príslušné sledované polymorfizmy. Reakcia prebiehala v objeme 30 μ l. Zoznam použitých primerov k amplifikácii (a taktiež následne i k vlastnej sekvenácii) uvádzajú tabuľky č. 4 a 5.

Zloženie reakčnej zmesi je nasledovné:

15 μ l Combi PPP Master Mix (Top-Bio)

13,1 μ l PCR vody (Top-Bio)

0,3 μ l primeru F (10 pmol/ μ l)

0,3 μ l primeru R (10 pmol/ μ l)

1,3 μ l DNA (100 pmol/ μ l)

Termálny profil amplifikácie:

- 5 min. 95 °C – úvodná denaturácia,

- 10 cyklov: 30 s 94 °C,

30 s 60 °C,

90 s 72 °C,

- 25 cyklov: 30 s 90 °C,

30 s 60 °C,

90 s 72 °C,

- 10 min. 72 °C a na záver 10 °C.

Tab. 3 Prehľad sledovaných SNP v *STAT6* a *ADAM33*.

Označenie <i>STAT6</i> SNP		Pozícia v géne	Typ zámény
Duetsch a spol. ²⁶⁷	podľa GenBank		
<i>in2SNP1</i>	rs167769	intrón 2	A/G
<i>in2SNP2</i>	rs324012	intrón 2	A/G
<i>in2SNP3</i>	rs324011	intrón 3	A/G
<i>in16SNP1</i>	rs3024972	intrón 16	A/C
<i>in17SNP1</i>	rs841718	intrón 17	C/T
<i>in18SNP1</i>	rs3024974	intrón 18	C/T
<i>3'UTR SNP1</i>	rs324015	3'UTR	A/G
<i>3'UTR SNP2</i>	rs703817	3'UTR	A/G
<i>3'UTR SNP3</i>	rs1059513	3'UTR	A/G
<i>3'UTR SNP4</i>	rs4559	3'UTR	A/G
<i>3'UTR SNP5</i>	rs13983	3'UTR	A/G

Označenie <i>ADAM33</i> SNP		Pozícia v géne	Typ zámény
Eerdewegh a spol. ¹²⁶	podľa GenBank		
<i>F+1</i>	rs511898	intrón 6	G/A
<i>L-1</i>	rs2280092	intrón 11	G/A
<i>S1</i>	rs3918396	exón 19	G/A
<i>S2</i>	rs528557	exón 19	G/C
<i>S+1</i>	rs2853209	intrón 19	T/A
<i>ST+4</i>	rs44707	intrón 19	T/C
<i>ST+5</i>	rs597980	intrón 19	A/C
<i>12136</i>	rs17548872	intrón 19	G/C
<i>T1</i>	rs2280091	exón 20	T/C
<i>T2</i>	rs2280090	exón 20	C/T
<i>T+1</i>	rs2280089	intrón 20	C/T
<i>V-3</i>	rs628977	intrón 21	G/A
<i>V-2</i>	rs628965	intrón 21	C/T
<i>V-1</i>	rs543749	intrón 21	C/A
<i>V4</i>	rs2787094	3 UTR	C/G
<i>V5</i>	rs3746631	3 UTR	A/G

V tabuľke sú uvedené všetky SNP, ktoré boli primárne vybrané ku genotypizácii pomocou sond typu TaqMan.

Správny priebeh reakcie a tým pádom prítomnosť produktov je možné overiť elektroforézou v 1,5% agare, pričom vizualizácie PCR produktov je dosiahnuté interkaláciou 5% Ethidium bromidu (EtBr) obsiahnutého v géle v priebehu elektroforézy. Nakoľko je EtBr fluorescenčný farbivom, tak po jeho ožiarení UV svetlom červenooranžovo fluoreskuje. Takto získané produkty je pred ďalšou manipuláciou nutné prečistiť, k tomuto účelu bol využitý Quick-Start protokol s kitom QIAquick® PCR purification (Qiagene).

Postup prečistenia produktov PCR (QIAquick® PCR purification kit, Qiagene):

- k 10 μ l PCR produktu pridať 50 μ l PB pufru a dôkladne pretrepať,
- vzorku s PB pufrom preniesť do QIAquick kolónky umiestnenej v 2 ml skúmavke,
- centrifugovať 60 s pri 12 000 rpm,
- vyliat obsah 2 ml skúmavky a QIAquick kolónku do nej opäť vložiť,
- do QIAquick kolónky pridať 750 μ l PE pufru,
- centrifugovať 60 s pri 12 000 rpm,
- obsah 2 ml skúmavky vyliat a QIAquick kolónku do nej späť umiestniť,
- centrifugovať 60 s pri 12 000 rpm,
- QIAquick kolónku umiestniť do 1,5 ml skúmavky, na stred membrány QIAquick kolónky pridať 50 μ l EB pufru.
- centrifugovať 60 s pri 12 000 rpm.

Tab. č.4 Prehľad sekvencií primerov pre *STAT6*.

SNP	Označenie primerov	Sekvencie PCR primerov	Dĺžka PCR produktu
<i>in2SNP1</i>	in2/1-f in2/1-r	5'-GCC TTG AGG AGA AAA GAG C-3' 5'-AGG AGG AGA GGT GGA AAA G-3'	497 bp
<i>in2SNP2</i>	in2/2-f in2/2-r	5'-CTC TCC CAT CCT CTT CAT C-3' 5'-GCA TCC CTA GAC AAA CCT C-3'	424 bp
<i>in2SNP3</i>	in2SNP3_b-f in2SNP3_b-r	5'-TTCCACCCCTGTGTCTATC-3' 5'-AGCCAGTCACCCAGAAGATG-3'	327 bp
<i>in16SNP1</i>	in16/1-f in16/1-r	5'-TCA GCG ACT CAG AGA TTG G-3' 5'-GGT CTT TGG CAG AGA ATG G-3'	427 bp
<i>in17SNP1</i>	in17/1-f in17/1-r	5'-GAA CAT CCA GCC ATT CTC TG-3' 5'-ATA ACC CCT GCC ATC CTT AC-3'	390 bp
<i>in18SNP1</i>	in18/1-f in18/1-r	5'-GTA AGG ATG GCA GGG GTT ATG-3' 5'-TGC TCA TGG AGG AAT CAG G-3'	253 bp
<i>3'UTR SNP1</i>	3'UTR1-f 3'UTR1-r	5'-CAG ACC TGC TCT GGA CAC TTG-3' 5'-GCC CTA ACC TGT GCT CTT ACC-3'	320 bp
<i>3'UTR SNP2</i>	3'UTR2-5-f 3'URT2-5-r	5'-CAG GGA TAG AGG ATA TTG GG-3' 5'-ACA CTT GCT GCT GTC TTC TG -3'	374 bp
<i>3'UTR SNP3</i>			
<i>3'UTR SNP4</i>			
<i>3'UTR SNP5</i>			

Tab. č.5 Prehľad sekvencií primerov pre *ADAM33*.

SNP	Označenie primerov	Sekvencie PCR primerov	Dĺžka PCR produktu
<i>F+1</i>	Adam 33 - 20f Adam 33 - 20r	5'- cctccctctgccccctcttgc -3' 5'- gagccctgaccaccaat -3'	585 bp
<i>L-1</i>	Adam 33 - 24f Adam 33 - 24r	5'- aggggtgggatcagaga -3' 5'- gagaggccatgccgaga -3'	594 bp
<i>S1</i> <i>S2</i>	Adam 33 - 4f Adam 33-4r	5'- ccttggggtcctaacc -3' 5'- ctgggagtcgtagaac -3'	333 bp
<i>S+1</i> <i>ST+4</i> <i>ST+5</i>	Adam 33 - 28f Adam 33 - 28r	5'- gcctgcttctgagccta -3' 5'- tgtcagacatggccacaga -3'	636 bp
<i>12136</i> <i>T1</i> <i>T2</i> <i>T+1</i>	Adam 33 - 30f Adam 33 - 30r	5'- gcggacatccaaggtctt -3' 5'- gggctctgggagaaatggtg -3'	597 bp
<i>V-3</i> <i>V-2</i> <i>V-1</i>	Adam 33 - 31f Adam 33 - 31r	5'- ctccctccagatgggcagcac -3' 5'- tgcccctgcagttcaagt -3'	598 bp
<i>V4</i> <i>V5</i>	Adam 33 - 32f Adam 33 - 32r	5'- gccaatcctgcctctg -3' 5'- ggtgtagcactgggattgg -3'	590 bp

Prečistené PCR produkty boli použité k vlastnej sekvenačnej reakcii (ako templát) v ktorej bol použitý sekvenačný kit ABI PRISM® Big Dye® Terminator v 3.1 s fluorescenčne označenými dideoxy-nukleotidmi (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Sekvenačný kit bol nariadený v pomere 1 : 3 sekvenačným pufrom (ABI PRISM® Big Dye® Terminator v 3.1, 5x sequencing buffer). Reakcia prebiehala v objeme 10µl.

Zloženie reakčnej zmesi pre vlastnú sekvenačnú PCR:

- 4 µl nariadeného sekvenačného kitu
- 2 µl deionizovanej vody
- 2 µl primeru, (10 pmol/µl, F a R primery sú použité pre samostatné reakcie, nie spolu)
- 2 µl DNA templáta (prečistený PCR produkt).

Termálny profil PCR pro sekvenáciu:

- 2 min. 94 °C

- 34 cyklov:

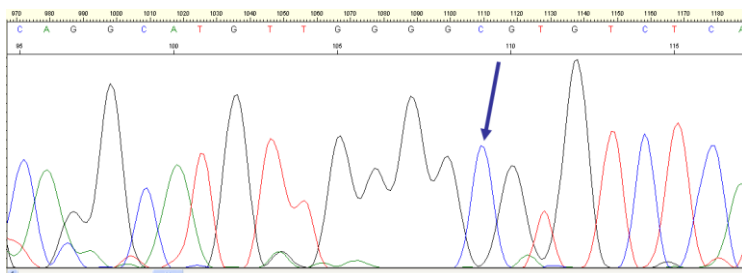
- 10 s 96 °C,
- (1 °C/s – 50 °C) a 5 s 50 °C,
- 4 min. 60 °C.

Po ukončení sekvenačnej reakcie sa za účelom odstránenia prebytočných zložiek reakcie vykonala ďalšia purifikácia, podľa nasledujúceho postupu:

- 10 µl PCR produktu zmiešať s 40 µl roztoku octanu sodného s ethanolom, pretrepať.
- Precipitácia pri izbovej teplote viac než 15 min (avšak nie dlhšie než 24 hod) a po tme, event. 40 - 60 min. v tme v chladničke,
- centrifugácia 20 min. pri 15 000 rpm.
- po opatrnom odsatí supernatantu pridať 125 µl 70% ethanolu, dôkladne pretrepať.
- centrifugácia 5 min. pri 15 000 rpm.

- opatrne odsati supernatantu, sušiť v otvorenej mikroskúmavke v trúbe 10 min. pri 60°C.
- pripipetovať 15 µl formamidu a dôkladne pretrepať aby došlo k uvoľnení PCR produktu.

Týmto spôsobom pripravené produkty sekvenačnej reakcie, boli potom separované v kapilárnej elektroforéze, kde došlo k rozdeleniu fragmentov podľa dĺžky. Získané dáta boli analyzované programom Sequencing Analysis, zistená sekvencia z vyšetrenej vzorky bola porovnaná so štandardnou sekvenciou uvedenou na internete pomocou aplikácie a databázy BLAST. Obrázok č. 19 ilustruje jednu takúto sekvenciu.



Obr. č. 19 Elektroforetogram – sekvenácia polymorfizmu 3'UTR SNP1 (rs324015) v *STAT6*.

Na obrázku je znázornený grafický výstup z vyhodnocovania výsledkov po kapilárnej elektroforéze vzoriek sekvenačnej reakcie, v tomto prípade sa jedná o polymorfizmus 3'UTR SNP1. Modrá šípka označuje miesto tohto polymorfizmu vo vyšetrovanom vzorku. Zobrazená sekvencia je sekvenciou zodpovedajúcou protiľahlému (R) reťazcu DNA. V tomto vzorku sa polymorfizmus 3'UTR SNP1 nachádza v homozygotnom stave (genotyp C/C).

5.2.3 Genotypizácia s TaqMan sondami

Vzorky pre real-time PCR reakciu boli nanášané do 96-ti jamkovej doštičky, v ktorej potom prebiehala reakcia i samotné meranie fluorescencie. Pri zostavovaní reakčnej zmesi sa postupovalo podľa doporučení od dodávateľa kitov obsahujúcich TaqMan sondy, ktorý bol modifikovaný na potreby nášho laboratória. Jednotlivé použité sondy pre genotypizáciu sledovaných SNP v súboroch pacientov, ich rodinných príslušníkov a kontrol sú uvedené v tabuľkách č. 6 a č. 7.

Zloženie reakčnej zmesi pre real-time PCR:

H ₂ O	6,28 µl
Rox farbička	0,02 µl
SNP genotyping assay (AppliedBiosystem)	0,20 µl
DyNAmo Probe qPCR Kit F450L (Finzyme)	4,00 µl
DNA 100 ng/µl	0,50 µl

Reakčné podmienky (teplotný profil):

95 °C, 15 min – úvodná denaturácia

55 cyklov: 95°C, 15s denaturácia,

60-62°C, 1 min. pre annealing/elongačný krok.

K uskutočneniu PCR reakcie bol využitý termocyklér Stratagene Mx3005P. Priebeh reakcie, meranie fluorescencie a hodnotenie nameraných dát bolo uskutočnené pomocou softwaru MxPro - Mx3005P v3.00 Build 311. Určovanie genotypov v sledovaných polymorfizmoch bolo založené na posúdení veľkosti a tvaru kriviek fluorescencie (dRn dáta), ďalej priebehu kriviek a hodnote C_T (hodnota pre konkrétnu fluorescenčnú farbičku i rozdiel ΔC_T medzi použitými fluorofórmami). Všetky tieto dáta boli závislé na množstve vstupnej DNA a súčasne i na základe miery špecifickosti väzby sondy ku konkrétnej alele SNP. Každý genotyp má špecifický tvar i priebeh kriviek. Príklady vzhľadu fluorescenčných dát a priebehu kriviek sú na obr. 20 a 21.

Tabuľka č. 6 Polymorfizmy s bežne dostupnými kitmi (predesigned assay).

SNP	Assay ID	Kontextová sekvencia
IN2 SNP3	C_620399_10	TCCCATAGATAGCCCTCCTAGGGAC[C/T]GTCCCCACCACCACTCATGGCCAGA
IN17	C_7480858_10	ATAGGGAGTGACATCAGGATGACAC[A/G]CGGGCAGGGAGAGGAGGGCAGCGGG
IN18	C_26439023_10	AGGGTTGATGCCACCCCTCCTTCTTCT[A/G]CAGATAAGCACTAAGCCCCTGACCT
3'UTR 3	C_7480847_10	GCTATACACGAAGAATCTCAGCCCT[C/T]GTACTTTTGCATAGTCTCATACACG
3'UTR 4	C_620397_10	TCATGCAACTAAGGTGCCAGCTATA[C/T]ATTTAACATATCCTAGGTACATACA
T1	C_15969370_10	TCCAGTGGCTGTGGGGCCCAACTCC[A/G]TGGGGTGAACGCCGCCAGGGGGTG
T+1	C_15969381_10	TGACTGGGTGCTGCCATCTGGAAG[A/G]AGGCAGGAGGCATGAGCCCTTCCCT
S1	C_1276547_20	GCCCCTGGGAGCAGAGGCAGCAGGA[C/T]GCTGAGGAGCATGGCCAGCAGGAAG
V4	C_11201381_1	TTTGTTTGCAGAGGCCAGCCAGGCT[C/G]CAGGGGAGTGTGGACTCAGTCGAAC
ST+4	C_601720_20	TGTGCAGAGGAAGTGGCAAAGGGCC[A/C]AAAAGTGGTGGAGACAGAGGCTGGAC
S2	C_601719_20	GGTAGCAACACCAGGCCAGGCCGGGC[C/G]CCTGGGAGCAGAGGCAGCAGGACGC
T2	C_15969380_10	GTGCCTCACTACCCAGGGGCCAGG[A/G]CTGTCCAGTGGCTGTGGGGCCCAAC

Prvých 5 SNP patrí *STAT6*, zvyšné SNP sa nachádzajú v *ADAM33*. Ďalej je i znázornená kontextová sekvencia, na ktorú boli navrhnuté sondy, miesto daného polymorfizmu označujú hranaté zátvorky – prvý z polymorfických nukleotidov je označený farbičkou VIC, druhý v poradí je označený farbičkou FAM. Tučným písmom je zvýraznená sekvencia, pre ktorú bola sekvencia sondy pripravená podľa reverzného (protiľahlého) reťazca.

Tabuľka č. 7 Polymorfizmy, pre ktoré bol kit vytvorený na základe požiadavku (custom assay).

SNP	Assay ID	Sekvence primeru (5'→3')	Sekvence sondy
L-1	ADAM33_24f-24f	GCGTCTGGCGGCTGTA GAGGGCATTGGGCATGGA	CAGTCCCCCAACCC ACAGTCCCTCCAACCC
V_3	ADAM33_31f-31f1	CTGTGGCTTTTCCTGGATCACT CCCCAGGCTGCAAGCT	ACTGAGTGAGGG G TGGG CTGAGTGAGG A TGGG
S+1	ADAM33_28f-28f1	GTAGCTTTGAACAGGAGTTCCA GCGGTGCTGGTGGTG	CACCCCC A CGCTTG CACCCCCTCGCTTG
V_1	ADAM33_31f-31f3	CCACACAGCTTGCAGCCT GCTGAGAATGAGGAGGATATGTTGT	CCCCAGTCC T TAGGG CCCAGT C ATTAGGG
F+1	ADAM33_20f-20f	GGAGTGGGAATGCTGTATCTATAGC TGGGACTCGAGGCCTGT	AGAGAC G GGAATTC AAGAGAC A GGAATTC
V5	ADAM33_32f-32f2	GGTTCGACTGAGTCCACACT CAGGAAGGAAGGTCCCCAAAATT	CTCTGCAA A CAAACAT CTGCAAG C CAAACAT
In2-2	STAT6IN222-IN22	CATCATCTAGCCTTGTGGTTTTTCATTTTTAT GCCTGGGCGACAGAGA	TTTTGAG G CAGAGTCT TTTTTTTTGAG A CAGAGTCT

Posledný SNP v tabuľke patrí je v *STAT6*, ostatné v *ADAM33*. Primery zvýraznené tučným písmom predstavujú kit, kde sonda bola navrhnutá na reverzný reťazec. Miesto SNP v sonde je zvýraznené tučným písmenom, prvá sonda (pre každý SNP) je značená farbičkou VIC, druhá sonda je značená farbičkou FAM.

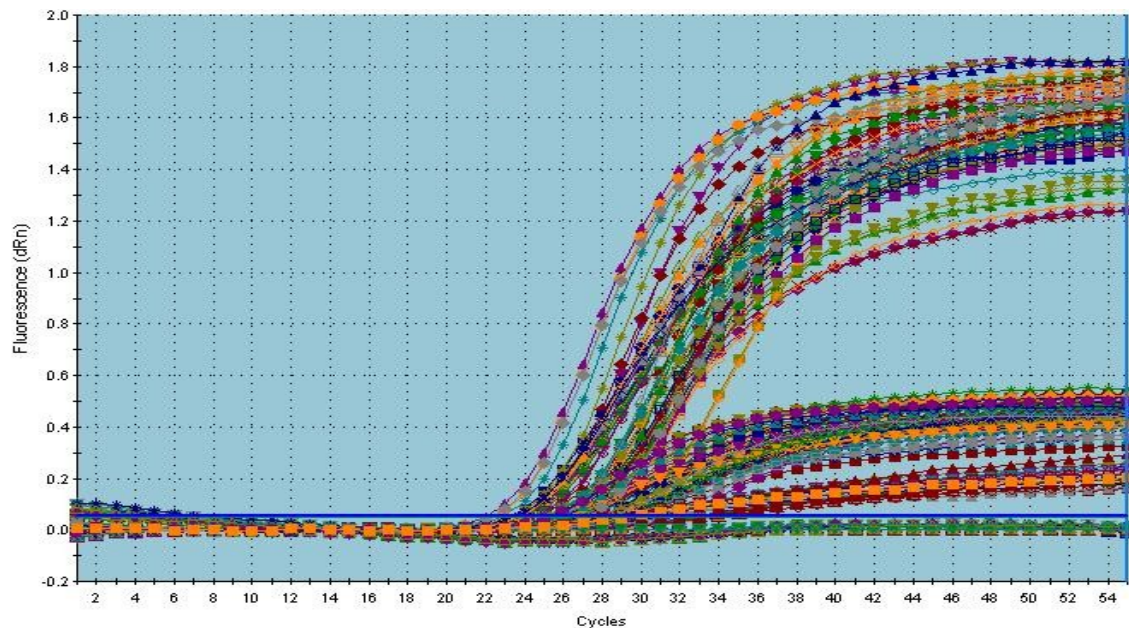
5.3 Haplotypizácia

Haplotypy z určených genotypov SNP sledovaných génov boli určené dvomi rozličnými spôsobmi. V prvom prípade boli haplotypy určené na základe znalosti genotypov sledovaných polymorfizmov u rodičov a súrodencov, pričom tento prístup hneď určil i parentálny pôvod daného haplotypu. V určitých rodinách boli ale niektoré polymorfizmy neinformatívne a teda nebolo možné spoľahlivo určiť, ktorú alelu dieťa zdedilo od ktorého rodiča (všetci/ skoro všetci vyšetrení rodinní príslušníci boli buďto homozygotní alebo heterozygotní v sledovanom polymorfizme) a nebolo tak ani možné presne určiť haplotypy.

V druhom prípade sa k určeniu haplotypov využili štatistické metódy odhadu pomocou expektačného algoritmu modifikovaného prístupom „partition ligation“³¹³ a také pomocou Bayesovského teorému³¹⁴. Tento druhý prístup potvrdil správnosť určených haplotypov na základe prvého a zároveň bol schopný dourčiť ďalšie haplotypy v skupinách pacientov i kontrol. Výhodou druhého štatistického prístupu je to, že nie je nutné vyšetřovať rodinných príslušníkov – v tomto prípade ale zase táto metóda nie je schopná potom posúdiť parentálny pôvod haplotypov.

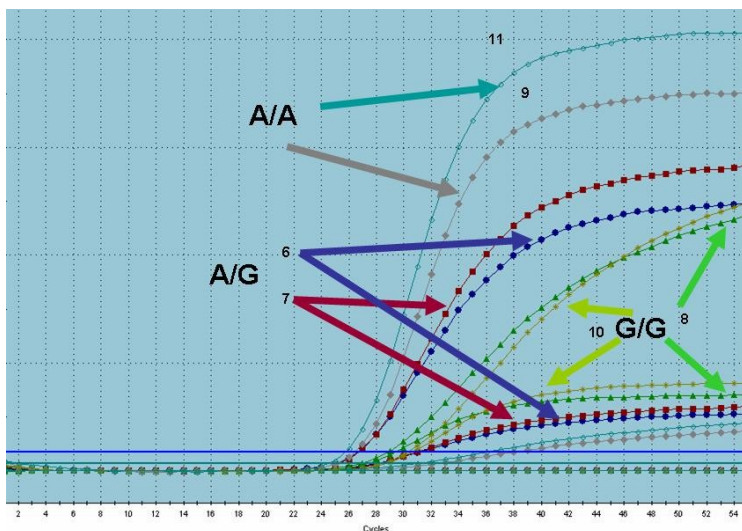
5.4 Štatistika

Pre potreby štatistického vyhodnotenia distribúcie polymorfizmov a potom i haplotypov boli vytvorené tri skupiny – č.1 detskí astmatici, č.2 detskí astmatici spolu s ich rodinnými príslušníkmi a č.3 kontrolná skupina. Zo získaných dát boli v prvom rade určené frekvencie jednotlivých genotypov a aliel pre každý polymorfizmus. Vzájomne sa porovnávali skupina č.1 s č.3 a č.2 s č.3.



Obr. č. 20 Fluorescenčné krivky z real-time PCR z 96 vzoriek, SNP F+1 v *ADAM33*.

Na obrázku je vidieť 3 oddelené zväzky kriviek, ktoré zodpovedajú homozygotom (horný a dolný zväzok) s heterozygotmi medzi nimi.



Obr. č. 21 Vzťah tvaru a veľkosti fluorescenčných kriviek 3UTR SNP4 v *STAT6*. Šípky ukazujú na krivky pre jednotlivé genotypy. A/A homozygoti (vzorky 9 a 11) majú krivku zo sondy FAM vysokú a strmú, ktorá dosahuje fázu plata najrýchlejšie, súčasne má i najnižšie $C_{T\text{ FAM}}$. Krivka z VIC je súčasne najmenšia zo všetkých. A/G heterozygoti (vzorky 6 a 7) majú krivku zo sondy FAM menšiu a menej strmú, než A/A homozygoti, mierne vyššie $C_{T\text{ FAM}}$ a vyššiu, strmšiu krivku zo sondy VIC. Homozygoti G/G (vzorky 8 a 10) majú krivku z VIC najvyššiu, je i najvyššie $C_{T\text{ VIC}}$, a súčasne $C_{T\text{ VIC}}$ je už menšie než $C_{T\text{ FAM}}$. Zároveň je pozorovateľný i nešpecifický FAM signál.

Skupina pacientov bola ďalej delená s ohľadom na klinické údaje / fenotypy choroby a to principiálne do dvoch základných skupín. Prvá skupiny zohľadňovala samotný atopický status. V tejto skupine štatistická analýza využila 2 možné prístupy – hodnotenie hladiny IgE ako spojitého spektra a naopak rozdelenie pacientov do podskupín s atopickou a non-atopickou astmou a to na základe hladiny IgE protilátok. Všetky deti, ktoré mali hladinu IgE vyššiu než 150 IU/ml boli zaradené do podskupiny atopickej astmy. Obidva prístupy sa následne využili pri štatistickej analýze asociácie SNP / haplotypov s hladinou IgE.

Do druhej skupiny boli pacienti zaradovaní na základe výsledku bronchoprovokačných testov – každý, kto reagoval na provokáciu nešpecifickým agens (Histamín a metacholín), bol zaradený do podskupiny „reagoval“, ostatní do skupiny „nereagoval“. Samozrejme toto je základné principiálne delenie. Bronchoprovokačné testy sa vykonávali s 2 látkami, ktoré boli podávané 2 rozličnými spôsobmi. Preto pacienti boli vyberaní 2x podľa toho, či boli provokovaní Histamínom alebo Metacholínom – následne boli prerozdelení na základe toho, či reagovali alebo nie a to 2x podľa spôsobu podania provokujúcej látky (bolusové podanie vs. metóda pokojného dýchania). Podľa koncentrácie podanej látky (tab. č. 2), pri ktorej došlo k prejavom BHR („zareagoval“), sa určoval i stupeň BHR (mierny – stredný – ťažký), pre samotné štatistické vyhodnotenie miery BHR so sledovanými genetickými markérmí boli podskupina stredného a ťažkého stupňa zlúčené do jednej skupiny ťažkého stupňa.

Hardyho – Weinbergova rovnováha v zastúpení frekvencií genotypov skúmaných polymorfizmov bola overená pomocou χ^2 -testu u pacientov i kontrol samostatne. K popisu primárnych dát bola využitá štandardná neparametrická štatistika, napr. absolútna a relatívna frekvencia, medián a rozsah hodnôt vyjadrené 10. – 90. percentilom.

K porovnaniu rozdielov medzi variantmi v kategorických premenných boli aplikované ML- χ^2 test a Fisherov test. IgE ako jediná kvantitatívna premenná v štúdií vykazovala asymetrickú distribúciu log-normálneho typu. Z tohto dôvodu boli dáta logaritmicke transformované, $X_{tr} = \ln(X+1)$ a porovnania skupín (jednocestný ANOVA test, t-test) boli uskutočnené na transformovaných dátach. Transformácia sa ukázala ako efektívna v normalizácii IgE distribúcie (Shapiro – Wilkov test). Hodnoty transformovaných IgE vykazovali homogénne odchýlky v skupinách pacientov a kontrol (Leveneov test). Pri hodnotení rozdielu hladiny IgE medzi viacerými skupinami bol použitý Kruskal – Wallisov test. V prípade štatisticky významného výsledku bolo ďalej aplikované

párové mnohopočetné porovnanie s Bonferroniho korekciou. Konečné posúdenie vzťahu medzi hladinami IgE a haplotypmi bolo vykonané pomocou neparametrického Mann-Whitneyho testu s využitím primárnych dát hladín IgE. Pre štatistické vyhodnotenie bol použitý program IBM® SPSS® Statistics 19. Štatistická analýza získaných dát prebehla v spolupráci i Inštitútom bioštatistiky a analýz Masarykovej univerzity v Brne.

6. Výsledky

6.1 Polymorfizmy STAT6 a ADAM33 a ich vzťah k hladine celkových IgE a k výskytu astmy.

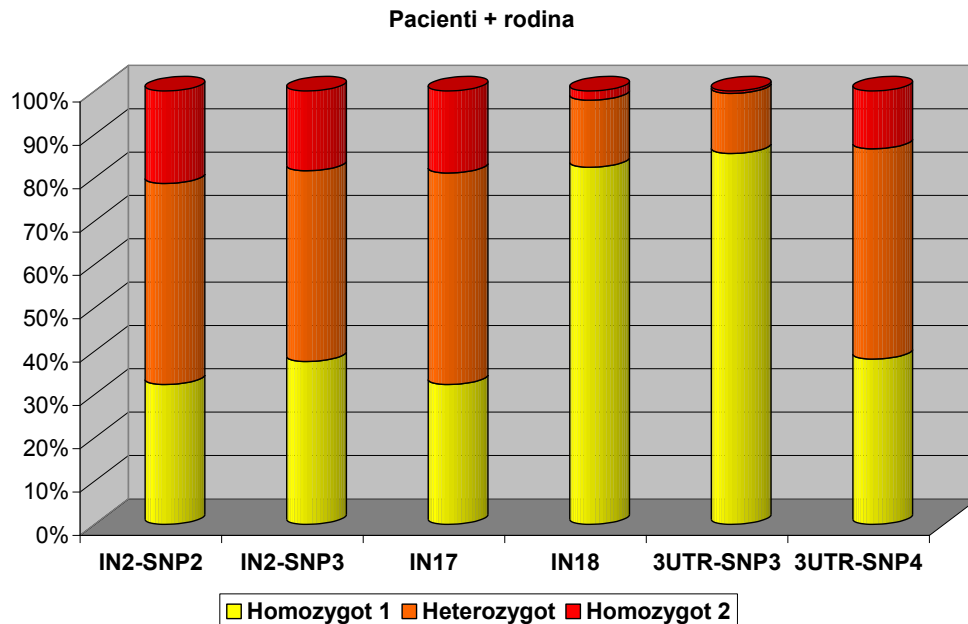
6.1.1 Charakteristika primárnych dát

Genotypizácia sa uskutočnila u všetkých osôb zaradených do štúdie, teda u 109 astmatikov, ich rodičov a súrodencov (celkovo 375 osôb) a v skupine 45 kontrol. Genotypizácia primárne použila celkovo 6 genotypizačných kitov pre SNP v *STAT6* a 13 kitov pre SNP v *ADAM33*. Získané dáta z genotypizácie polymorfizmov T2 a V-1 v *ADAM33* na základe hodnotenia charakteru fluorescenčných kriviek a hodnôt C_T však nesúhlasili s genotypmi získanými pomocou priamej sekvenácie a preto boli tieto polymorfizmy vyradené z ďalšej analýzy. V asociačnej štúdii sa teda pracovalo s celkovo 6 SNP v *STAT6* a s 11 SNP v *ADAM33*. Genotypizácia týchto 18 SNP bola úspešná u všetkých vyšetrených osôb. Pozorované frekvencie genotypov boli v Hardyho – Weinbergovej rovnováhe v skupine pacientov i kontrol (hodnotené pomocou χ^2 -testu, $p > 0,05$).

6.1.2 Asociácia polymorfizmov s hladinou IgE a astmatickým fenotypom

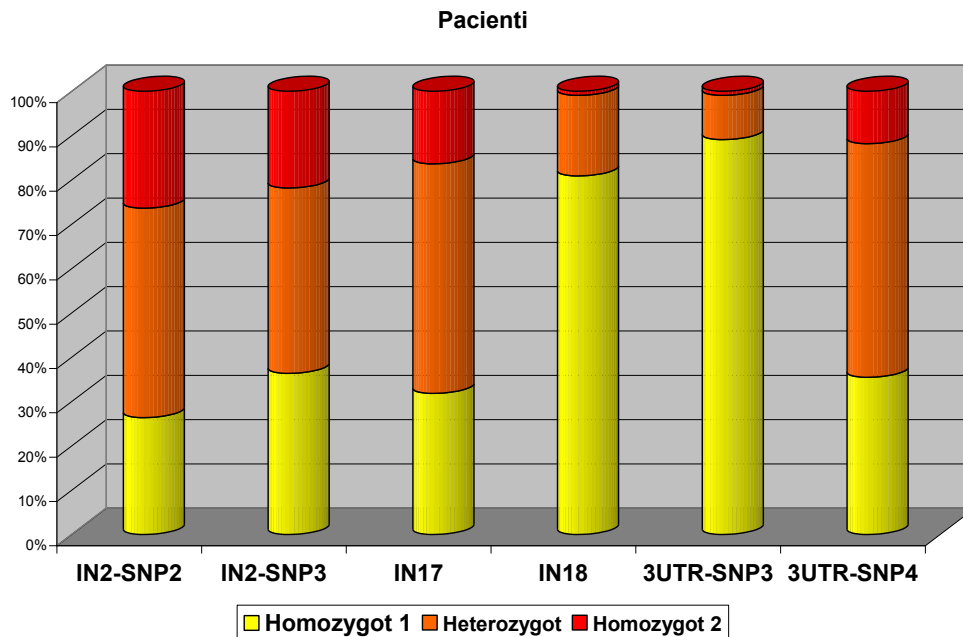
Grafy č. 1 – 6 postupne dokumentujú distribúciu genotypov sledovaných SNP v *STAT6* a *ADAM33* v skupinách rodín (pacienti + príbuzní), pacientov samotných a kontrol, grafy č. 7 a 8 a tabuľky č. 8 a 9 porovnávajú distribúciu majoritných aliel medzi pacientmi a kontrolami. Medzi týmito skupinami boli určité rozdiely vo frekvenciách genotypov a aliel, avšak signifikantný rozdiel v ich distribúcii zistený nebol a preto ich asociácia so sledovanými fenotypmi (astma, BHR, hladina celkových IgE) nebola analyzovaná.

Graf č. 1: Distribúcia genotypov SNP v *STAT6* v skupine rodín s deťmi s astmou (pacienti + príbuzní).



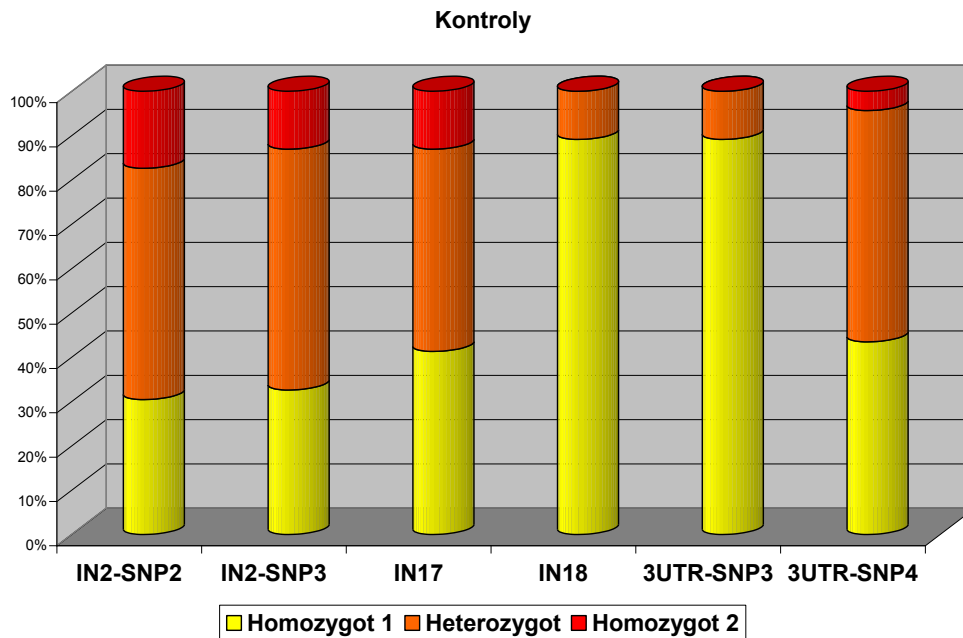
Homozygot 1 je homozygot pre majoritnú alelu, homozygot 2 je homozygotný pre minoritnú alelu.

Graf č. 2: Distribúcia genotypov SNP v *STAT6* v skupine pacientov.



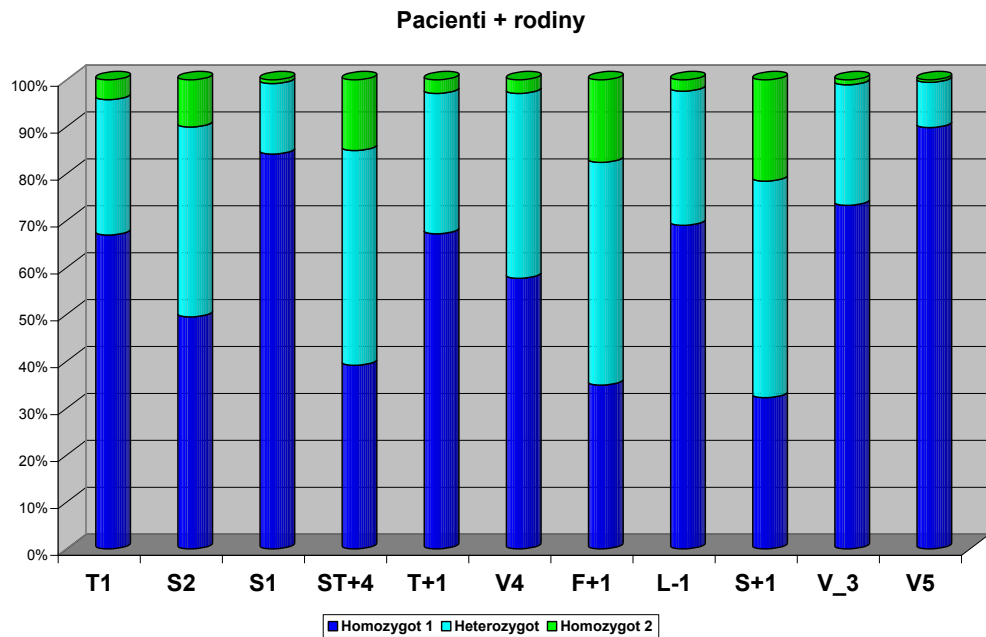
Homozygot 1 je homozygot pre majoritnú alelu, homozygot 2 je homozygotný pre minoritnú alelu.

Graf č. 3: Distribúcia genotypov SNP v *STAT6* v skupine kontrol.



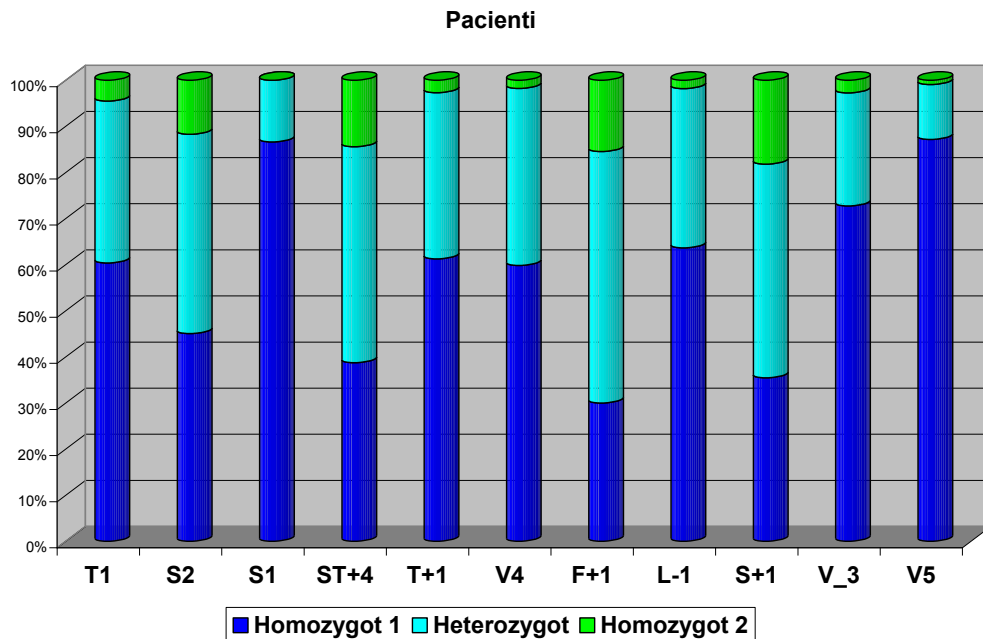
Homozygot 1 je homozygot pre majoritnú alelu, homozygot 2 je homozygotný pre minoritnú alelu.

Graf č. 4: Distribúcia genotypov SNP v *ADAM33* v skupine rodín s deťmi s astmou (pacienti + príbuzní).



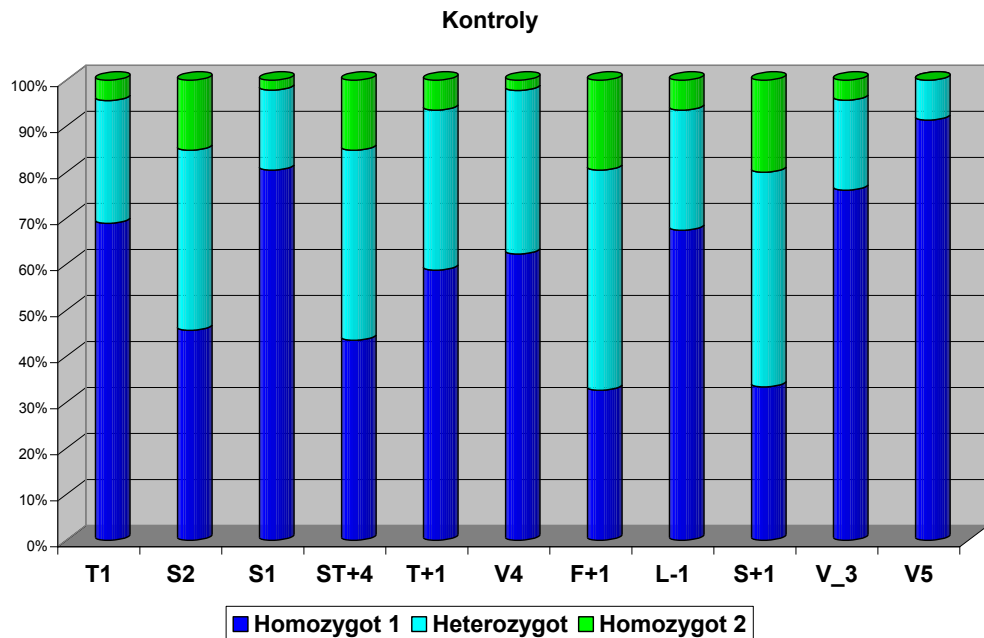
Homozygot 1 je homozygot pre majoritnú alelu, homozygot 2 je homozygotný pre minoritnú alelu.

Graf č. 5: Distribúcia genotypov SNP v *ADAM33* v skupine pacientov.



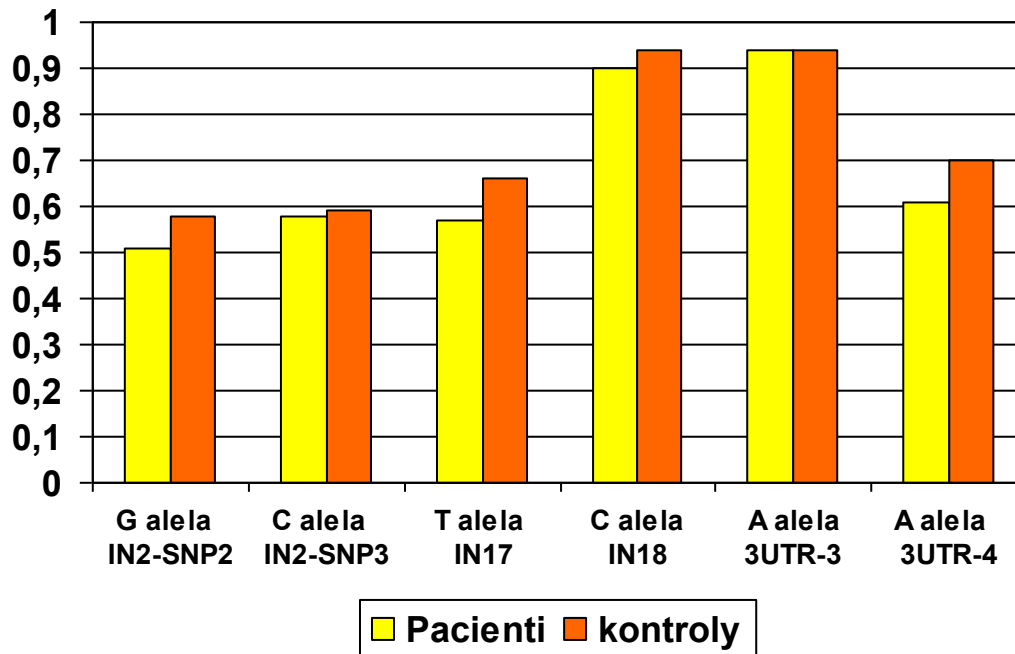
Homozygot 1 je homozygot pre majoritnú alelu, homozygot 2 je homozygotný pre minoritnú alelu.

Graf č. 6: Distribúcia genotypov SNP v *ADAM33* v skupine kontrol.

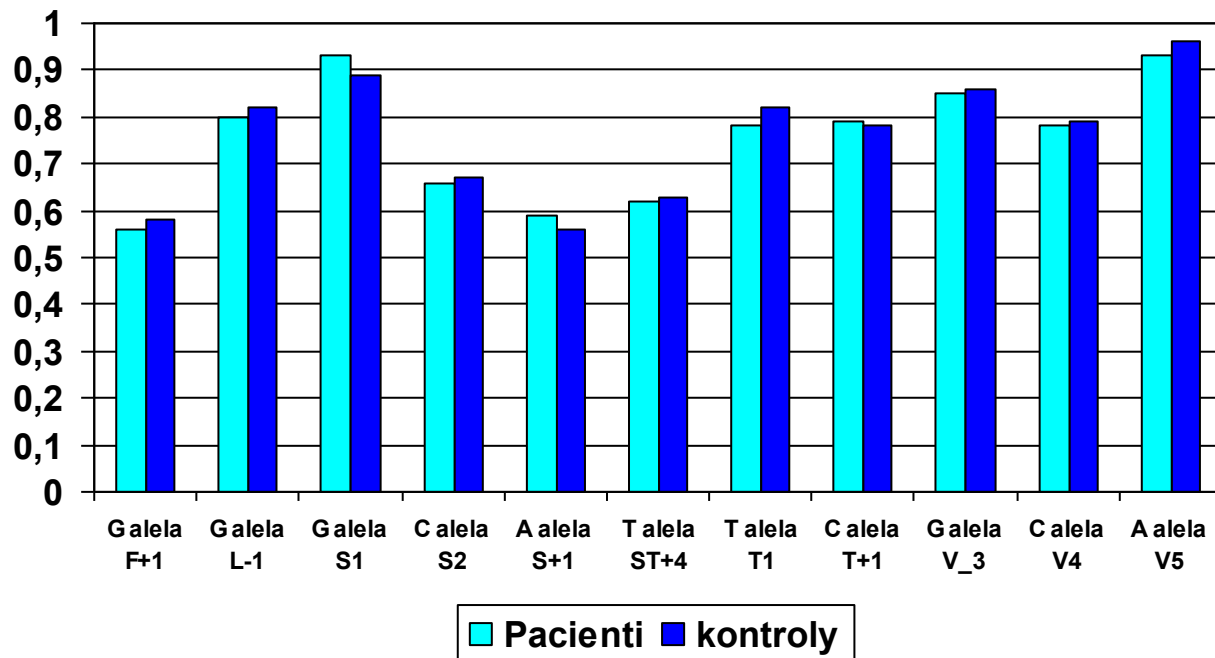


Homozygot 1 je homozygot pre majoritnú alelu, homozygot 2 je homozygotný pre minoritnú alelu.

Graf č. 7: Porovnanie distribúcie majoritných aliél SNP v *STAT6* medzi pacientami a kontrolami.



Graf č. 8: Porovnanie distribúcie majoritných aliel SNP v *ADAM33* medzi pacientmi a kontrolami.



Tabuľka č. 8 Frekvencie genotypov a aleli polymorfizmov v *ADAM33*

Pacienti (N = 109)

SNP / Genotypy	F+1	L-1	S1	S2	S+1	ST+4	T1	T+1	V_3	V4	V5
<i>Hom. 1</i>	0,29	0,63	0,86	0,45	0,37	0,39	0,61	0,62	0,73	0,60	0,87
<i>Heter.</i>	0,53	0,34	0,14	0,42	0,45	0,47	0,35	0,36	0,25	0,38	0,12
<i>Hom. 2</i>	0,17	0,03	0,00	0,13	0,18	0,15	0,05	0,03	0,03	0,03	0,01
Alely	G – A	G – A	G – A	C – G	A – T	T – C	T – C	C – T	G – A	C – G	A – G
<i>Majoritná</i>	0,56	0,80	0,93	0,66	0,59	0,62	0,78	0,79	0,85	0,78	0,93
<i>Minoritná</i>	0,44	0,20	0,07	0,34	0,41	0,38	0,22	0,21	0,15	0,22	0,07

Kontrolná skupina (N = 45)

SNP/ Genotypes	F+1	L-1	S1	S2	S+1	ST+4	T1	T+1	V 3	V4	V5
<i>Hom. 1</i>	0,33	0,69	0,80	0,47	0,31	0,42	0,69	0,60	0,76	0,60	0,91
<i>Heter.</i>	0,49	0,27	0,18	0,40	0,49	0,42	0,27	0,36	0,20	0,38	0,09
<i>Hom. 2</i>	0,18	0,04	0,02	0,13	0,20	0,16	0,04	0,04	0,04	0,02	0,00
Alely	G – A	G – A	G – A	C – G	A – T	T – C	T – C	C – T	G – A	C – G	A – G
<i>Majoritná</i>	0,58	0,82	0,89	0,67	0,56	0,63	0,82	0,78	0,86	0,79	0,96
<i>Minoritná</i>	0,42	0,18	0,11	0,33	0,44	0,37	0,18	0,22	0,14	0,21	0,04

Vysvetlivky: Hom. 1- homozygot pre majoritnú alelu, Heter. – heterozygot, Hom. 2 – homozygot pre minoritnú alelu.

Tabuľka č. 9 Frekvencie genotypov a alel polymorfizmov v *STAT6*

Pacienti (N = 109)

SNP / Genotypy	IN2-SNP2	IN2-SNP3	IN17 SNP1	IN18 SNP1	3UTR-SNP3	3UTR-SNP4
<i>Hom. 1</i>	0,28	0,37	0,30	0,81	0,88	0,34
<i>Heter.</i>	0,48	0,42	0,53	0,18	0,11	0,54
<i>Hom. 2</i>	0,25	0,21	0,17	0,01	0,01	0,12
Alely	G – A	C – T	T – C	C – T	A – G	A – G
<i>Majoritná</i>	0,51	0,58	0,57	0,90	0,94	0,61
<i>Minoritná</i>	0,49	0,42	0,43	0,10	0,06	0,39

Kontrolná skupina (N = 45)

SNP/ Genotypy	IN2-SNP2	IN2-SNP3	IN17 SNP1	IN18 SNP1	3UTR-SNP3	3UTR-SNP4
<i>Hom. 1</i>	0,31	0,31	0,42	0,89	0,89	0,44
<i>Heter.</i>	0,53	0,56	0,47	0,11	0,11	0,51
<i>Hom. 2</i>	0,16	0,13	0,11	0,00	0,00	0,04
Alely	G – A	C – T	T – C	C – T	A – G	A – G
<i>Majoritná</i>	0,58	0,59	0,66	0,94	0,94	0,70
<i>Minoritná</i>	0,42	0,41	0,34	0,06	0,06	0,30

Vysvetlivky: Hom. 1- homozygot pre majoritnú alelu, Heter. – heterozygot, Hom. 2 – homozygot pre minoritnú alelu.

6.2 Asociácia haplotypov s hladinou IgE

6.2.1 Distribúcia haplotypov v skúmaných skupinách

Z určených genotypov sledovaných SNP v *STAT6* a *ADAM33* boli zostavené haplotypy u pacientov, príbuzných a kontrol. Haplotypy zostavené na základe znalosti genotypov SNP príbuzných, boli doplnené o haplotypy dourčené pomocou štatistických metód (EM algoritmus a Bayesovský teorém). V skupine astmatikov tak úspešnosť haplotypizácie bola 65,1% (N = 71) pre SNP v *ADAM33* a 77,1% (N = 84) v prípade polymorfizmov *STAT6*. Úspešnosť určenia haplotypov v skupine kontrol bola v prípade *ADAM33* 22,2% a 24,4% v prípade *STAT6*.

Každý z týchto dvoch génov mal 3 najčastejšie haplotypy, ktoré boli označené ako a1-a3 pre *ADAM33* a s1-s3 pre *STAT6* a to zostupne podľa ich frekvencie zastúpenia v skupine pacientov. Frekvencia týchto najčastejších haplotypov v skupine pacientov však nebola významne odlišná od ich frekvencií v kontrolnej skupine (tabuľka 10). Samostatná analýza ďalších minoritných haplotypov nebola možná, avšak ich celkový spoločný mierny vplyv na výskyt astmy nemohol byť vylúčený.

Ďalšia analýza sa zamerala na asociáciu jednotlivých najčastejších haplotypov s hladinou IgE, pričom štatistická analýza pracovala primárne so spojitým súborom hladín IgE.

6.2.2 Haplotypy *STAT6* a hladina celkových IgE

Všetky tri najčastejšie haplotypy (s1-s3) vykazovali vplyv na hladiny celkových IgE. Jednoznačnú a súčasne signifikantnú väzbu k zvýšeným hladinám celkových IgE v súbore pacientov prejavoval haplotyp s1 (Obr. 22). Medián celkovej hladiny IgE haplotypu s1 v skupine pacientov bol 455 IU/ml, $p < 0,001$ (tabuľka č. 11). Štatisticky významná asociácia bola zistená taktiež i pri analýze jednotlivých pacientov, ktorí mali aspoň jeden haplotyp s1 ($p = 0,012$). Zaujímavým bol vzťah haplotypu s3 k hladine IgE, ktorý prejavoval väzbu k fyziologickým hladinám ($p = 0,008$).

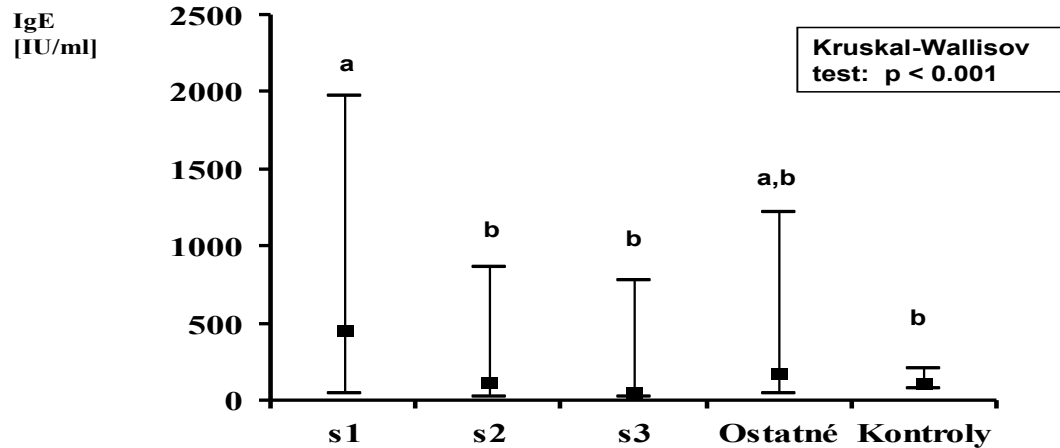
Tabuľka č. 10. Frekvencie určených haplotypov v *STAT6* a *ADAM33* v skupinách pacientov a kontrol.

		Haplotyp		Pacienti [%]	Kontroly [%]	p
ADAM33	140 haplotypov u pacientov	11112111111	a1	27,1	30	0,792
		11111211111	a2	22,9	25	0,783
		22121122111	a3	16,4	10	0,742
	20 haplotypov u kontrol	11111211121		8,6	15	0,405
		21111211111		6,4	10	0,63
STAT6	168 haplotypov pacientov	221111	s1	39,9	50	0,368
		112112	s2	27,4	9,1	0,071
	22 haplotypov u kontrol	111111	s3	11,9	4,5	0,477
		212212		4,8	0	0,6

<i>ADAM33</i>	<i>STAT6</i>
1 - G, 2 - A	1-G, 2-A
1 - G, 2 - A	1-C, 2-T
1 - G, 2 - A	1-C, 2-T
1 - C, 2 - G	1-C, 2-T
1 - A, 2 - T	1-G, 2-A
1 - A, 2 - C	1-G, 2-A
1 - T, 2 - C	
1 - C, 2 - T	
1 - G, 2 - A	
1 - C, 2 - G	
1 - A, 2 - G	

Haplotypy sú vytvorené z polymorfizmov v poradí F+1, L_1, S1, S2, S+1, ST+4, T1, T+1, V_3, V4 a V5 v prípade *ADAM33* a IN2-2, IN2-3, IN17, IN18, 3'UTR-3, 3'UTR-4 v prípade *STAT6*. Na boku vpravo umiestnená legenda podáva vysvetlenie numerického kódu pre haplotypy, 1 vždy označuje majoritnú alelu, 2 tak potom minoritnú.

Haplotypová analýza (N=190 haplotypov)



Obr. č. 22 Vzťah haplotypov *STAT6* k hladinám celkových IgE. Haplotyp s1 v *STAT6* má signifikantnú väzbu k zvýšeným hladinám celkových IgE, v porovnaní k ostatným haplotypom u astmatikov i v porovnaní s kontrolnou skupinou. Skupiny označené rovnakým písmenkom nie sú vzájomne štatisticky odlišné. Spojnicový graf znázorňuje medián a 10.-90. percentil hladín celkového IgE. Skupiny označené rovnakým písmenom nie sú vzájomne významne rozdielne.

Tabuľka č.11 Hladiny celkových IgE u pacientov v závislosti od haplotypov a ich parentálneho pôvodu.

IgE [IU/ml]	Haplotypový celkovo (N=190 haplotypov)	HG	Paternálne haplotypy (N=95 osôb)	HG	Maternálne haplotypy (N=95 osôb)	HG
s1	35,3%; 455 (46; 1970)	a	35,8%; 618 (93; 1970)	a	34,7%; 336 (45; 1970)	a
s2	24,2%; 116 (19; 860)	b	27,4%; 116 (19; 860)	b	21,1%; 133 (19; 871)	a
s3	10,5%; 54 (18; 779)	b	10,5%; 54 (18; 733)	b	10,5%; 71 (18; 789)	a
Ostatné	18,4%; 177 (38; 1220)	a, b	14,7%; 127 (38; 1220)	a, b	22,1%; 298 (72; 1220)	a
Kontroly	11,6%; 107 (73; 205)	b	11,6%; 107 (73; 205)	b	11,6%; 107 (73; 205)	a
Hodnota p	<0,001		<0,001		0,047	

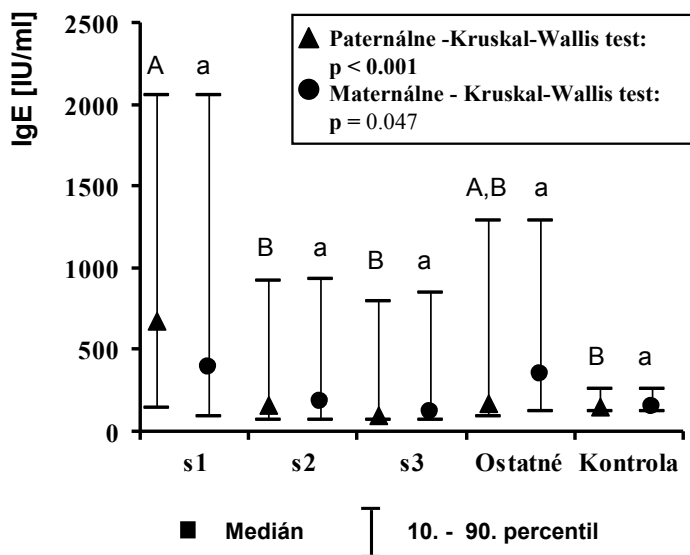
Hladina IgE [IU/ml]	Aspoň jeden s1 (N=95)	HG	Aspoň jeden s3 (N=95)	HG
s1	52,6%; 349 (42; 1580)	a	–	–
s3	–	–	18,9%; 72 (18; 1130)	a
Ostatné	35,8%; 116 (19; 1130)	b	69,5%; 284 (26; 1490)	b
Kontroly	11,6%; 107 (73; 205)	a, b	11,6%; 107 (73; 205)	a, b
Hodnota p	0,012		0,008	

Tabuľka sumarizuje hladiny celkových IgE u 95 osôb (spoločne pacienti a kontroly s úspešne určenými haplotypmi). Pre každý haplotyp je uvedené percentuálne zastúpenie z počtu 95 osôb. Hladina IgE je vyjadrená pomocou mediánu, v zátvorke sú hodnoty 10. – 90. percentilu. Skupiny (HG) označené rovnakým písmenom nie sú významne rozdielne (podrobnosti sú v texte). Nakoľko nebol rozdiel v distribúcii haplotypov v porovnaní s astmatikmi, tak kontroly boli analyzované ako celok, bez zohľadnenia konkrétneho haplotypu.

6.2.2.1 Parentálny pôvod haplotypu a hladina celkových IgE

Pri výskyte atopie bol pozorovaný rozdielny vplyv pohlavia rodičov, pričom s atopiou boli spojené alely zdedené od matky^{17, 85-87}. V súbore vyšetovaných pacientov bol preto analyzovaný i potenciálne rozličný vplyv konkrétneho haplotypu v závislosti od jeho parentálneho pôvodu (zdedený maternálne vs. paternálne).

Pri zohľadnení rodičovského pôvodu, boli nájdené určité rozdiely v hladinách IgE (súbor spojených hladín IgE) pre haplotypy s1-s3. Štatisticky významný rozdiel bol zistený pre haplotyp s1 zdedený paternálne (Obr. 23), medián celkových IgE bol 618 IU/ml v skupine pacientov vs. 107 IU/ml v skupine kontrol, $p < 0,001$ (Tabuľka 11).



Obr. 23 Vplyv rodičovského pôvodu haplotypov *STAT6* na hladinu IgE. Obrázok dokumentuje významný vplyv haplotypu s1 zdedeného od otca (paternálny pôvod) na zvýšenie hladiny celkových IgE.

6.2.2.2 Pohlavie a hladina celkových IgE

Alergické ochorenia sa častejšie vyskytujú u chlapcov, hlavne v prípade astmy, pričom v puberte dochádza k zmene vo výskyte, tieto ochorenia sú potom častejšie pozorované u žien. V sledovanom súbore preto bola uskutočnená analýza väzby haplotypu s1 k hladine IgE v závislosti na pohlaví pacientov. Väzba tohto haplotypu k hladine IgE bola významná u oboch pohlaví, avšak oveľa výraznejšia je v prípade mužského pohlavia, $p = 0,009$ (Tabuľka 12).

Ďalej bol analyzovaný znovu i rodičovský pôvod s1 haplotypu medzi chlapcami a dievčatami. V tomto prípade bola znovu zistená výrazne signifikantná väzba paternálneho haplotypu s1 k hladine celkových IgE u chlapcov ($p = 0,002$). U dievčat bola zistená len hraničná asociácia (Tabuľka 12). Maternálny s1 haplotyp však nevykazoval signifikantne častejší výskyt u osôb so zvýšenou hladinou celkových IgE celkovo, ani pri rozdelení do skupín podľa pohlavia. V prípade tejto analýzy pri rozdelení i podľa pohlavia sa jednalo o skupiny s malým množstvom pacientom, a tak nie je možné vylúčiť chybu malých čísiel.

6.2.2.3 Haplotypy STAT6 a ich väzba na kategorizovanou hladinu IgE

Hladina celkových IgE je za normálnych okolností nízka, stúpa u atopických osôb. Väzba haplotypov STAT6 bola analyzovaná i ku kategorizovanej hladine IgE – hranica cut off bola zvolená na 200 IU/ml. I analýzou pacientov s hladinou IgE nad 200 IU/ml bola nájdená väzba s1 haplotypu k hladine IgE. Súčasne sa tiež potvrdil vplyv parentálneho pôvodu - 73,5% pacientov s IgE nad 200 IU/ml mali paternálny s1 haplotyp ($p < 0,01$) a 57,6% pacientov mali tento haplotyp zdedený od matky (hraničná väzba $p = 0,08$).

Tabuľka 12 Vzťah parentálneho pôvodu s1 haplotypu na hladinu celkových IgE.

	Hladina IgE [IU/ml]	Haplotypová analýza (N=120 haplotypy)	HG	Paternálne haplotypy (N=30 osôb)	HG	Maternálne haplotypy (N=30 osôb)	H G
Chlapci (N=60)	s1	41,7%; 381 (42; 1970)	a	41,7%; 484 (81; 1970)	a	41,7%; 123 (26; 1970)	a
	s2	25,8%; 116 (34; 829)	a, b	30,0%; 116 (26; 913)	a, b	21,7%; 116 (38; 829)	a
	s3	10,8%; 39 (19; 428)	b	10,0%; 46 (19; 336)	b	11,7%; 39 (18; 1150)	a
	Ostatné	21,7%; 157 (45; 1220)	a, b	18,3%; 67 (38; 477)	b	25,0%; 319 (94; 1220)	a
	Hodnota p	0,009		0,002		0,139	
		(N=48 haplotypy)		(N=24 osôb)		(N=24 osôb)	
Dievčatá (N=24)	s1	35,4%; 812 (102; 2800)	a	37,5%; 812 (102; 2800)	a	33,3%; 695 (54; 2800)	a
	s2	31,3%; 177 (18; 860)	b	33,3%; 121 (18; 860)	a	29,2%; 177 (18; 1130)	a
	s3	14,6%; 89 (18; 1130)	a, b	16,7%; 72 (18; 1130)	a	12,5%; 102 (18; 360)	a
	Ostatné	18,8%; 298 (19; 2060)	a, b	12,5%; 530 (177; 2060)	a	25,0%; 260 (19; 2060)	a
	Hodnota p	0,011		0,044		0,279	

Väzba s1 haplotypu k hladine celkových IgE je analyzovaná zvlášť u dievčat i chlapcov a zároveň je zohľadnený i rodičovský pôvod tohto haplotypu. Signifikantná asociácia je zvýraznená tučným písmom. Heterogénne skupiny (HG) označené rovnakým písmenom nevykazujú medzi sebou štatisticky významný rozdiel.

Tabuľka 13. Vzťah haplotypov v *ADAM33* k hladine celkových IgE.

Hladina gE [IU/ml]	Haplotypová analýza (N=160 haplotypy)	Paternálne haplotypy (N=80 osôb)	Maternálne haplotypy (N=80 osôb)
a1	23,8%; 136 (19; 966)	21,3%; 149 (19; 966)	26,3%; 123 (19; 966)
a2	20,0%; 231 (34; 1150)	17,5%; 430 (46; 2450)	22,5%; 167 (18; 1130)
a3	14,4%; 157 (45; 860)	18,8%; 172 (45; 860)	10,0%; 137 (18; 1150)
Ostatné	29,4%; 290 (21; 1970)	30,0%; 183 (18; 1210)	28,8%; 319 (38; 2060)
Kontroly	12,5%; 101 (69; 273)	12,5%; 101 (69; 273)	12,5%; 101 (69; 273)
Hodnota p	0,114	0,209	0,232

Tabuľka sumarizuje rozloženie hladín IgE (spojitý súbor, analýza pacientov a kontrol dohromady) vyšetrovaných osôb s plne určeným haplotypom. Je tu uvedené percentuálne zastúpenie osôb s daným haplotypom celej skupiny 80 osôb / 160 haplotypov, jedná sa o pacientov a kontroly dohromady (osoby s určeným haplotypom). Ďalší údaj predstavuje medián hladín IgE a v zátvorkách sú hladiny IgE reprezentujúce 10. a 90. percentil hodnôt IgE. Hodnota štatistickej významnosti p bola určená pomocou Kruskal – Wallisovho testu.

6.2.3 Haplotypy *ADAM33* a hladina celkových IgE

Vzťah haplotypov *ADAM33* k hladine IgE bol taktiež analyzovaný a tieto haplotypy vykazovali určitý trend k väzbe na hladinu IgE. Výraznejší vplyv bol pozorovaný pre haplotyp a2, avšak nedosiahol štatistickej významnosti (Tabuľka 13).

6.3 Asociácia haplotypov s úrovňou BHR

Bronchoprovokačné testy s histamínom boli vykonané u všetkých 109 detí zaradených do štúdie. Kompletné vyšetrenie týmito testami s histamínom a súčasne i metacholínom podstúpilo len 99 týchto detí. Pozitívnu odpoveďou na provokáciu bol pokles FEV1 pod 20% z vstupnej hodnoty – tzv. parameter PC 20 a pacienti boli rozdelení do skupiny s ľahkou a ťažkou BHR.

6.3.1 Haplotypy *ADAM33* a bronchoprovokácie s histamínom

Analýza odpovedí pri bronchoprovokácii metódou bolusového podania odhalila významnú väzbu haplotypu a3 k BHR ($p = 0,013$), ale len v prípade haplotypu paternálneho pôvodu. Pre haplotyp maternálneho pôvodu nebola zistená významná väzba. Distribúcia s3 haplotypu medzi pacientami a kontrolami však nebola so významným rozdielom (Tab. 14). Haplotyp a2, ktorý vykazoval určitú tendenciu k väzbe (i keď nesignifikantnú) na IgE, však nebol v žiadnej väzbe k BHR, nebol pozorovaný ani rozdiel v jeho distribúcii v závislosti od jeho parentálneho pôvodu.

Bronchoprovokácie s metódou pokojného dýchania dopadli podobne, bola zistená významná väzba s3 k BHR ($p < 0,01$) a znovu táto väzba bola významná len v prípade haplotypu preneseného paternálne (Obr. 24).

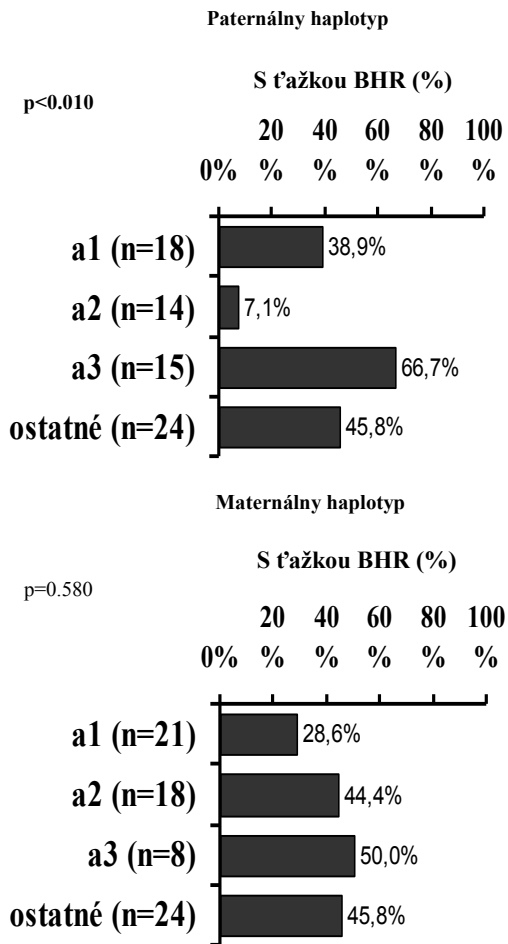
6.3.2 Haplotypy *ADAM33* a bronchoprovokácie s metacholínom

Hodnotené boli výsledky získané pomocou oboch metód provokácie (metóda pokojného dýchania vs. bolusové podanie), avšak haplotypy *ADAM33* nevykazovali žiadnu väzbu na výsledky bronchoprovokácie metacholínom (tab. 15, obr. 25).

Tabuľka 14. Haplotypy ADAM33 vo vzťahu k BHR vyšetrenéj metódou bolusového podania histamínu

Paternálne haplotypy		Maternálne haplotypy		Porovnanie frekvencií maternálnych a paternálnych haplotypov pri ťažkej BHR:
Haplotypy	Ťažká BHR	Haplotypy	Ťažká BHR	
a1 (n = 18)	66,7 % (12) ^a	a1 (n = 21)	61,9 % (13)	p = 0,757
a2 (n = 14)	64,3 % (9) ^a	a2 (n = 18)	66,7 % (12)	p = 0,888
a3 (n = 15)	86,7 % (13) ^b	a3 (n = 8)	75,0 % (6)	p = 0,482
ostatné (n = 24)	91,7 % (22) ^b	ostatné (n = 24)	83,3 % (20)	p = 0,383
Rozdiely vo frekvenciách haplotypov: p = 0,013		Rozdiely frekvenciách týchto haplotypov: p = 0,412		

Porovnanie výskytu haplotypov ADAM33 vo vzťahu k ťažkej BHR je znázornené zvlášť pre paternálny a zvlášť pre maternálny haplotyp. V poslednom stĺpci je analyzovaný i rozdiel medzi maternálnym a paternálnym haplotypom. Skupiny označené rovnakým písmenkom (horný index „a“ a „b“) nevykazovali medzi sebou štatisticky významný rozdiel v distribúcii. Hodnota p bola kalkulovaná pomocou ML- χ^2 testu.



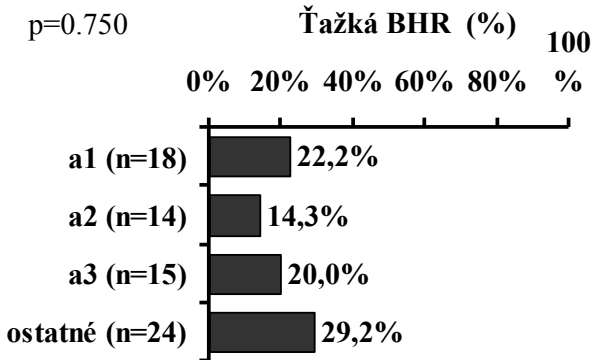
Obr. 24 Vzťah haplotypov *ADAM33* k BHR po podaní histamínu. Histamín bol aplikovaný metódou pokojného dýchania. Rozdiely medzi haplotypmi boli analyzované pomocou χ^2 testu s maximálnou vierohodnosťou.

Tabuľka 15. Haplotypy ADAM33 vo vzťahu k BHR vyšetrenéj metódou bolusového podania metacholínu

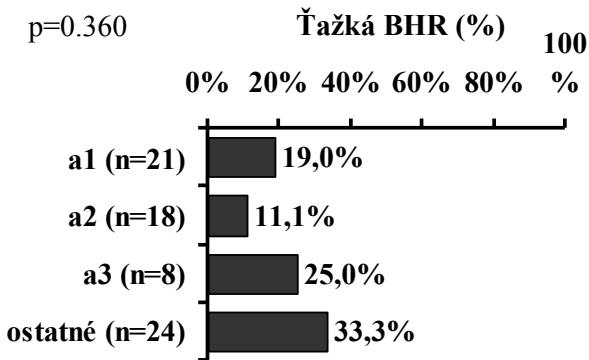
Paternálne haplotypy		Maternálne haplotypy		Porovnanie frekvencií maternálnych a paternálnych haplotypov pri ťažkej BHR:
Haplotypes	Ťažká BHR	Haplotypes	Ťažká BHR	
a1 (n = 18)	55,6 % (10)	a1 (n = 21)	57,1 % (12)	p = 0,921
a2 (n = 14)	57,1 % (8)	a2 (n = 18)	55,6 % (10)	p = 0,928
a3 (n = 15)	73,3 % (11)	a3 (n = 8)	37,5 % (3)	p = 0,046
ostatné (n = 24)	54,2 % (13)	ostatné (n = 24)	66,7 % (16)	p = 0,376
Rozdiely vo frekvenciách paternálnych haplotypov: p = 0,658		Rozdiely vo frekvenciách maternal haplotypov: p = 0,539		

Porovnanie výskytu haplotypov ADAM33 vo vzťahu k ťažkej BHR je znázornené zvlášť pre paternálny a zvlášť pre maternálny haplotyp. V poslednom stĺpci je analyzovaný i rozdiel medzi maternálnym a paternálnym haplotypom. Hodnota p bola kalkulovaná pomocou ML- χ^2 testu

Paternálny haplotyp



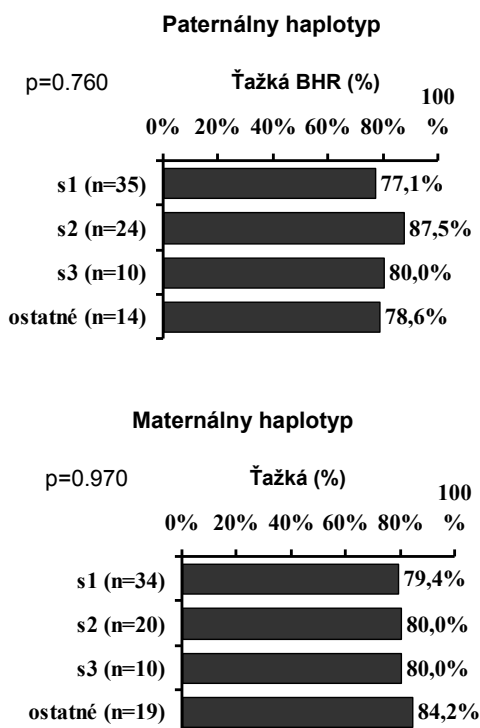
Maternálny haplotyp



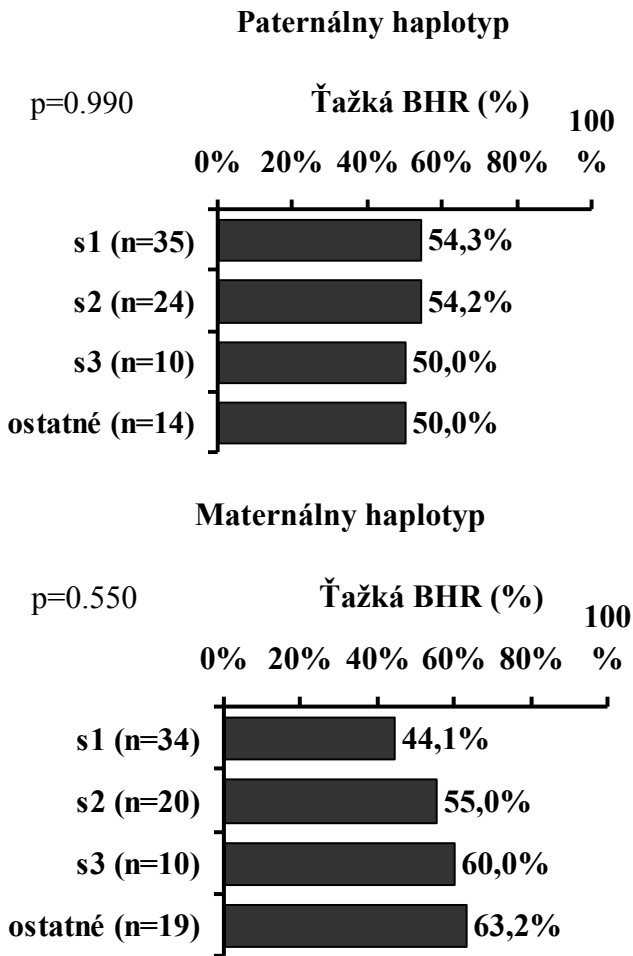
Obr. 25 Vzťah haplotypov ADAM33 k BHR po podaní metacholínu metódou pokojného dýchania. Rozdiely medzi haplotypmi boli analyzované pomocou χ^2 testu s maximálnou vierohodnosťou.

6.3.3 Vzťah haplotypov *STAT6* k BHR

Analýza vzťahu haplotypov *STAT6* použila rovnaký prístup, tak ako v prípade *ADAM33* – analyzovali sa výsledky provokácií histamínom i metacholínom, pričom zakaždým sa použili oba spôsoby podávania týchto látok. Haplotypy *STAT6* však nemali žiaden vzťah k úrovni BHR, bez ohľadu na podanú látku či spôsob jej podania a ani pri delení podľa parentálneho pôvodu haplotypov (viď Obr. 26 a 27, v prípade bolusového podávania).



Obr. 26 Vzťah haplotypov *STAT6* k BHR po bolusovom podaní histamínu. Rozdiely medzi haplotypmi boli analyzované pomocou χ^2 testu s maximálnou vierohodnosťou.



Obr. 27 Vzťah haplotypov *STAT6* k BHR po bolusovom podaní metacholínu. Rozdiely medzi haplotypmi boli analyzované pomocou χ^2 testu s maximálnou vierohodnosťou.

7. Diskusia

Od čias prvej asociácie chromozómovej oblasti 12q s výskytom astmy alebo nadprodukciou IgE^{185,186,315} bola tejto oblasti venovaná značná pozornosť a prebehlo viacero štúdií zameraných na asociáciu polymorfizmov kandidátnych génov v danej oblasti záujmu, a to i v rôznych populáciách³¹⁶, pričom najvýznamnejším z týchto génov sa javí *STAT6*. Tento gén patrí do skupiny génov, ktorých asociácia s hladinou IgE či astmou bola replikovaná v 6 – 10 štúdiách²¹⁷. Doposiaľ prebehlo niekoľko asociačných štúdií, ktoré poukázali na spojitosť niektorých polymorfizmov a haplotypov *STAT6* s astmou alebo zo zvýšenou hladinou celkového IgE. Nagarkatti a spol. identifikovali CA repetičný polymorfizmus v promótorovej oblasti *STAT6* – označený ako R1²⁶⁹. Tento polymorfizmus je cca 1,2 kb vzdialený od ďalšieho CA repetičného polymorfizmu - tzv. R3, ktorý je umiestnený v prvom exóne *STAT6*. Tieto 2 polymorfizmy a aj ich haplotypy 16_15 a 17_15 (v poradí R1_R3) asociovali s atopickou astmou a hladinou celkových IgE. Leung a spol.²⁷⁴ skúmali komplexný vplyv šiestich kandidátnych génov na výskyt astmy, medzi inými i *STAT6*. Posudzovali vplyv polymorfizmov T1309C (rs841718) a C1570T (rs3024974) v 17. a 18. exóne na funkčné parametre pľúc, pričom zistili, že polymorfizmus C1570T významne ovplyvňuje pokles FEV₁ (spirometrické merania prebehli v ročných odstupoch). V predchádzajúcej štúdií týchto autorov však tento polymorfizmus, umiestnený približne v polovici 18. intrónu, nebol asociovaný s hladinou celkového IgE v čínskej populácii²⁷⁵. V kaukazskej populácii bol však naopak popísaný významný vplyv tohto polymorfizmu na hladinu IgE²⁶⁷.

Jedným z cieľov tejto dizertačnej práce bolo posúdiť asociáciu šiestich polymorfizmov (SNP) v *STAT6* s hladinou celkových IgE a astmou, pričom všetky tieto SNP boli lokalizované v intrónoch alebo v UTR oblastiach tohto génu. Pri porovnaní

frekvencií výskytu jednotlivých polymorfizmov s výskytom astmy alebo hladiny celkového IgE (hodnota cut off 200 mg/ml), sa niektoré SNP u detských astmatikov vyskytovali relatívne častejšie (napr. In2-SNP3), avšak rozdiel nedosiahol štatisticky významnú hladinu. Tento výsledok nebol až tak úplne prekvapivý a neočakávaný, nakoľko niekoľko z týchto SNP (napr. In2-SNP3, In17, In18, 3UTR-SNP4) bolo v niektorých štúdiách asociované s elevovanou hladinou IgE^{267,270,317} a v iných zase nie^{270,272}. Tento rozdiel by sa dal vysvetľovať rozdielnym počtom osôb (pacientov) zahrnutých do štúdie avšak medzinárodné štúdie pracujúce so súbormi osôb – astmatikov majúcih rozsah stoviek až tisícok osôb (štúdie zamerané na kaukazskú populáciu), často nenašli štatisticky významné rozdiely^{272,317}. Toto naznačuje skôr na individuálne rozdiely v distribúcii genotypov SNP vo vnútri jednotlivých skúmaných populácií. Do štúdie bolo zapojených 109 detí s diagnózou asthma bronchiale a 45 kontrol. Tieto počty by sa mohli zdať malé, ale aj napriek tomu boli dostačujúce pre štatistické zhodnotenie, tak ako to bolo aj v prípade niektorých iných európskych výskumných projektoch zaoberajúcich sa asociáciou polymorfizmov v *STAT6* s výskytom astmy alebo hladiny IgE^{267,271}. Ba čo viac frekvencie genotypizovaných SNP spoločných pre našu štúdiu i pre niekoľko nemeckých štúdií (In2-SNP3, In18 a 3UTR SNP4) boli porovnateľné, rozdiely v alelických frekvenciách boli maximálne do 5%(ref. ^{267,271}), a alelické frekvencie boli porovnateľné i so štúdiami na skupinách veľkosti cca 1500 osôb²⁷⁰.

Každý polymorfizmus môže prispievať malým efektom, preto bola v nasledujúcom kroku uskutočnená haplotypová analýza. Frekvencie jednotlivých haplotypov u pacientov i kontrol sumarizuje tabuľka č. 11. Haplotyp označený ako s1 je signifikantne viazaný na elevovanú hladinu IgE – pri kombinovanej analýze vždy dvoch haplotypov (u vyšetovaných probandov) bolo zistené, že už len pri prítomnosti jedného haplotypu s1 má sledovaný pacient významne vyššie hladiny celkového IgE. Pre možnosť porovnania s výsledkami už publikovaných prác bola potom pozornosť zameraná len na

polymorfizmy, ktoré boli vyšetované súčasne v našej štúdií i v zahraničných - nemeckých štúdiách (In2-SNP3, In18, 3UTR SNP4). Z polymorfizmov spoločných pre porovnávané štúdie boli znovu zostavené („očistené“) haplotypy, podľa ich frekvencie v sledovanom súbore pacientov boli najčastejšie z nich označené znovu s1 – s3 (na základe sekvencie v skúmaných SNP, v podstate odpovedali pôvodné haplotypy novým) a porovnané so znovu zostavenými (rovnakou metódou) literárnymi haplotypmi. Týmto porovnaním bolo zistené, že nie len frekvencie jednotlivých SNP, ale dokonca aj frekvencie odpovedajúcich najčastejších haplotypov boli veľmi podobné (Tabuľka 16). Toto pozorovanie je zaujímavé aj z toho hľadiska, že sa jedná o dve rozdielne populácie (česká vs. nemecká). Naše haplotypy s1, s2 a s3 teda odpovedali (pri uvažovaní len troch vyššie spomenutých SNP v haplotypoch) frekvenciám haplotypov 1, 5 a 4 v správe od Weidingera a spol.²⁷¹ a haplotypom 1, 3 a 2 z reportu Duetschové a spol.²⁶⁷ Pri porovnaní výsledkov výskumu v českej populácii s výsledkami Duetschové a spol.²⁶⁷ došlo k jednej výnimke a síce, že ich najčastejší haplotyp (č.1) mal na poslednom mieste (polymorfizmus 3UTR SNP4) uvedenú alelu G, zatiaľ čo najčastejší haplotyp uvádzaný v tejto dizertačnej práci (i haplotyp v práci Weidingera a spol.²⁷¹) má alelu A. Pretože v týchto dvoch citovaných prác sa v podstate jedná o rovnakú populáciu a i uvádzané alelové frekvencie v týchto štúdiách sú veľmi podobné, jedná sa pravdepodobne len o „preklep“ v zápise alely polymorfizmu 3UTR SNP4.

Pri zahrnutí len týchto troch SNP do haplotypov vyšli podobné výsledky v dvoch nemeckých prácach v porovnaní k výsledkom z českej populácie, je preto pravdepodobné, že na vznik astmy, resp. atopie budú mať najväčší vplyv práve tieto polymorfizmy – In2-SNP3, In18 a 3UTR SNP4 (rs324011, rs3024974, rs4559). Z týchto polymorfizmov má podľa literárnych údajov preukázateľne najväčší vplyv práve prvý z nich, In2-SNP3. Už Schedelová a spol.²⁷⁰ v roku 2004 popisali jeho asociáciu s hladinou IgE. Zároveň ich zaujímala jeho možná úloha v regulácii

STAT6, preto uskutočnili počítačovú analýzu sekvencie intrónu č.2, pričom objavili 2 možné miesta pre naviazanie transkripčného faktoru (TFB) – nukleárneho faktoru κ B (NF- κ B).

Tabuľka 16. Frekvencie haplotypov v českej a 2 nemeckých populáciách.

Haplotyp	Česká populácia	Weidinger ²⁷¹	Duetsch ²⁶⁷
TCA (s1)	43.68	37.51	42.82
CCG (s2)	26.84	26.00	15.87
CCA (s3)	20.52	25.04	23.30

Česká populácia predstavuje astmatikov vyšetovaných v rámci tejto dizertačnej práce.

Úloha NF- κ B v IL-4 indukovaných odpovediach je známa už dlhšiu dobu, viaže sa na sekvencie v promótorových oblastiach cieľových génov a to v blízkosti špecifických sekvencií pre *STAT6*. Pre vyvolanie tvorby IgE je potrebné, aby sa viazal na obidve cieľové sekvencie, pričom bolo poukázané na to, že sa tak veľmi pravdepodobne deje v proteínovom komplexe spolu s ďalšími transkripčnými faktormi ako napr. PU.1²⁶². Tieto dve TFB v 2 intróne *STAT6* sú v tesnej blízkosti vedľa seba, pričom distálnejšie TFB v sebe nesúce SNP rs324011 je vytvorené práve v prítomnosti alely T a miesto tohto SNP je silne konzervované medzi primátmi²⁷⁰. Keďže NF- κ B synergicky spolupracuje s *STAT6* v IL-4 mediovanej ceste tvorby IgE, Schedelová a spol.²⁷⁰ vyslovili predpoklad, že zmenou sekvencie v tomto druhom TFB mieste by rs324011 polymorfizmus mohol prispievať k zvýšenej tvorbe IgE. Pre potvrdenie tejto hypotézy sa Schedelová a spol.²²⁹ rozhodli uskutočniť *in vitro* a *ex vivo* experiment, v ktorom skúmali vplyv intrónu 2 a polymorfizmu rs324011 na funkciu *STAT6*. Zistili pri tom, že samotný intrón 2 má tlmivý účinok na aktivitu promótoru *STAT6* (a tým aj na mieru jeho expresie), pričom je jedno, či bol v použitých konštruktoch umiestnený po smere alebo protismere. Toto naznačuje na to, že v samotnej oblasti promótoru *STAT6* (cca

1,1 – 5,6 kb pred začiatkom translácie) sú taktiež tlmivé (silencingové) elementy, nakoľko konštrukty obsahujúce len promótor (bez intrónu 2) boli výraznejšie aktívnejšie v závislosti od dĺžky sekvencie pred miestom translačného počiatku. Pri zabudovaní intrónu č.2 do použitých konštruktov, došlo teda v prítomnosti wt alely rs324011 k výraznému zníženiu aktivity promótoru, v prítomnosti alely T rs324011 však došlo znovu k výraznému nárastu aktivity promótoru *STAT6* – ale len v prípade konštruktu obsahujúceho najdlhšiu sekvenciu *STAT6* promótoru (5643 bp). Toto poukazuje na možnosť fyzickej interakcie intrónu 2 s promótorovou oblasťou. Za zvýšenie aktivity promótera je zodpovedné alelošpecifické viazanie NF- κ B, čo bolo preukázané pri EMSA (electrophoretic mobility shift assay) experimentoch – k naviazaniu NF- κ B do špecifických DNA/proteínových komplexov dochádzalo len v prítomnosti T alely rs324011²²⁹.

Tieto *in silico* pozorovania chceli overiť *ex vivo*, preto merali aktivitu *STAT6* mRNA od detí s astmou. Prekvapivo popísali prítomnosť 2 nových izoform *STAT6*, ktoré obsahovali In17 a In17+In18 (*STAT6d* a *STAT6e*), ich prítomnosť si vysvetľovali intrónovou retenciou alebo alternatívnym miestom začiatku translácie. V prítomnosti TT genotypu v rs324011 dochádzalo u pacientov s astmou k miernemu, nesignifikantnému nárastu hladiny bežnej formy *STAT6* avšak k významnému nárastu hladín *STAT6d* a *STAT6e* mRNA. Úloha týchto dvoch izoform *STAT6* na tvorbu IgE je však zatiaľ nejasná. V súhrne teda potvrdili, že alela T v rs324011 zvyšuje aktivitu *STAT6* promótoru a to tým že sa vytvára nové miesto pre špecifické naviazanie NF- κ B. Na základe svojich výsledkov predpokladajú fyzickú interakciu intrónu 2 s promótorovou oblasťou (prostredníctvom formácie sľučky) a ďalej zmenu 3D štruktúry *STAT6* alebo jeho epigenetickej signatúry v dôsledku väzby NF- κ B²²⁶. Zmeny v interakcii intrónu 2 (v prítomnosti T alely rs324011) s promótorovou oblasťou umožňujúce uplatnenie epigenetických vplyvov by mohli byť vysvetlením rozdielov pozorovaných v distribúcii haplotypov *STAT6* v skupine

pacientov (popisovaných v tejto dizertačnej práci) vyšetrených na základe parentálneho pôvodu vo vzťahu k hladine IgE. Analýza preukázala, že v prítomnosti len jedného haplotypu s1 sa významne zvyšuje pravdepodobnosť výskytu elevovaných hladín IgE. Zvažovaním vplyvu parentálneho pôvodu haplotypu bolo odhalené, že s1 haplotyp predisponoval k zvýšeným hladinám IgE bez ohľadu na to, či bol od otca alebo matky. Signifikantne častejšie však bol s1 haplotyp zdedený od otca ($p < 0,01$ a $p = 0,08$ pre haplotypy otcovského a materského pôvodu). Toto pozorovanie poukazuje na to, že s1 haplotypu paternálneho pôvodu môže predisponovať k rozvoju atopie oveľa viac, než haplotyp maternálneho pôvodu (k vzniku atopie je však pravdepodobne zároveň nutná interakcia s ďalšími faktormi, nakoľko rodičia boli v prevažnej väčšine prípadov asymptomatickí).

Ďalším cieľom dizertačnej práce bolo posúdenie asociácie SNP a haplotypov *STAT6* s výskytom BHR u pacientov s astmou. Posudzoval sa jednak vplyv látky použitej k bronchoprovokácii, jednak i spôsob jej inhalácie (dýchanie danej koncentrácie v definovanej časovej jednotke vs. bolusová aplikácia). Štatistická analýza však neodhalila väzbu ani jedného zo sledovaných polymorfizmov alebo z nich zostavených haplotypov *STAT6* na úroveň bronchiálnej reaktivity, čo len potvrdzuje dôležité postavenie *STAT6* v regulácii tvorby IgE.

ADAM33 patrí medzi prvé kandidátske gény spojené s astmou identifikovaný metódou pozičného klonovania. Eederwegh a spol.¹²⁶ pri celogenómovom screeningu spojili astma s oblasťou 20q13 a pri následnej analýze polymorfnych markérov našli dva signály vo vnútri *ADAM33*. Sekvenovaním tohto génu identifikovali celkovo 55 SNP, 14 z nich bolo asociovaných s výskytom astmy v kaukazskej populácii (skupina z UK, skupina z US a spojená skupina), no distribúcia jednotlivých asociovaných polymorfizmov v sledovaných skupinách pacientov a v kombinovanej skupine pacientov bola rôzna. Eederwegh a spol.¹²⁶ predpokladali kumulatívny vplyv identifikovaných polymorfizmov na funkciu

ADAM33 a tým aj na vznik astmy a z tohto dôvodu uskutočnili ešte haplotypovú analýzu (kombináciu vždy 2 SNP do haplotypu) z SNP, ktoré boli samostatne asociované s astmou. Tieto zaujímavé výsledky vzbudili veľký záujem o štúdium úlohy *ADAM33* pri vzniku astmy a množstvo skupín sa pokúsilo asociovať SNP v *ADAM33* s astmou v rôznych populáciách.

Prvou štúdiou, ktorá úspešne replikovala asociáciu SNP v *ADAM33* bola štúdia na vzorku nemeckej populácie. V prípade familiárneho výskytu boli s astmou asociované F+1, ST+4 a ST+5 polymorfizmy. Niektoré z týchto SNP boli ešte zároveň spojené s eleváciou celkových IgE (F+1, ST+5), s BHR (F+1, S2) alebo s fenotypom astma+BHR (F+1, S2). Pri posudzovaní skupiny prípadov/kontrol bol s astmou asociovaný ST+7 a s BHR ST+5 polymorfizmus. Haplotypová analýza (dvoj- a troj- polymorfizmové kombinácie) familiárnych prípadov následne asociovala jeden haplotyp s astmou a ďalších 5 haplotypov s BHR²⁹⁹.

Spojitosť medzi SNP v *ADAM33* a výskytom astmy sa pokúšali nájsť aj Lee a spol.³⁰⁰ v súbore kórejských astmatikov. Uskutočnili genotypizáciu piatich polymorfizmov z 14 pôvodne asociovaných polymorfizmov¹²⁶, jednalo sa konkrétne o polymorfizmy S1, T1, V_1 V1 a V4. V skupine 326 astmatikov a 151 kontrol sa im však nepodarilo nájsť signifikantný rozdiel v distribúcii SNP ani haplotypov medzi skúmanými skupinami, ani väzbu na hladinu IgE. Jedinou výnimkou bola väzba T1 polymorfizmu a haplotypu h4 na hladinu BHR vyjadrenej pomocou PC₂₀ (pokles FEV₁ o 20% pri provokácii metacholínom)(ref.³⁰⁰). Hirota a kol.³⁰¹ skúmali vplyv SNP *ADAM33* na výskyt astmy v dospelosti na súbore 504 astmatikov a 651 kontrol v japonskej populácii. Sekvenačne identifikovali celkovo 48 SNPs, z nich 29 už predtým popísal Eederwegh a spol.¹²⁶. Do asociačnej analýzy zaradili 14 polymorfizmov, pričom signifikantnú asociáciu s astmou v dospelosti, po korekcii vzhľadom k počtu analyzovaných SNPs, vykazoval polymorfizmus T1 a hranične i S2 a V_3³⁰¹. Ďalej zostavili haplotypy zo štyroch SNPs – S2, T1, T2 (SNP, ktorý nebol

signifikantný po ich korekcii na mnohopočetný výber) a V_3 a zistili štatisticky významnú väzbu haplotypu CCTG s výskytom astmy v dospelosti. V protiklade k týmto výsledkom však v islandskej populácii nebol ani jeden zo študovaných polymorfizmov asociovaný s astmou³⁰². Autori však následne ešte uskutočnili meta-analýzu na podklade literárnych údajov, kde pozorovali významnú asociáciu ST+7, F+1, Q_1, S2 a T1 SNPs s astmou, pričom prvé dva SNP boli vo veľmi tesnej väzbe (linkage disequilibrium = 0.965). Howard a spol.³⁰² hľadali asociáciu medzi astmou (+ event. súvisiacim fenotypom) a 8 polymorfizmami v 4 rôznych populáciách – holandskej, belošskej z US, afroamerickej a hispánskej. Títo autori pozorovali asociáciu 5-tich polymorfizmov s astmou, avšak ani jeden z nich nebol asociovaný s daným fenotypom vo všetkých populáciách. Drobnou výnimkou bol len polymorfizmus S2, ktorého asociácia nebola zistená len v holandskej populácii. Haplotypová analýza našla zakaždým 2 významne asociované haplotypy v holandskej a afro-americkej populácii, v ostatných populáciách nebola nájdená významná väzba haplotypov s výskytom astmy. Veľká austrálska štúdia nepotvrdila asociáciu medzi žiadnym z 10 skúmaných polymorfizmov, našla však niekoľko haplotypov, ktoré boli významne spojené s astmou a za tento trend boli najviac zodpovedné polymorfizmy V-1 a ST+7³⁰⁴.

Jedným z cieľov tejto dizertačnej práce bolo i posúdenie asociácie celkovo 11 polymorfizmov v *ADAM33* s astmou alebo BHR. Vo výskyte jednotlivých SNPs medzi skupinou pacientov a kontrolami síce boli rozdiely, ale ani jeden nedosiahol štatistického významu. Medzi frekvenciami aliel v našej českej populácii pri porovnaní s ostatnými štúdiami kaukazských populácií^{304,318} boli síce malé rozdiely, tieto však neboli významné. Jednotlivé polymorfne alely môžu mať kumulatívny efekt na funkciu génu a preto i v súlade s publikovanými zahraničnými prácami, bola uskutočnená haplotypová analýza polymorfizmov v *ADAM33*. Haplotypy boli zostavené zo všetkých 11 skúmaných SNPs. Haplotypová analýza nenašla asociáciu s diagnózou astmy, ani s hladinou celkového IgE, a

i keď 3 hlavné haplotypy mali tendenciu viazať sa na vyššiu hladinu IgE, tak tieto väzby neboli štatisticky významné. Tento nález môže odrážať fakt, že ADAM33 má úlohu v medzibunkovej adhézii – jeho disintegrínová doména podporuje adhéziu leukocytov závislú na $\alpha 9\beta 1$ – integríne³¹⁹ a i samotné mezenchýmové bunky (ako napr. fibroblasty a bunky hladkého svalstva) tento integrín exprimujú³²⁰. Polymorfizmy v jednotlivých haplotyloch by teda mohli ovplyvňovať túto funkciu disintegrínovej domény a tak vplývať na množstvo leukocytov (a tým aj priebeh samotnej zápalovej reakcie) v dýchacích cestách.

Z predchádzajúceho prehľadu jednotlivých štúdií vyplýva zatiaľ akási neurčitosť v úlohe ADAM33 polymorfizmov pri vzniku astmy. Podľa imunohistochemických a expresných analýz je jasné, že samotný ADAM33 je dôležitý pre vývoj dýchacej sústavy (rozdielne zastúpenie ADAM33 a jeho foriem v pľúcach embryonálne a postnatálne) a má tak význam pre vznik astmy²⁸⁷. Niekoľko štúdií, vrátane pôvodnej práce Eedervega a spol.¹²⁶, popisuje asociáciu niektorých SNP s astmou – najčastejšie F+1 a ST+7. Tieto výsledky sa v ďalších štúdiách replikovali buď len pri meta-analýzach s ďalšími dodatočnými údajmi z rasovo odpovedajúcich populácií^{302,304}, pri haplotypovej analýze, alebo vôbec³⁰⁵.

Haplotypová analýza ADAM33 polymorfizmov v skupine detských astmatikov vyšetovaných v súvislosti s touto dizertačnou prácou odhalila asociáciu haplotypu a3 s BHR. Tento haplotyp a3 bol v skupine detských astmatikov asociovaný s bronchiálnou hyperreaktivitou po provokácii s histamínom, pričom bolo jedno, akým spôsobom bol histamín podaný. Rozloženie najčastejších haplotypov ADAM33 v sledovaných skupinách sumarizujú grafy 5 a 6. Pozorované frekvencie haplotypov v českej populácii boli porovnané s frekvenciami asociovaných alebo aspoň najčastejšie sa vyskytujúcimi haplotypmi v štúdiách kaukazských populácií. Porovnávať však haplotypy v štúdiách je problematické z niekoľkých dôvodov:

1. každá štúdia pracuje s rozdielnym spektrom polymorfizmov,
2. haplotypy sa niekedy zostavujú z dvoj- alebo trojkombinácií SNPs,
3. alebo sú uvádzané len názvy polymorfizmov bez odpovedajúcich nukleotidov tvoriacich daný haplotyp.

Porovnanie výsledkov z českej populácie sa však podarilo aspoň k nám relatívne najbližšou nemeckou populáciou a potom ďalej so štúdiou vychádzajúcou z austrálskej kaukazskej populácie. Nemecká štúdia prípadov a kontrol a longitudinálnej kohorty astmatikov neodhalila asociáciu ani jedného SNP s diagnózou astmy, avšak našli asociáciu A alely v S1 a G alely vo V4 s rizikom rozvoja neatopickej astmy a ďalej asociáciu niekoľkých SNP s plúčnymi funkčnými parametrami³¹⁸. Haplotypová analýza 8 SNP z 10 (F+1, S1, S2, ST+4, ST+5, ST+7, T1 a V4) následne našla pre haplotyp H4 (GGGCCGTG) slabú (nesignifikantnú, $p=0.063$) väzbu s astmou v skupine prípadov a kontrol. Pri kombinácii dát s longitudinálnou skupinou už väzba bola signifikantná, $p=0.033$. Po zostavení haplotypov z vybraných SNP, spoločných pre porovnávané populácie, bolo možné vidieť (Tab. 17), že i keď rozdiely vo frekvenciách polymorfizmov medzi týmito populáciami nie sú veľké, dochádza k rozdielnej distribúcii haplotypov. Frekvenčne si navzájom odpovedajú len haplotypy a2 a a3, vo frekvenciách ďalších haplotypov sú už väčšie rozdiely. Haplotyp H4 z nemeckej štúdie sa v populácii našich astmatikov vyskytuje 2x menej a nie je asociovaný ani s astmou ani s BHR. Naproti s BHR je v našej populácii asociovaný haplotyp č.3 (tzv. a3), ktorý má podobnú frekvenciu ako v nemeckej populácii. V oboch štúdiách boli skúmané F+1 a ST+4 SNPs, ktoré by mali k rozvoju astmy prispievať najviac.

Tabuľka 17: Frekvencie haplotypov v populácii českých a nemeckých astmatikov.

		ČR	Nemecko
a1	GGCATC	20,27	30,35
a2	GGCCTC	16,22	17,02
a3	AGGACC	13,51	12,98
	GGCCTG	5,86	12,96
	AGCCTC	4,05	6,70
	AAGATG	2,70	8,35

Haplotypy sú vytvorené z SNP, ktoré boli spoločné pre populáciu českých detských astmatikov (asociačná štúdia tejto dizertačnej práce) a beloškú nemeckú populáciu (Schedel a spol.³¹⁸). Prvé 3 polymorfizmy sú najčastejšie a zodpovedajú polymorfizmom zostavených pôvodne zo všetkých 11 SNP v *ADAM33*, ktoré boli skúmané v rámci tejto dizertačnej práce.

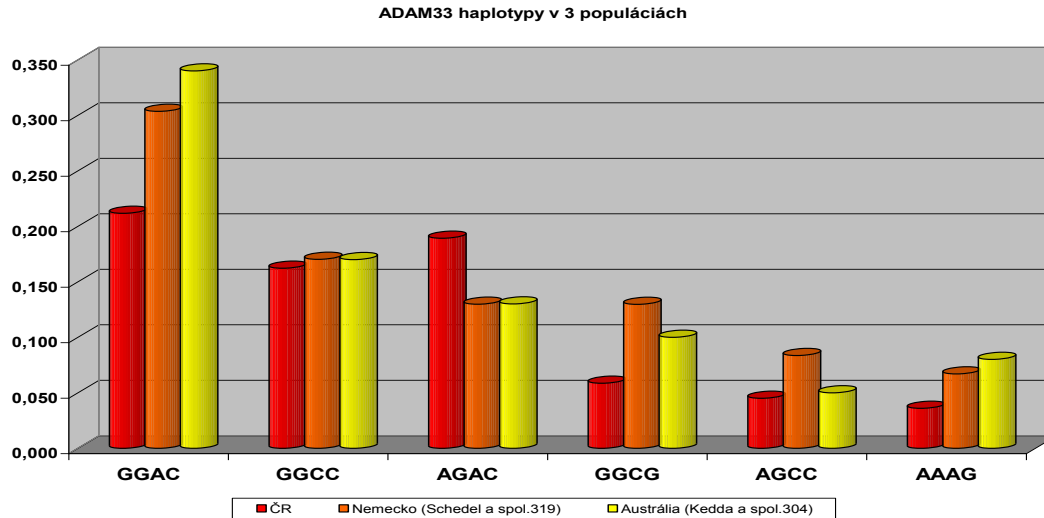
V prípade austrálskej štúdie nebola nájdená asociácia medzi ani jedným z 10 SNPs a astmou alebo závažnosťou onemocnenia³⁰⁴. Boli však opäť pozorované niektoré haplotypy spojené s výskytom astmy. Pri porovnaní haplotypov vytvorených zo SNP spoločných pre štúdiu českej populácie a austrálskej populácie (F+1, S1, ST+4, V4 a V5, tab. č.18) je vidieť výrazný rozdiel vo frekvencii hlavne prvého a čiastočne i štvrtého haplotypu, pričom frekvencie týchto dvoch haplotypov sú približne rovnaké medzi nemeckou a austrálskou kaukazskou populáciou. Polymorfizmus V5 má v týchto haplotypoch iba alelu A (ktorá je majoritná), po jej vypustení z konštrukcie haplotypov nedošlo k významnej zmene frekvencie haplotypov. Toto môže naznačovať, že najväčšou mierou k rozvoju astmy prispievajú len tieto štyri SNP a celkový prehľad zastúpenia haplotypov v troch porovnávaných populáciách (česká, nemecká a austrálska) je zobrazený na grafe č. 7.

Tabuľka 18: Frekvencie haplotypov v populácii českých a austrálskych astmatikov.

		ČR	Austrália
a1	GGACA	21,17	34,00
a2	GGCCA	16,22	17,00
a3	AGACA	15,32	13,00
	GGCGA	6,76	10,00
	AGCCA	4,50	4,00
	AAAGA	3,60	8,00

Haplotypy sú vytvorené z SNP, ktoré boli spoločné pre populáciu českých detských astmatikov (asociačná štúdia tejto dizertačnej práce) a beloškú austrálsku populáciu (Kedda a spol.³⁰⁴). Prvé 3 polymorfizmy sú najčastejšie a zodpovedajú polymorfizmom zostavených pôvodne zo všetkých 11 SNP v *ADAM33*, ktoré boli skúmané v rámci tejto dizertačnej práce.

Rozdiel vo frekvenciách haplotypov môže byť spôsobený nie len ich rozdielnou distribúciou v populáciách ale aj zrejme nedostatočným rozsahom skúmaných súborov, ako už bolo niekoľkokrát konštatované v niektorých prácach. Tak ako doposiaľ nie je žiadny SNP v *ADAM33* asociovaný s astmou konzistentne vo všetkých populáciách (aspoň teda v populáciách ktoré si odpovedajú rasovo), neexistuje ani takýto haplotyp. V každej štúdii boli s astmou asociované vždy iné haplotypy a ani v prípade viacerých etnicky rozdielných populácií v rámci jednej štúdie neboli nájdené haplotypy asociované s astmou, ktoré by boli asociované súčasne vo všetkých skúmaných populáciách. Možnou príčinou týchto rozdielných výsledkov je aj rozdiel v definícii samotného fenotypu – je posudzovaná astma ako diagnóza, alebo len atopická astma, alebo BHR. Pritom s ohľadom na funkciu a lokalizáciu expresie *ADAM33* by sa jeho SNPs mali dávať do súvislosti s neatopickou astmou.



Graf 7. Porovnanie výskytu haplotypov z SNP v *ADAM33* v 3 populáciách. Haplotypy sú zostavené z polymorfizmov F+1, S1, ST+4 a V4. Prvé 3 haplotypy zodpovedajú pôvodným haplotypom a1, a2 a a3 (zostavené zo všetkých 11 SNP použitých v tejto dizertačnej práci). Uvedené polymorfizmy sú spoločné pre porovnávané populácie astmatikov v českej populácii (predmet asociačnej štúdie tejto dizertačnej práce), nemeckej belošskej populácii (Schedel a spol.³¹⁸) a austrálskej belošskej populácii (Kedda a spol.³⁰⁴).

Niekoľko štúdií^{308,311} poukázalo na to, že prvotná práca Eederwegha a kol.¹²⁶ do určitej miery nadhodnotila vplyv polymorfizmov *ADAM33* na rozvoj astmy a výsledky ku ktorým dospeli mohli byť ovplyvnené v dôsledku špecifickej zostavy vyšetrovaných skupín. Okrem toho už samotný Eederweg a kol.¹²⁶ popisovali, že okrem *ADAM33* pri celochromozómovej analýze chromozómu 20, sa v oblasti 20q13 našli ešte ďalšie 2 gény (resp. asociácia ich polymorfizmov), ktoré boli významne spojené s familiárnym výskytom astmy – GFRA4 a SN. ¹ Na základe vyššie uvedených skutočností je teda možné zhrnúť, že *ADAM33* podľa doterajších prác a nakoniec i výsledkov prezentovaných v tejto dizertačnej práci má dôležitú úlohu v rozvoji astmy, hlavne teda neatopickej. Presné posúdenie úlohy polymorfizmov *ADAM33* však bude vyžadovať ešte ďalšie štúdie na rozsiahlych súboroch pacientov pri presne definovanom fenotype astmy – atopická v.s. neatopická, presne definované zmeny v pľúcnych funkciách (spirometrické, poprípade oscilometrické vyšetrenie BHR).

Zaujímavým výsledkom analýzy haplotypov v *STAT6* i *ADAM33* je ich rozdielna distribúcia pri zohľadnení ich parentálneho pôvodu. V prípade *STAT6* bol s1 haplotyp asociovaný s hladinou IgE bez ohľadu na jeho pôvod, avšak významne častejšie bol prenášaný z paternálnej línie. V prípade haplotypu a3 v *ADAM33* bola taktiež zistená významná väzba na BHR po stimulácii histamínom, ale len v tom prípade, že a3 haplotyp bol otcovského pôvodu. Pretože rozdiel v distribúcii haplotypov medzi astmatikmi a kontrolami nebol významný, tak tieto pozorovania naznačujú možnú interakciu epigenetických faktorov s týmito génmi.

V prípade *STAT6* by zmeny v intróne č. 2 mohli ovplyvňovať interakciu s promótorovou oblasťou a táto interakcia by mohla byť ovplyvnená i epigenetickými faktormi. Samotné vplyvy prostredia i epigenetické faktory majú tiež dôležitý efekt na atopiu či výsledný fenotyp astmy³²¹. Hlavnými epigenetickými mechanizmami sú acetylácia histónov a metylácia DNA^{321,322}. Význam DNA metylácie bol zistený i pri diferenciácii smerom k Th2

bunkách. V nediferencovaných T_H bunkách (tzv. naivné bunky) bol totižto 3 CpG ostrovček v *rad50* hypersenzitívom mieste 7 (RHS7) pre Th2 LCR (lokus kontrolujúca oblasť) temer úplne metylovaný (96%) a kompletná demetylácia RHS7 nastávala v závislosti od STAT6³²³.

Vplyv rodičov na výskyt atopie alebo astmy bol v literatúre už dlho a často diskutovaný. Znížené riziko astmy a BHR bolo pozorované u detí, ktoré zdedili polymorfizmus Val105 v *GSTP1* od svojej matky³²⁴. Vplyv maternálne preneseného lokusu 11q na výskyt atopie bol pozorovaný hneď viackrát^{85,325}. S maternálnou atopiou boli spojené i zvýšené hladiny IgE v pupočníkovej krvi. Z týchto dôvodov je považovaný vplyv matky na vznik astmy alebo alergie u dieťa za omnoho významnejší, než vplyv otca, uvažuje sa jednak o vlastných epigenetických zmenách prenesených na dieťa i o vplyve samotnej matky na vyvíjajúci sa imunitný systém plodu.

V súbore astmatikov popisovaných v tejto dizertačnej práci bola taktiež zistená rozdielna distribúcia haplotypov v závislosti od ich rodičovského pôvodu. Zvýšená hladina IgE bola však pozorovaná v prítomnosti hlavne s1 haplotypu v *STAT6* s otcovským pôvodom. A navyše, otcovský s1 haplotyp ukazoval trend k výraznejšiemu zvyšovaniu IgE než haplotyp materského pôvodu. Tento rozdielny vplyv rodičovského pôvodu haplotypov by mohol odrážať rozdielny charakter imprintingu alely otcovskej a alely materskej. Niektoré gény sú totižto schopné úplne alebo aspoň čiastočne uniknúť epigenetickému preprogramovaniu v priebehu prenatálneho vývoja^{321,326} a môžu si tak ponechávať svoj jedinečný charakter DNA metylácie. Niektoré špecifické epigenetické vzorce tak môžu byť prenášané na potomkov bez ich zmeny^{326,327}. Tieto procesy by tak mohli aspoň čiastočne vysvetliť pozorovaný charakter distribúcie IgE – je možné predložiť hypotézu, že haplotyp s1 otcovského pôvodu poskytuje väčšie riziko pre výskyt zvýšených hladín IgE a tento jeho efekt je ešte následne modulovaný *in utero* matkou v závislosti napr. od jej stravovacích návykov³²⁶. Rozdiel v hladinách IgE pri prítomnom s1 haplotype bol taktiež pozorovaný

i v závislosti na pohlaví pacienta. Pri tomto členení však už nebolo možné vylúčiť chybu malých čísiel, preto by toto pozorovanie malo byť skúmané na rozsiahlejšom súbore pacientov. Mimo to, závery niektorých štúdií poukazujú na to, že rozdiely v hladine IgE medzi pohlaviami budú závisieť i od vplyvu iných lokusov, než je *STAT6*^{324,328-330}. I v prípade *ADAM33* bol pozorovaný rozdiel v distribúcii haplotypov pri zohľadnení ich rodičovského pôvodu. Výsledky analýzy v tomto prípade boli ešte zaujímavejšie, pretože pozorovaná asociácia a3 haplotypu s BHR bola na vrub len paternálne preneseného haplotypu – v prípade a3 haplotypu maternálneho pôvodu nebol pozorovaný signifikantný rozdiel v porovnaní s ostatnými haplotypmi. I v prípade *ADAM33* je tak možné zvažovať prítomnosť epigenetických faktorov, ktoré by ovplyvňovali funkciu *ADAM33*. V prípade *ADAM33* je však nutné uvažovať skôr o ovplyvnení zostrihu a spektra izoform *ADAM33*, nakoľko zvýšená exprimácia kompletnej formy *ADAM33* nebola v dýchacích cestách astmatikov pozorovaná.

Tieto zaujímavé výsledky s veľkou pravdepodobnosťou prvý krát naznačujú, že vplyv na alergické ochorenie dieťaťa môže mať i otec a nie len matka. Tieto poznatky je však nutné overiť v ďalších štúdiách.

8. Súhrn

Alergická reakcia, resp. alergia, je charakterizovaná neadekvátnou odpoveďou na neškodné vonkajšie antigény. Pri opakovanej expozícii organizmu týmito antigénmi (alergénmi) dochádza k rozvoju zápalových zmien v tkanivách a orgánoch vedúcich nasledovne k poruchám ich funkcie a integrity. Najčastejšou reakciou uplatňujúcou sa u alergikov je precitlivenosť 1. typu, charakterizovaná tvorbou IgE protilátok, preto o alergii v užšom slova zmysle hovoríme práve v takýchto prípadoch. Atopiou potom označujeme geneticky podmienenú predispozíciu reagovať na bežné alergény vonkajšieho prostredia zvýšenou tvorbou špecifických protilátok triedy IgE. Prejavom alergickej reakcie na klinickej úrovni sú alergické choroby, (napr. astma, atopický ekzém a polinóza), ktorých výskyt v posledných dekádach výrazne stúpol.

Alergické ochorenia majú tendenciu sa vo zvýšenej miere vyskytovať v rodinách, čo preukázalo množstvo štúdií zameraných na rodiny s výskytom alergických chorôb ako hlavne astmy či atopie. Rôzne väzbové a celogenómové asociačné štúdie odhalili množstvo kandidátskych génov spojených s výskytom astmy či atopie. Medzi gény s opakovane zistenou asociáciou patria *STAT6* a *ADAM33*. *STAT6* má dôležitú úlohu pri izotypovom preskoku a tvorbe IgE. *ADAM33* bude mať dôležitú úlohu pri embryonálnom vývoji dýchacích ciest a v procesoch vedúcich k remodelácii dýchacích ciest. V oboch génoch sa vyskytujú polymorfismy, ktoré boli spojené s výskytom atopie, astmy alebo s ňou súvisiacimi fenotypmi.

V experimentálnej časti tejto dizertačnej práce bola nájdená asociácia haplotypu ATTCAA (haplotyp s1) v *STAT6* s hladinou celkových IgE. Súčasne bol zistený i významný rozdiel v distribúcii tohto haplotypu v závislosti od jeho rodičovského pôvodu – významne častejšie bol otcovského pôvodu. Väzba polymorfizmov *STAT6* k astme či bronchiálnej hyperreaktivite (BHR) nebola pozorovaná. Väzbu na úroveň BHR vykazoval haplotyp

AAGGATCTGCA (a3 haplotyp) v *ADAM33*, ktorý sa nachádzal významne častejšie u pacientov s ťažkou BHR. Tento štatisticky významný rozdiel bol pozorovaný len pre a3 haplotyp otcovského pôvodu. V distribúcii *STAT6* a *ADAM33* polymorfizmov ani haplotypov z nich zostavených nebol pozorovaný významný rozdiel medzi skupinami detských astmatikov a kontrolami. Významné väzby uvedených haplotypov k hladine IgE a BHR boli v skupine pacientov preukázané a preto sa pri ich vzniku budú uplatňovať i ďalšie, pravdepodobne epigenetické faktory, nasadajúce na terén predispozície vytvorenej haplotypmi a3 v *ADAM33* a s1 v *STAT6*. Veľmi zaujímavým je i pozorovaný rozdiel v distribúcii haplotypov v závislosti od ich rodičovského pôvodu, nakoľko doposiaľ bola s alergickými chorobami spájaná alergická choroba matky. Tento poznatok je ale nutné potvrdiť v ďalších štúdiách.

9. Summary

Allergic reaction is characterized by inadequate response of body to harmless environmental antigens. If the organism is repeatedly exposed to the antigens (allergens), inflammatory changes in tissues and organs of the body gradually lead to their dysfunction and loss of integrity. The most frequent allergy reaction is type I hypersensitivity and the production of IgE is hallmark of this reaction. Therefore, allergy in the strictest sense means presence of this reaction to the allergen. Atopy is genetically determined predisposition to develop reaction against common environmental allergen characterized by presence of elevated specific IgE level.

Allergic reaction manifests as some of the allergy diseases (e.g. asthma, hay fever and atopic dermatitis) and the incidence has been doubled during the last decade. Allergic diseases have tendency to run increasingly in the families and this fact has been proved by plenty of family based studies focused on allergic disease such as asthma or atopy. Many of the linkage or genome wide studies discovered a lot of candidate genes associated with asthma or atopy. *STAT6* and *ADAM33* belong to genes with repeatedly replicated association with these diseases. *STAT6* has crucial role in promoting isotype switching leading to IgE production. *ADAM33* is suggested to have an important role in branching lung morphogenesis in course of prenatal development and to have important role in mechanisms leading to airway remodelling. The genes have polymorphisms (single nucleotide polymorphism – SNP; or dinucleotide repetitions) associated with occurrence of atopy, asthma or asthma related phenotypes.

Experimental part of this Ph.D. thesis describes association between ATTCAA haplotype (s1 haplotype) of *STAT6* and total IgE level. This haplotype showed significantly different distribution according to its parental origin and it was significantly over-transmitted from fathers to their offspring. The *STAT6* haplotypes showed no significant linkage to the asthma or airway

hyperresponsiveness (AHR). The AAGGATCTGCA haplotype (a3 haplotype) of the *ADAM33* had linkage to level of AHR and was predominantly present in patients suffering from mild-severe type of AHR. This significant linkage was found in the paternally inherited haplotype only. Although there was no difference in distribution of the *STAT6* and *ADAM33* SNPs or their haplotypes between groups of patients and controls, the s1 and a3 haplotypes had been significantly linked with IgE level or AHR, respectively. Therefore, there must be present other factors, the most probably epigenetic factors, cooperating with these haplotypes and thus contributing to the development of increased IgE level or AHR. Haplotypes also showed significantly different distribution in the patient group according to their parental origin and the over-transmission of paternally derived haplotypes was observed. The maternal influence on the atopy or asthma development (transmission of maternally derived predisposing allele) is well recognized in the literature and therefore the predominance of paternally inherited haplotypes in our patient group is very interesting. However, the exact role of paternally derived alleles on the allergic disease development needs to be evaluated in further studies.

10. Použité zkratky, vysvetlivky

ADAM33 – 33. proteín z rodiny ADAM (z angl. A Disintegrin And Metalloproteinase)

APC – antigén prezentujúca bunka (DC, monocyty, makrofágy, B lymfocyty)

BHR – bronchiálna hyperreaktivita

bp – pár báz (base pair).

C/EBP- β – k CCAAT a zosilňovaču (enhancér) sa viažuci proteín, typu β

CBP – proteín viažuci CREB

DC – dendritická bunka

DD – dizintegrínová doména

DHPLC – vysoko rozlišovacia kvapalinová chromatografia (z angl. Denaturing high performance liquid chromatography)

Fc ϵ RI – vysoko afinitný receptor pre IgE

Fc ϵ RII (CD23) – nízko afinitný receptor pre IgE

GAS – z angl. Interferon-Gamma Activated Sequence, sekvencie aktivované interferónom γ

GWAS – celogenómová asociačná štúdia (z angl. genome wide association study)

HLA – ľudské antigény leukocytov (z angl. human leukocyte antigen), patria všeobecne do MHC (hlavný histokompatibilný systém)

IgE – imunoglobulín triedy E

kb – kilobázy

MALDI-TOF – hmotnostná spektrometrie, kedy technika MALDI je vykonávaná na spektrometri TOF (z angl. matrix-assisted laser desorption ionisation, time of flight). Jedná sa o jemnú ionizačnú techniku využívanú v hmotnostnej spektrometrii k analýze biomolekúl, či veľkých organických náchylných k fragmentácii pri využití bežných ionizačných techník.

MD – metaloproteinázová doména ADAM33

NCoA-1 – nukleárny koaktivátor 1
NF- κ B – nukleárny faktor κ B, jeden z koaktivátorov transkripcie
OR – odds ratio
LOD (logarithm of odds ratio) – dekadický logaritmus OR
PCR – polymerázová reťazová reakcia
PD – prodoména ADAM33
RFLP – dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov (restriction fragment length polymorphism)
SNP – jednonukleotidový polymorfizmus (z angl. Single nucleotide polymorphism), SNPy (množné číslo)
SPT – kožný test k posúdeniu reaktivity k testocaným alergénom (skin prick test)
SS – signálna sekvencia ADAM33
SSCP – konformačný polymorfizmus jednovláknovej DNA (z angl. single-strand conformational/chain polymorphism)
STAT6 – prenášač signálu a aktivátor transkripcie 6 (z angl. signal Transducer and Activator of Transcription).
TAD – transaktivačná doména STAT6
 T_{H1} – pomocný T lymfocyt triedy 1
 T_{H2} – pomocný T lymfocyt triedy 2
 T_m – teplota topenia DNA reťazca
TNF – tumor nekrotizujúci faktor
wt – označenie divokého kmeňu, napr. nemutovaná (wt – wild type) alela
 ϵ GLT – transkripčný produkt C ϵ lokusu (z angl. ϵ germ line transkript) obsahujúci i exón I ϵ .

11. Zoznam publikácií

Články v impaktovaných a recenzovaných časopisoch:

1. Godava M, Kopriva F, Bohmova J, Vodicka R, Dusek L, Cvanova M, Muzik J, Markova M, Schneiderova E, Vrtel R. Association of STAT6 and ADAM33 single nucleotide polymorphisms with asthma bronchiale and IgE level and its possible epigenetic background. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2012 Sep;156(3):236-47. doi: 10.5507/bp.2012.009. Epub 2012 Jan 30. IF 0,702

2. Godava M., Kopřiva F., Böhmová J., Vodička R., Vrtěl R, Cvanová M., Dušek L., Mužik J. Asociace haplotypů polymorfismů v STAT6 s hladinou IgE a rozdíl v četnosti těchto haplotypů vzhledem k jejich rodičovskému původu u dětí s asthma bronchiale. Alergie 2012; 14(2):134-139.

3. Kopriva F, Godava M, Markova M, Vodicka R, Dusek L, Muzikk J, Schneiderova E, Vrtel R, Mihal V. Possible control of paternal imprinting of polymorphisms of the ADAM33 gene by epigenetic mechanisms and the association with the level of airway hyperresponsiveness in asthmatic children. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2013 (prijaté k publikácii)

4. Godava M, Vrtel R, Vodicka R. STAT6 – polymorphisms, haplotype and epistatis in relation to the atopy and asthma. Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2013 (úspešne prebehlo posúdenie recendentom)

5. Svacinova V, Vodicka R, Vrtel R, Godava M, Kvapilova M, Krejcirikova E, Dusek L, Bortlicek Z, Santavy J. Sequence recombination in exon 1 of the TSPY gene in men with impaired

fertility. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011 Sep;155(3):287-98. doi: 10.5507/bp.2011.034.

IF 0,702

Publikovaný abstrakt

Kopriva F., Vodicka R., Vrtel R., Dusek L., Godava M., Markova M, Bohmova J., Zavodska J, Plocova A., Schneiderova E., Krecirikova E. STAT6 and ADAM33 single nucleotide polymorphism in association with Bronchial asthma. Eur J Hum Gen, 2007, 15, Suppl 1, 183 – 184.

IF 3,679

Posterové prezentácie:

1. Kopriva F., Vodicka R., Vrtel R., Dusek L., Godava M., Markova M, Bohmova J., Zavodska J, Plocova A., Schneiderova E., Krecirikova E. STAT6 and ADAM33 single nucleotide polymorphism in association with Bronchial asthma. European Human Genetics Conference 2007, Nice, France, June 16-19, 2007, Poster

2. M. Godava, R. Vodicka, F. Kopriva, M. Marková, J. Böhmová, R. Vrtěl, L. Dušek, J. Šantavý. Polymorfizmy genů asociovaných s alergickou reakcí.

Celoštatny zjazd Spoločnosti lekárskej genetiky ČLS JEP a 40. výročná cytogenetická konferencia, Hotel Krystal, Praha 19.-21. september 2007, WWW.slg.cz/sjezd2007.

Prednášková činnosť:

1. M. Godava, R. Vodička, F. Kopriva, J. Böhmová, M. Marková, R. Vrtěl, L. Dušek, J. Šantavý: Polymorfizmy genů asociovaných

s alergickou reakcí. 2. ročník konferencie vedeckých prác študentov doktorských štúdijských programov na Lekárskej fakulte UP, 10. - 11. september 2007

2. M. Godava, R. Vodička, F. Kopřiva, J. Böhmová, M. Marková, R. Vrtěl, L. Dušek, J. Šantavý: Polymorfizmy genů asociovaných s alergickou reakcí. 3. ročník konferencie vedeckých prác študentov doktorských štúdijských programov na Lekárskej fakulte UP, 3. - 4. september 2007

12. Použitá literatura

1. Hořejší V, Bartůňková J. „Alergie.“ *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. 219-226. Tlač. ISBN 978-80-7387-280-9
2. Salder HH. On asthma: its pathology and treatment. London: John Churchil & Sons; 1860.
3. Hopp RJ, Bewtra AK, Watt GD, Nair NM, Townley RG. Genetic analysis of allergic disease in twins. *J Allergy Clin Immunol*. 1984 Feb;73(2):265-70
4. Edfors-Lubs ML. Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol*. 1971;26(4):249-85.
5. Yilmaz-Demirdag Y, Prather B, Bahna SL. Does heredity determine the allergy manifestation or the sensitisation to a specific allergen? *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2010;38(2):56-9. Epub 2009 Oct 22.
6. Wiener AS, Zieve I, Fries JH. the inheritance of allergic disease. *Hum Genet* 1936;7:141-162
7. Hanson B, McGue M, Roitman-Johnson B, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Blumenthal MN. Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am J Hum Genet*. 1991 May;48(5):873-9.
8. Skadhauge LR, Christensen K, Kyvik KO, Sigsgaard T. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur Respir J*. 1999 Jan;13(1):8-14.
9. Holloway JW, Yang IA, Holgate ST. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S81-94.
10. Ege MJ, Bieli C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Ublagger E, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Scheynius A, Pershagen G, Benz MR, Lauener R, von Mutius E, Braun-Fahrlander C and Parsifal Study team. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:817-23.
11. Whitrow MJ, Moore VM, Rumbold AR, Davies MJ. Effect of Supplemental Folic Acid in Pregnancy on Childhood Asthma: A Prospective Birth Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2009;170:1486-93.

12. Sharland E, Montgomery B, Granell R. Folic acid in pregnancy - is there a link with childhood asthma or wheeze? *Aust Fam Physician*. 2011 Jun;40(6):421-4.
13. Bekkers MB, Elstgeest LE, Scholtens S, Haveman-Nies A, de Jongste JC, Kerkhof M, Koppelman GH, Gehring U, Smit HA, Wijga AH. Maternal use of folic acid supplements during pregnancy, and childhood respiratory health and atopy. *Eur Respir J*. 2012 Jun;39(6):1468-74. doi: 10.1183/09031936.00094511. Epub 2011 Oct 27.
14. Magnusson L, Olesen A, Wennborg H, Olsen J: Wheezing, asthma, hayfever, and atopic eczema in childhood following exposure to tobacco smoke in fetal life. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1550–56.
15. Alati R, Al Mamun A, O'Callaghan M, Najman JM, Williams GM. In utero and postnatal maternal smoking and asthma in adolescence. *Epidemiology* 2006;17:138–44.
16. Wang C, Salam MT, Islam T, Wenten M, Gauderman WJ, Gilliland FD. Effects of In Utero and Childhood Tobacco Smoke Exposure and beta2-Adrenergic Receptor Genotype on Childhood Asthma and Wheezing. *Pediatrics* 2008;122:e107-14.
17. Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet*. 1989 Jun 10;1(8650):1292-5.
18. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):169-82.
19. Oettgen H, Broide DH. Introduction to mechanisms of allergic disease. In: Holgate ST, Church MK, Broide DH, Martinez FD, editors. *Allergy – 4th ed*. China: Elsevier Saunders; 2012. p. 1-40. ISBN-13: 9780723436584
20. Hořejší V, Bartůňková J. „Imunopatologické reakce.“ *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. 208-218. Tlač. ISBN 978-80-7387-280-9
21. Ryan JJ, Interleukin-4 and its receptor: essential mediators of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:1-5.
22. Hořejší V, Bartůňková J. „Imunitní reakce založené na T lymfocytech a NK buňkách.“ *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. 137-153. Tlač. ISBN 978-80-7387-280-9
23. Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature*. 1994;367(6462):425-8.

24. Bacharier LB, Geha RS. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Feb;105(2 Pt 2):S547-58.
25. MAYER, Gene. *Immunology - chapter six: Genetics of immunoglobulins* [online]. 2010-07 [citované. 2012-12-31]. Dostupné na World Wide Web: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgGenetics2000.htm>
26. Hořejší V, Bartůňková J. „Vznik repertoáru antigenně specifických receptorů T a B lymfocytů.“ *Základy imunologie.* 4. vydání. Praha: Triton, 2009. 126-136. Tlač. ISBN 978-80-7387-280-9
27. Oettgen HC. Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of epsilon germline transcripts. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(6):618-23.
28. Goenka S, Kaplan MH. Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res.* 2011;50(1):87-96. doi: 10.1007/s12026-011-8205-2.
29. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, de Vries JE. Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J Exp Med.* 1990;172(2):463-73.
30. Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Labelouse R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 2000;102(5):565-75.
31. Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, Yel L, Forveille M, Kavli B, Krokan HE, Ochs HD, Fischer A, Durandy A. *Nat Immunol.* 2003;4(10):1023-8. Epub 2003 Sep 7. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination.
32. Jarvis D, Burney P. ABC of allergies. The epidemiology of allergic disease. *BMJ.* 1998 Feb 21;316(7131):607-10.
33. Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR. Burden of allergic disease in the UK: secondary analyses of national databases. *Clin Exp Allergy* 2004;34:520-6
34. Jarvis D, Luczynska C, Chinn S, et al. Change in prevalence of IgE sensitization and mean total IgE with age and cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:675-82

35. C Anandan, R Gupta, CR Simpson, C Fischbacher, and A Sheikh Epidemiology and disease burden from allergic disease in Scotland: analyses of national databases. *J R Soc Med.* 2009; 102(10): 431–442.
36. Pawankar R, Canonica WG, Holgate ST and Lockey RF. WAO White Book on Allergy 2011 – 2012: Executive Summary. World Allergy Organization. A World Federation of Allergy, Asthma and Clinical Immunology Societies. 2011.
37. KRATĚNOVÁ, Jana a PUKLOVÁ, Vladimíra. Výskyt astmatu a alergií u dětí, SZU [online]. 2008-05-12, [citované. 2013-01-03]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/vyskyt-astmatu-a-alergii-u-deti>
38. Státní zdravotnický ústav. Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ČR ve vztahu k životnímu prostředí – Souhrnná zpráva za rok 2008. Praha: EnviTypo®; 2008.
39. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax.* 2000 Aug;55 Suppl 1:S2-10.
40. Hruškovič B. Alergia a astma v Evropě. *Via Practica* 2004;2:78-80.
41. Kašák V, Feketeová. Průduškové astma v dospělosti. Praha: Maxdorf; 2009. p. 1-40.
42. Pohunek P. Výskyt bronchiálního astmatu ve světě a u nás. *Alergie, Supplementum.* 2003; 1: 7–14.
43. GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Pocket guide for asthma management and prevention. [online]. 2011-12-, [citované. 2013-01-05]. Dostupné na World Wide Web: http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Pocket_April20.pdf
44. Salajka F, Kašák V, Pohunek P, Seberová E, Špičák V, Brhel P, Feketeová E, Fuchs M, Kočí T, Kopřiva F, Krěmová I, Novotná B, Panzer P, Paráková Z, Petru V, Režný J, Rybníček O, Satinská J, Sedlák V, Sýkora T, Šnorek V a Turzíková J. Diagnostika, léčba a prevence průduškového astmatu v České Republice. Uvedení globální strategie do praxe. Praha: Česká iniciativa pro astma, o.p.s.; 2008. p. 1–112.
45. Warner JO, Boner AL. Pediatric allergy and asthma. In: Holgate ST, Church MK, Broide DH, Martinez FD, editors. *Allergy* – 4th ed. China: Elsevier Saunders; 2012. p. 347–360 . ISBN-13: 9780723436584

46. Cakebread JA, Haitchi HM, Holloway JW, Powell RM, Keith T, Davies DE, Holgate ST. The role of ADAM33 in the pathogenesis of asthma. *Springer Semin Immunopathol.* 2004 Feb;25(3-4):361-75. Epub 2003 Nov 15.
47. Davies DE. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(8):678-82.
48. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:193–204
49. von Mutius E, Sears MR. Risk factors for development of asthma. *Eur Respir Mon* 2003; 8: 57–73.
50. Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Howarth PH, Haitchi HM, Holloway JW. Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms. *Eur Respir J.* 2007 Apr;29(4):793-803.
51. Špičák, V. Alergologie. In: Hrodek O & Vavřinec J, eds. *Pediatric.* Praha: Galén, 2002. p. 159-195. ISBN 80-7262-178-5
52. Kopriva F. Alergická rýma. *Pediatr. Prax* 2006;2:75-84
53. Wiener AS, Zieve I, Fries JH. The inheritance of allergic disease. *Ann Eugen* 1936;7:141-162.
54. Spain WC and Cooke RA. Studies in specific hypersensitiveness XI. The familial occurrence of hay fever and bronchial asthma. *J Immunol* 1924;9:521-569.
55. Cohen SG. Asthma among the famous. A continuing series. *Allergy Asthma Proc.* 1998;19(2):106-112.
56. Cooke RA and Vander Veer A.: Human sensitization. *J Immunol* 1916;1:201-305.
57. Bucher, CS and Keller, CE. The inheritance of allergy. *J. Allergy* 1934;5:611-14.
58. Adkinson, J. The behavior of bronchial asthma as an inherited character. *Genetics* 1920;5:363-417.
59. Richards, MH and Balyeat, R. The inheritance of allergy with special reference to migraine. *Genetics* 1933;18:129-46
60. Schwartz M. Heredity in bronchial asthma. *Acta Allergol* 1952;5(Suppl).
61. Nieminen MM, Kaprio J, Koskenvuo M. A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest.* 1991 Jul;100(1):70-5.

62. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, Freeman AF, Demidowich A, Davis J, Turner ML, Anderson VL, Darnell DN, Welch PA, Kuhns DB, Frucht DM, Malech HL, Gallin JI, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Musser JM, Woellner C, Schäffer AA, Puck JM, Grimbacher B. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1608-19.
63. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2007;448(7157):1058-62.
64. Palmer LJ, Burton PR, James AL, Musk AW, Cookson WO. Familial aggregation and heritability of asthma-associated quantitative traits in a population-based sample of nuclear families. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8: 853-60.
65. Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *J Pediatr;* 2008; 84 (Suppl): 68-75. Epub 2008 Aug 6.
66. Pohunek P. Průduškové astma v dětském věku. Praha: Maxdorf; 2009. p. 1-27.
67. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med.* 2003; 24: 160-9.
68. Saito S, Terasaki PI, Rachelefsky GS, Park MS, Mickey MR. B-lymphocyte haplotypes in asthma families. *Transplant Proc.* 1977;9(Suppl 1):127-32.
69. Oehling A, Baena-Cagnani CE, Sanz ML, Crisci CD. HLA and pollinosis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 1979 Nov-Dec;7(6):423-6.
70. Brady RE, Glovsky MM, Opelz G, Terasaki P, Malish DM. The association of an HLA 'asthma-associated' haplotype and immediate hypersensitivity in familial asthma. *J Immunogenet.* 1981 Dec;8(6):509-17.
71. Nakai Y, Kano T, Moriuchi J, Wakisaka A, Aizawa M, Tsuneta H, Togashi K, Sakiyama Y, Wagatsuma Y, Matsumoto S. Association between the MB system and asthma in the Japanese. *Hum Immunol.* 1982 Jun;4(3):265-70.
72. Meyers DA, Hasstedt SJ, Marsh DG, Skolnick M, King MC, Bias WB, Amos DB. The inheritance of immunoglobulin E: genetic linkage analysis. *Am J Med Genet.* 1983 Dec;16(4):575-81.

73. Bruce CA, Bias WB, Norman PS, Lightenstein LM, Marsh DG. Studies of HLA antigen frequencies, IgE levels, and specific allergic sensitivities in patients having ragweed hayfever, with and without asthma. *Clin Exp Immunol.* 1976 Jul;25(1):67-72.
74. Blumenthal MN, Yunis E, Gleich G, Mendell N, Stoy P, Walsh G, Roitman-Johnson B. Lack of association of the immune response to ragweed antigen E, Ra3 and Ra5 with the HLA system. *J Immunogenet.* 1981 Oct;8(5):379-86.
75. Mendell NR, Amos DB, Blumenthal MN, Gleich GJ, Yunis EJ. Ra3 skin test response and HLA-A2, antigen E, and IgE: evidence of interactions between antigen E and HLA. *Hum Immunol.* 1982 Feb;4(1):63-70.
76. Quiralte J, Llanes E, Barral P, Arias de Saavedra JM, Sáenz de San Pedro B, Villalba M, Florido JF, Rodríguez R, Lahoz C, Cárdbaba B. Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. *Allergy.* 2005;60(3):360-5.
77. Cárdbaba B, Vilches C, Martín E, de Andrés B, del Pozo V, Hernández D, Gallardo S, Fernández JC, Villalba M, Rodríguez R, Basomba A, Kreisler M, Palomino P, Lahoz C. DR7 and DQ2 are positively associated with immunoglobulin-E response to the main antigen of olive pollen (Ole e I) in allergic patients. *Hum Immunol.* 1993;38(4):293-9.
78. Stephan V, Schmid V, Frischer T, Sparholt S, Forster J, Wahn V, Kuehr J. Mite allergy, clinical atopy, and restriction by HLA class II immune response genes. *Pediatr Allergy Immunol.* 1996 Feb;7(1):28-34.
79. Torío A, Sánchez-Guerrero I, Muro M, Herrero N, Pagán J, Minguela A, Marín L, Moya-Quiles MR, Sanchís MJ, Alvarez-López MR. Analysis of the phenotypic distribution of HLA class I and class II in atopic and non-atopic asthma patients. *Eur J Immunogenet.* 2000 Apr;27(2):81-5.
80. Ivković-Jureković I, Zunec R, Balog V, Grubić Z. The distribution of HLA alleles among children with atopic asthma in Croatia. *Coll Antropol.* 2011 Dec;35(4):1243-9.
81. Kauppinen A, Peräsaari J, Taivainen A, Kinnunen T, Saarelainen S, Rytönen-Nissinen M, Jeal H, Jones M, Virtanen T. Association of HLA class II alleles with sensitization to cow dander Bos d 2, an important occupational allergen. *Immunobiology.* 2012;217(1):8-12.

82. Granada M, Wilk JB, Tuzova M, Strachan DP, Weidinger S, Albrecht E, Gieger C, Heinrich J, Himes BE, Hunninghake GM, Celedón JC, Weiss ST, Cruikshank WW, Farrer LA, Center DM, O'Connor GT. A genome-wide association study of plasma total IgE concentrations in the Framingham Heart Study. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Mar;129(3):840-845.
83. Potaczek DP, Kabesch M. Current concepts of IgE regulation and impact of genetic determinants. *Clin Exp Allergy.* 2012 Jun;42(6):852-71. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03953.x.
84. Šeda, Ondřej, František Liška, a Lucie Šedová. "Genetika komplexních znaků." *Aktuální genetika.* 2005-2006. <http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/genetika_komplexnich_znaku.htm>.
85. Cookson WOCM, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Le Souef PN, Nakamuura Y, Lathrop GM, Hopkin JM. Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 1992;340:381-84
86. Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, Young RP, Nakamura Y, Lathrop GM, Cookson WOCM, Ra C, Nakamuura Y, Lathrop GM, Hopkin JM. Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. *Lancet.* 1993 Feb 6;341(8841):332-4.
87. Hill MR, James AL, Faux JA, Ryan G, Hopkin JM, le Souef P, Musk AW, Cookson WO. Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ.* 1995 Sep 23;311(7008):776-9.
88. Li A, Hopkin JM. Atopy phenotype in subjects with variants of the beta subunit of the high affinity IgE receptor. *Thorax.* 1997 Jul;52(7):654-5.
89. Rigoli L, Salpietro DC, Lavalle R, Cafiero G, Zuccarello D, Barberi I. Allelic association of gene markers on chromosome 11q in Italian families with atopy. *Acta Paediatr.* 2000 Sep;89(9):1056-61.
90. Marsh DG, Myers DA. A major gene for allergy-fact or fancy? *Nat Genet.* 1992;2:252-4.
91. Coleman R, Trembath RC, Harper JI. Chromosome 11q13 and atopy underlying atopic eczema. *Lancet.* 1993 May 1;341(8853):1121-2.
92. Amelung PJ, Postma DS, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER. Exclusion of chromosome 11q and the FcepsilonRI-beta gene as

- aetiological factors in allergy and asthma in a population of Dutch asthmatic families. *Clin Exp Allergy*. 1998 Apr;28(4):397-403.
93. Hizawa N, Yamaguchi E, Ohe M, Itoh A, Furuya K, Ohnuma N, Kawakami Y. Lack of linkage between atopy and locus 11q13. *Clin Exp Allergy*. 1992 Dec;22(12):1065-9.
94. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet*. 1994 Jun;7(2):125-9.
95. Shirakawa T, Hashimoto T, Furuyama J, Takeshita T, Morimoto K. Linkage between severe atopy and chromosome 11q13 in Japanese families. *Clin Genet*. 1994 Sep;46(3):228-32.
96. Kim YK, Son JW, Cho SH, Lee MH, Koh YY, Min KU, Kim YY. Linkage analysis between gene marker of chromosome 11q13, and skin reactivity to common inhalant allergens and bronchial responsiveness in sib-pairs with probands of asthmatic children. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol*. 1998 Dec;18(4):689-700.
97. Young RP, Sharp PA, Lynch JR, Faux JA, Lathrop GM, Cookson WO, Hopkin JM. Confirmation of genetic linkage between atopic IgE responses and chromosome 11q13. *J Med Genet*. 1992 Apr;29(4):236-8.
98. Collée JM, ten Kate LP, de Vries HG, Kliphuis JW, Bouman K, Scheffer H, Gerritsen J. Allele sharing on chromosome 11q13 in sibs with asthma and atopy. *Lancet*. 1993 Oct 9;342(8876):936.
99. Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, Bleecker ER. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics*. 1994 Sep 15;23(2):464-70.
100. Xu J, Levitt RC, Panhuysen CI, Postma DS, Taylor EW, Amelung PJ, Holroyd KJ, Bleecker ER, Meyers DA. Evidence for two unlinked loci regulating total serum IgE levels. *Am J Hum Genet*. 1995 Aug;57(2):425-30.
101. Xu J, Postma DS, Howard TD, Koppelman GH, Zheng SL, Stine OC, Bleecker ER, Meyers DA. Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am J Hum Genet*. 2000 Nov;67(5):1163-73. Epub 2000 Oct 6.

102. Blumenthal MN, Wang Z, Weber JL, Rich SS. Absence of linkage between 5q markers and serum IgE levels in four large atopic families. *Clin Exp Allergy*. 1996 Aug;26(8):892-6.
103. 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. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature*. 1996 Sep 19;383(6597):247-50.
104. Mansur AH, Christie G, Turner A, Bishop DT, Markham AF, Helms P, Morrison JF. Lack of linkage between chromosome 5q23-33 markers and IgE/bronchial hyperreactivity in 67 Scottish families. *Clin Exp Allergy*. 2000 Jul;30(7):954-61.
105. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat Genet*. 1997 Apr;15(4):389-92.
106. McKusick, V.A., Hostetler, J.A., Egeland, J.A. and Eldridge, R. (1964) The distribution of certain genes in the Old Order Amish. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 29, 99–114.
107. Steinberg, A.G., Bleibtreu, H.K., Kurczynski, T.W., Martin, A.O. and Kurczynski, E.M. (1967) Genetic studies in an inbred human isolate. In Crow, J.F. and Neel, J.V. (eds), *Proceedings of the Third International Congress of Human Genetics*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, pp. 267–290.
108. 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. Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. *The Collaborative Study on the Genetics of Asthma. Hum Mol Genet*. 1998 Sep;7(9):1393-8.
109. Hizawa N, Freidhoff LR, Ehrlich E, Chiu YF, Duffy DL, Schou C, Dunston GM, Beaty TH, Marsh DG, Barnes KC, Huang SK. Genetic influences of chromosomes 5q31-q33 and 11q13 on specific IgE responsiveness to common inhaled allergens among African American families. *Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). J Allergy Clin Immunol*. 1998 Sep;102(3):449-53.
110. Zhang Y, Lefort J, Kearsy V, Lapa e Silva JR, Cookson WO, Vargaftig BB. A genome-wide screen for asthma-associated quantitative trait loci in a mouse model of allergic asthma. *Hum Mol Genet*. 1999 Apr;8(4):601-5.

111. Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, Ulbrecht M, Gomolka M, Weiss EH, Jaeger L, Nickel R, Richter K, Kjellman NI, Griese M, von Berg A, Gappa M, Riedel F, Boehle M, van Koningsbruggen S, Schoberth P, Szczepanski R, Dorsch W, Silbermann M, Loesgen S, Scholz M, Bickeböller H, Wichmann HE. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics*. 1999 May 15;58(1):1-8.
112. Malerba G, Trabetti E, Patuzzo C, Lauciello MC, Galavotti R, Pescolliderung L, Boner AL, Pignatti PF. Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children. *Clin Exp Allergy*. 1999 Dec;29 Suppl 4:27-30.
113. Alcaïa A, Plancoulaine S, Abel L. An autosome-wide search for loci underlying wheezing age of onset in German asthmatic children identifies a new region of interest on 6q24-q25. *Genet Epidemiol*. 2001;21 Suppl 1:S168-73.
114. Colilla S, Nicolae D, Pluzhnikov A, Blumenthal MN, Beaty TH, Bleecker ER, Lange EM, Rich SS, Meyers DA, Ober C, Cox NJ; Collaborative Study for the Genetics of Asthma. Evidence for gene-environment interactions in a linkage study of asthma and smoking exposure. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Apr;111(4):840-6.
115. Wise LH. Inclusion of candidate region studies in meta-analysis using the genome screen meta-analysis method: application to asthma data. *Genet Epidemiol*. 2001;21 Suppl 1:S160-5.
116. Denham S, Koppelman GH, Blakey J, Wjst M, Ferreira MA, Hall IP, Sayers I. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir Res*. 2008 Apr 28;9:38. doi: 10.1186/1465-9921-9-38.
117. Bouzigon E, Forabosco P, Koppelman GH, Cookson WO, Dizier MH, Duffy DL, Evans DM, Ferreira MA, Kere J, Laitinen T, Malerba G, Meyers DA, Moffatt M, Martin NG, Ng MY, Pignatti PF, Wjst M, Kauffmann F, Demenais F, Lewis CM. Meta-analysis of 20 genome-wide linkage studies evidenced new regions linked to asthma and atopy. *Eur J Hum Genet*. 2010 Jun;18(6):700-6. doi: 10.1038/ejhg.2009.224. Epub 2010 Jan 13.
118. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, Himes BE, Levin AM, Mathias RA, Hancock DB, Baurley JW, Eng C, Stern DA, Celedón JC, Rafaels N, Capurso D, Conti DV, Roth LA, Soto-Quiros M, Trogias A, Li X,

Myers RA, Romieu I, Van Den Berg DJ, Hu D, Hansel NN, Hernandez RD, Israel E, Salam MT, Galanter J, Avila PC, Avila L, Rodriguez-Santana JR, Chapela R, Rodriguez-Cintron W, Diette GB, Adkinson NF, Abel RA, Ross KD, Shi M, Faruque MU, Dunston GM, Watson HR, Mantese VJ, Ezurum SC, Liang L, Ruczinski I, Ford JG, Huntsman S, Chung KF, Vora H, Li X, Calhoun WJ, Castro M, Sienra-Monge JJ, del Rio-Navarro B, Deichmann KA, Heinzmann A, Wenzel SE, Busse WW, Gern JE, Lemanske RF Jr, Beaty TH, Bleecker ER, Raby BA, Meyers DA, London SJ; Mexico City Childhood Asthma Study (MCAAS), Gilliland FD; Children's Health Study (CHS) and HARBORS study, Burchard EG; Genetics of Asthma in Latino Americans (GALA) Study, Study of Genes-Environment and Admixture in Latino Americans (GALA2) and Study of African Americans, Asthma, Genes & Environments (SAGE), Martinez FD; Childhood Asthma Research and Education (CARE) Network, Weiss ST; Childhood Asthma Management Program (CAMP), Williams LK; Study of Asthma Phenotypes and Pharmacogenomic Interactions by Race-Ethnicity (SAPPHIRE), Barnes KC; Genetic Research on Asthma in African Diaspora (GRAAD) Study, Ober C, Nicolae DL. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet.* 2011 Jul 31;43(9):887-92. doi: 10.1038/ng.888.

119. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, Kumar A, Burney P, Jarvis D, Wjst M, Kogevinas M, Jogi R, Janson C, Franklin KA, Omenaas E, Leynaert B, Pin I, Heinrich J, Probst-Hensch NM, Anto JM, Sunyer J, Maldonado JA, Martinez-Moratalla J, Urrutia I, Payo F, Kauffmann F, Dizier MH, Siroux V, Boznanski A, Braun-Fahrländer C, Genuneit J, Glas J, Horak E, Kabesch M, Pillai SG, Helms PJ, Carlsen K, Carlsen KH, Gerritsen J, Silverman M, Sly P, Tsanakas J, Von Berg A, Whyte M, Blumenthal M, Imboden M, Rochat T, Thun GA, Gerbase MW, Curjuric I, Gaspoz JM, Liu LJ, Wouters IM, Sigsgaard T, Heederik D, Basinas I, Schlunssen V, Omland Ø, Cullinan P, Vermeulen R, Henderson J, Granel R, McArdle WL, Smith GD, James AL, Hui J, Palmer LJ, Beilby J, Musk AW, Laprise C, Hudson TJ, Lemire M, Daley D, Becker A, Chan-Yeung M, Sandford A, Kozyrskyj AL, Paré P, Ferguson A, Dimich-Ward H, Watson WT, Freidin MB, Bragina Elu, Deev IA, Deeva EV, Kobyakova OS, Puzyrev VP,

Ogorodova LM, Khusnutdinova EK, Karunas AS, Fedorova YY, Hall IP, Sayers I, Tobin MD, Wan YI, Heaney LG, Al-Momani BA, Mansur AH, Manney S, Thomson NC, Chaudhuri R, Brightling CE, Bafadhel M, Singapuri A, Niven R, Simpson A, Holloway JW, Howarth PH, Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Melén E, Pershagen G, Bergström A, Kull I, Nyberg F, Wickman M, Söderhäll C, Kere J, Postma DS, Kerckhof M, Brunekreef B, Smit HA, de Jongste JC, Wijga A, Aalberse RC, Hoekstra MO, Koppelman GH, Binia A, Chung KF, Bhavsar P, Chow F, Macedo P, Menzies-Gow A, van Stiphout N, Bush A, Lee YA, Esparza-Gordillo J, Nickel R, Wahn U, Lau S, Marenholz I, Haahela T, von Hertzen L, Jousilahti P, Laatikainen T, Mäkelä MJ, Vartiainen E, Laitinen T, Balding DJ, Peden JF, Corda E, Lechner D, Besse C, Zelenika D, Boland A, Bacq D, Demonchy S, Blanche H, Kamatani Y, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WO. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010 Sep 23;363(13):1211-21. doi: 10.1056/NEJMoa0906312.

120. Spycher BD, Henderson J, Granell R, Evans DM, Smith GD, Timpson NJ, Sterne JA. Genome-wide prediction of childhood asthma and related phenotypes in a longitudinal birth cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Aug;130(2):503-9.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2012.06.002.

121. Wan YI, Shrine NR, Soler Artigas M, Wain LV, Blakey JD, Moffatt MF, Bush A, Chung KF, Cookson WO, Strachan DP, Heaney L, Al-Momani BA, Mansur AH, Manney S, Thomson NC, Chaudhuri R, Brightling CE, Bafadhel M, Singapuri A, Niven R, Simpson A, Holloway JW, Howarth PH, Hui J, Musk AW, James AL; Australian Asthma Genetics Consortium, Brown MA, Baltic S, Ferreira MA, Thompson PJ, Tobin MD, Sayers I, Hall IP. Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. *Thorax.* 2012 Sep;67(9):762-8. Epub 2012 May 5.

122. Blumenthal MN, Langefeld CD, Beaty TH, Bleecker ER, Ober C, Lester L, Lange E, Barnes KC, Wolf R, King RA, Solway J, Oetting W, Meyers DA, Rich SS. A genome-wide search for allergic response (atopy) genes in three ethnic groups: Collaborative Study on the Genetics of Asthma. *Hum Genet.* 2004 Jan;114(2):157-64. Epub 2003 Oct 25.

123. Bouzigon E, Dizier MH, Krähenbühl C, Lemainque A, Annesi-Maesano I, Betard C, Bousquet J, Charpin D, Gormand F, Guillaud-Bataille M, Just J, Le Moual N, Maccario J, Matran R, Neukirch F, Oryszczyn MP, Paty E, Pin I, Rosenberg-Bourgin M, Vervloet D, Kauffmann F, Lathrop M, Demenais F. Clustering patterns of LOD scores for asthma-related phenotypes revealed by a genome-wide screen in 295 French EGEA families. *Hum Mol Genet.* 2004 Dec 15;13(24):3103-13. Epub 2004 Oct 27.
124. Bradley M, Söderhäll C, Luthman H, Wahlgren CF, Kockum I, Nordenskjöld M. Susceptibility loci for atopic dermatitis on chromosomes 3, 13, 15, 17 and 18 in a Swedish population. *Hum Mol Genet.* 2002 Jun 15;11(13):1539-48.
125. Colilla S, Tsalenko A, Pluznikov A, Cox NJ. Genome-wide approaches for identifying interacting susceptibility regions for asthma. *Genet Epidemiol.* 2001;21 Suppl 1:S266-71.
126. 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. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature.* 2002 Jul 25;418(6896):426-30. Epub 2002 Jul 10.
127. Jiang Y, Slager SL, Huang J. Genome scan for linkage to asthma using a linkage disequilibrium-lod score test. *Genet Epidemiol.* 2001;21 Suppl 1:S303-7.
128. Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, Bleeker ER, Meyers DA, Postma DS. Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Mar;109(3):498-506.
129. Stassen HH, Scharfetter C. Oligogenic approaches to the predisposition of asthma in ethnically diverse populations. *Genet Epidemiol.* 2001;21 Suppl 1:S284-9.
130. Xu J, Meyers DA, Ober C, Blumenthal MN, Mellen B, Barnes KC, King RA, Lester LA, Howard TD, Solway J, Langefeld CD, Beaty TH, Rich SS, Bleeker ER, Cox NJ; Collaborative Study on the Genetics of Asthma. Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three U.S.

- populations: collaborative study on the genetics of asthma. *Am J Hum Genet.* 2001 Jun;68(6):1437-46. Epub 2001 May 10.
131. Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, Nishihara M, Yamakawa-Kobayashi K, Takeda K, Imoto N, Ichikawa K, Matsui A, Hamaguchi H, Arinami T. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics.* 2000 Jun 1;66(2):152-60.
132. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. EDN1 Gene-GeneCards / EDN1 protein / EDN1 antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-19]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EDN1&search=EDN1>
133. Webb DJ, Monge JC, Rabelink TJ, Yanagisawa M. Endothelin: new discoveries and rapid progress in the clinic. *Trends Pharmacol Sci.* 1998 Jan;19(1):5-8.
134. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. EDNRA Gene-GeneCards / EDNRA protein / EDNRA antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-19]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EDNRA&search=EDNRA>
135. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. EDNRB Gene-GeneCards / EDNRB protein / EDNRB antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-19]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EDNRB&search=EDNRB>
136. Mao XQ, Gao PS, Roberts MH, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Shaldon SR, Coull P, Dake Y, Adra CN, Hagihara A, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of endothelin-1 and its receptors in atopic asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Aug 19;262(1):259-62.
137. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science.* 1994 May 20;264(5162):1152-6.
138. Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, Meyers DA, Levitt RC. Genetic susceptibility to

- asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med*. 1995 Oct 5;333(14):894-900.
139. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. ADRB2 Gene-GeneCards / ADRB2 protein / ADRB2 L antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-16]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRB2>
140. Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry*. 1994 Aug 16;33(32):9414-9.
141. Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB. Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Jul;13(1):25-33.
142. Holroyd KJ, Levitt RC, Dragwa C, Amelung PJ, Panhuysen CM, Meyers DA, Bleecker ER, Postma DS. Evidence for $\beta 2$ adrenergic receptor (ADRB2) polymorphism at amino acid 16 as a risk factor for bronchial hyperresponsiveness (BHR) [abstract] *Am J Respir Crit Care Med*, 151 (1995), p. A673
143. Turki J, Pak J, Green S, Martin R, Liggett SB. Genetic polymorphisms of the $\beta 2$ adrenergic receptor in nocturnal and non-nocturnal asthma: evidence that Gly 16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest*, 95 (1995), pp. 1635–1641
144. Hall IP, Wheatley A, Wilding P, Liggett SB. Association of Glu 27 beta 2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *Lancet*. 1995 May 13;345(8959):1213-4.
145. Dewar JC, Wilkinson J, Wheatley A, Thomas NS, Doull I, Morton N, Lio P, Harvey JF, Liggett SB, Holgate ST, Hall IP. The glutamine 27 beta2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Aug;100(2):261-5.
146. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. IL9 Gene-GeneCards / IL9 protein / IL9 antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-16]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRB2>
147. Nicolaides NC, Holroyd KJ, Ewart SL, Eleff SM, Kiser MB, Dragwa CR, Sullivan CD, Grasso L, Zhang LY, Messler CJ, Zhou T, Kleeberger SR, Buetow KH, Levitt RC. Interleukin 9: a candidate gene for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13175-80.

148. Temann UA, Laouar Y, Eynon EE, Homer R, Flavell RA. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol*. 2007 Jan;19(1):1-10. Epub 2006 Nov 13.
149. Laitinen T, Kauppi P, Ignatius J, Ruotsalainen T, Daly MJ, Kääriäinen H, Kruglyak L, Laitinen H, de la Chapelle A, Lander ES, Laitinen LA, Kere J. Genetic control of serum IgE levels and asthma: linkage and linkage disequilibrium studies in an isolated population. *Hum Mol Genet*. 1997 Nov;6(12):2069-76.
150. Levitt RC, McLane MP, MacDonald D, Ferrante V, Weiss C, Zhou T, Holroyd KJ, Nicolaidis NC. IL-9 pathway in asthma: new therapeutic targets for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 May;103(5 Pt 2):S485-91.
151. Niimi T, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Zhou Y, Levitt RC, Kimura S. UGRP1, a uteroglobin/Clara cell secretory protein-related protein, is a novel lung-enriched downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor. *Mol Endocrinol* 2001; 15:2021–36.
152. Niimi T, Munakata M, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Levitt RC, Hisada M, Kimura S. A polymorphism in the human UGRP1 gene promoter that regulates transcription is associated with an increased risk of asthma. *Am J Hum Genet*. 2002 Mar;70(3):718-25. Epub 2002 Jan 25.
153. Jian Z, Nakayama J, Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T. No evidence for association between the -112G/A polymorphism of UGRP1 and childhood atopic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003 Jul;33(7):902-4.
154. Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, Strominger JL, Spies T. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(23):8535-9.
155. National Center for Biotechnology Information. LTA lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1) [Homo sapiens] updated 2013-01-06 [citované 2013-01-16] Dostupné na World Wide Web:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=4049>

156. Shah A, Church MK, Holgate ST. Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1038-44.
157. Anticevich SZ, Hughes JM, Black JL, Armour CL. Induction of human airway hyperresponsiveness by tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Pharmacol* 1995;284:221-5.
158. Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ, Coburn DA, Federman EC, Wasserman SI. Cytokines in symptomatic asthma airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1992 May;89(5):958-67.
159. Virchow JC Jr, Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, Kroegel C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Apr;151(4):960-8.
160. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med.* 1991 Jan 1;173(1):209-19.
161. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, di Giovine FS, Duff GW. Effects of a Tumour Necrosis Factor (TNF α) promoter base transition on transcriptional activity. *Br J Rheumatol.* 1994;33(suppl 1):89
162. Moffatt MF, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet.* 1997 Apr;6(4):551-4.
163. Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Goldblatt J, Lesouëf PN. Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 1998 May;28(5):578-84.
164. Trabetti E, Patuzzo C, Malerba G, Galavotti R, Martinati LC, Boner AL, Pignatti PF. Association of a lymphotoxin alpha gene polymorphism and atopy in Italian families. *J Med Genet.* 1999 Apr;36(4):323-5.
165. Howell WM, Turner SJ, Hourihane JO, Dean TP, Warner JO. HLA class II DRB1, DQB1 and DPB1 genotypic associations with peanut allergy: evidence from a family-based and case-control study. *Clin Exp Allergy.* 1998 Feb;28(2):156-62.
166. Moffatt MF, Schou C, Faux JA, Abecasis GR, James A, Musk AW, Cookson WOCM. Association between quantitative traits

- underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample. *Eur J Hum Genet.* 2001 May;9(5):341-6.
167. Hizawa N, Collins G, Rafnar T, Huang SK, Duffy DL, Weber JL, Freidhoff LR, Ehrlich E, Marsh DG, Beaty TH, Barnes KC. Linkage analysis of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by the transmission/disequilibrium test. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Sep;102(3):443-8.
168. Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petäys T, Green T, Cargill M, Haahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ, Kere J. A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet.* 2001 May;28(1):87-91.
169. Polvi A, Polvi T, Sevon P, Petäys T, Haahtela T, Laitinen LA, Kere J, Laitinen T. Physical map of an asthma susceptibility locus in 7p15-p14 and an association study of TCRG. *Eur J Hum Genet.* 2002 Oct;10(10):658-65.
170. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Mäkelä S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A, Zucchelli M, Gullstén H, Leino M, Alenius H, Petäys T, Haahtela T, Laitinen A, Laprise C, Hudson TJ, Laitinen LA, Kere J. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science.* 2004 Apr 9;304(5668):300-4.
171. Malerba G, Lindgren CM, Xumerle L, Kiviluoma P, Trabetti E, Laitinen T, Galavotti R, Pescollderung L, Boner AL, Kere J, Pignatti PF. Chromosome 7p linkage and GPR154 gene association in Italian families with allergic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2007 Jan;37(1):83-9.
172. Melén 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; PARSIFAL Genetics Study Group. Haplotypes of G protein-coupled receptor 154 are associated with childhood allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 May 15;171(10):1089-95. Epub 2005 Feb 11.
173. van Herwerden L, Harrap SB, Wong ZY, Abramson MJ, Kutin JJ, Forbes AB, Raven J, Lanigan A, Walters EH. Linkage of high-

- affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy. *Lancet*. 1995 Nov 11;346(8985):1262-5.
174. Dickson PW, Wong ZY, Harrap SB, Abramson MJ, Walters EH. Mutational analysis of the high affinity immunoglobulin E receptor beta subunit gene in asthma. *Thorax*. 1999 May;54(5):409-12.
175. Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Katyal SL, Mukherjee AB. Human Clara cell 10 kDa protein is counterpart of rabbit uteroglobin. *J. Biol. Chem*. 1993;268:20343–20351.
176. Hay JG, Danel C, Chu CS, Crystal RG. Human CC10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease. *Am J Physiol*. 1995 Apr;268(4 Pt 1):L565-75.
177. Clark-Lewis I, Dewald B, Geiser T, Moser B, Baggiolini M. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3574-7.
178. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan S-Y, Rocznik S, Shanafelt AB. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):27348-57.
179. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Torax*. 1999;54: 825–857
180. Mukherjee AB, Kundu GC, Mantile-Selvaggi G, Yuan CJ, Mandal AK, Chattopadhyay S, Zheng F, Pattabiraman N, Zhang Z. Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol Life Sci*. 1999 May;55(5):771-87.
181. Wang H, Long XB, Cao PP, Wang N, Liu Y, Cui YH, Huang SK, Liu Z. Clara cell 10-kD protein suppresses chitinase 3-like 1 expression associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 May 1;181(9):908-16.
182. Long X-B, Hu S, Wang N, Zhen H-T, Cui Y-H, Liu Z. Clara Cell 10-kDa Protein Gene Transfection Inhibits NF- κ B Activity in Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 2012;7(4): e35960. doi:10.1371/journal.pone.0035960
183. Gao PS, Mao XQ, Kawai M, Enomoto T, Sasaki S, Tanabe O, Yoshimura K, Shaldon SR, Dake Y, Kitano H, Coull P, Shirakawa T, Hopkin JM. Negative association between asthma and variants of

CC16(CC10) on chromosome 11q13 in British and Japanese populations. *Hum Genet.* 1998 Jul;103(1):57-9.

184. Sharma S, Ghosh B. Association of an intragenic microsatellite marker in the CC16 gene with asthma in the Indian population. *J Hum Genet.* 2004;49(12):677-83. Epub 2004 Nov 12.

185. Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP, Levett PN, Renault B, Kucherlapati R, Iozzino S, Ehrlich E, Beaty TH, Marsh DG. Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics.* 1996 Oct 1;37(1):41-50.

186. Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG. Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study. *Genomics.* 1997 Nov 15;46(1):159-62.

187. Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 67:1154–1162.

188. Haagerup, A., Bjerke, T., Schiøtz, P.O., Binderup, H.G., Dahl, R. and Kruse, T.A. (2002) Asthma and atopy—a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy*, 57:680–686.

189. Raby BA, Silverman EK, Lazarus R, Lange C, Kwiatkowski DJ, Weiss ST. Chromosome 12q harbors multiple genetic loci related to asthma and asthma-related phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2003 Aug 15;12(16):1973-9.

190. Malerba G, Lauciello MC, Scherpbier T, Trabetti E, Galavotti R, Cusin V, Pescollderung L, Zanoni G, Martinati LC, Boner AL, Levitt RC, Pignatti PF. Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Oct;162(4 Pt 1):1587-90.

191. Grasmann H. Genetics of the neuronal NO synthase (NOS1) in the etiology of bronchial asthma. *Pneumologie.* 2001 Aug;55(8):390-5.

192. Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y. Linkage and

- association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J Hum Genet.* 2004;49(3):115-22. Epub 2004 Feb 7.
193. Kimura K, Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Yokouchi Y, Takeda K, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A, Hamaguchi H. Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population. *Hum Mol Genet.* 1999 Aug;8(8):1487-90.
194. Hizawa N, Freidhoff L, Chiu Y, Ehrlich E, Luehr C, Anderson J, Duffy D, Dunston G, Weber J, Huang S, Barnes K, Marsh D, Beaty T. Genetic regulation of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness: A genome-wide multipoint linkage analysis in families recruited through 2 asthmatic sibs. Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1998;102: 436-442.
195. Bhattacharyya S, Leaves NI, Wiltshire S, Cox R, Cookson WOCM. A high-density genetic map of the chromosome 13q14 atopy locus. *Genomics.* 2000 Dec 15;70(3):286-91.
196. Anderson GG, Leaves NI, Bhattacharyya S, Zhang Y, Walshe V, Broxholme J, Abecasis G, Levy E, Zimmer M, Cox R, Cookson WOCM. Positive association to IgE levels and a physical map of the 13q14 atopy locus. *Eur J Hum Genet.* 2002 Apr;10(4):266-70.
197. 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 JJ, Abecasis G, Cardon L, White M, Burton J, Matthews L, Mott R, Ross M, Cox R, Moffatt MF, Cookson WOCM. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat Genet.* 2003 Jun;34(2):181-6.
198. Jang N, Stewart G, Jones G. Polymorphisms within the PHE11 gene at chromosome 13q14 are associated with childhood atopic dermatitis. *Genes Immun.* 2005 May;6(3):262-4.
199. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. TRA@ Gene-GeneCards / TRA@ gene cluster. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-16]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRA@&search=TCRA>
200. Moffatt MF, Hill MR, Faux JA, Young RP, Cookson WOCM, Cornélis F, Schou C, James AL, Ryan G, Musk AW, le Souef P,

- Hopkin JM. Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses. *Lancet*. 1994 Jun 25;343(8913):1597-600.
201. Venanzi S, Malerba G, Galavotti R, Lauciello MC, Trabetti E, Zanoni G, Pescollderung L, Martinati LC, Boner AL, Pignatti PF. Linkage to atopy on chromosome 19 in north-eastern Italian families with allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2001 Aug;31(8):1220-4.
202. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. FCER2 Gene-GeneCards / FCER2 protein / FCER2 antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-21]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FCER2&search=CD23>
203. Laitinen T, Ollikainen V, Lázaro C, Kauppi P, de Cid R, Antó JM, Estivill X, Lokki H, Mannila H, Laitinen LA, Kere J. Association study of the chromosomal region containing the FCER2 gene suggests it has a regulatory role in atopic disorders. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Mar;161(3 Pt 1):700-6.
204. Gerard NP, Hodges MK, Drazen JM, Weller PF, Gerard C. Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J Biol Chem*. 1989 Jan 25;264(3):1760-6.
205. Haviland DL, McCoy RL, Whitehead WT, Akama H, Molmenti EP, Brown A, Haviland JC, Parks WC, Perlmutter DH, Wetsel RA. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol*. 1995 Feb 15;154(4):1861-9.
206. Drouin SM, Kildsgaard J, Haviland J, Zabner J, Jia HP, McCray PB Jr, Tack BF, Wetsel RA. Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J Immunol*. 2001 Feb 1;166(3):2025-32.
207. Bao L, Gerard NP, Eddy RL Jr, Shows TB, Gerard C. Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. *Genomics*. 1992 Jun;13(2):437-40.
208. Barnes KC, Caraballo L, Muñoz M, Zambelli-Weiner A, Ehrlich E, Burki M, Jimenez S, Mathias RA, Stockton ML, Deindl P, Mendoza L, Hershey GK, Nickel R, Wills-Karp M. A novel promoter polymorphism in the gene encoding complement component 5 receptor 1 on chromosome 19q13.3 is not associated

- with asthma and atopy in three independent populations. *Clin Exp Allergy*. 2004 May;34(5):736-44.
209. Ferreira MA, O'Gorman L, Le Souëf P, Burton PR, Toelle BG, Robertson CF, Visscher PM, Martin NG, Duffy DL. Robust estimation of experimentwise P values applied to a genome scan of multiple asthma traits identifies a new region of significant linkage on chromosome 20q13. *Am J Hum Genet*. 2005 Dec;77(6):1075-85. Epub 2005 Oct 14.
210. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. CD40L Gene-GeneCards / CD40 L protein / CD40 L antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-16]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD40>
211. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. CD40 Gene-GeneCards / TNFR5 protein / TNFR5 antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-16]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD40>
212. Mehlhop PD, van de Rijn M, Brewer JP, Kisselgof AB, Geha RS, Oettgen HC, Martin TR. CD40L, but not CD40, is required for allergen-induced bronchial hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Nov;23(5):646-51.
213. Anantharaman R, Andiappan AK, Nilkanth PP, Suri BK, Wang de Y, Chew FT. Genome-wide association study identifies PERLD1 as asthma candidate gene. *BMC Med Genet*. 2011 Dec 21;12:170. doi: 10.1186/1471-2350-12-170.
214. Halapi E, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Bjornsdottir US, Thorleifsson G, Helgadóttir H, Williams C, Koppelman GH, Heinzmann A, Boezen HM, Jonasdottir A, Blondal T, Gudjonsson SA, Jonasdottir A, Thorlacius T, Henry AP, Altmueller J, Krueger M, Shin HD, Uh ST, Cheong HS, Jonsdottir B, Ludviksson BR, Ludviksdottir D, Gislason D, Park CS, Deichmann K, Thompson PJ, Wjst M, Hall IP, Postma DS, Gislason T, Kong A, Jonsdottir I, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma. *Eur J Hum Genet*. 2010 Aug; 18(8):902-8.
215. Li X, Howard TD, Zheng SL, Haselkorn T, Peters SP, Meyers DA, Bleeker ER. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb; 125(2):328-335.e11.

216. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SA, Wong KC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, von Mutius E, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WOCM. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):470-3. Epub 2007 Jul 4.
217. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006; 7: 95-100.
218. Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, Van Vlasselaer P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol*. 1991 Jul 1;147(1):8-13.
219. Bonnefoy JY, Gauchat JF, Life P, Graber P, Aubry JP, Lecoanet-Henchoz S. Regulation of IgE synthesis by CD23/CD21 interaction. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 May-Jun;107(1-3):40-2.
220. Linehan LA, Warren WD, Thompson PA, Grusby MJ, Berton MT. STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol*. 1998 Jul 1;161(1):302-10.
221. Wesemann DR, Magee JM, Boboila C, Calado DP, Gallagher MP, Portuguese AJ, Manis JP, Zhou X, Recher M, Rajewsky K, Notarangelo LD, Alt FW. Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S μ to S ϵ recombination. *J Exp Med*. 2011 Dec 19;208(13):2733-46. doi: 10.1084/jem.20111155. Epub 2011 Dec 5.
222. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 stat. *Science* 1994;265:1701-6.
223. Quelle FW, Shimoda K, Thierfelder W, Fischer C, Kim A, Ruben SM, Cleveland JL, Pierce JH, Keegan AD, Nelms K, Paul WE and Ihle JN. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to Il-4 and Il-3 but are not required for mitogenesis. *Molecular and cellular biology* 1995;15:3336-43.
224. THE GENECARDS HUMAN GENE DATABASE. STAT6 Gene - GeneCards / STAT6 protein / STAT6 antibody. [online]. 1996-2013-, [citované. 2013-01-23]. Dostupné na World Wide Web:

[http://www.genecards.org/cgi-](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT6&search=stat6)

[bin/carddisp.pl?gene=STAT6&search=stat6](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT6&search=stat6)

225. Patel B.K., Keck C.L., O'Leary R.S., Popescu N.C. and LaRochelle W.J. Localization of the human stat6 gene to chromosome 12q13.3–q14.1, a region implicated in multiple solid tumors. *Genomics* 1998;52:192–200.

226. Patel BK, Wang LM, Lee CC, Taylor WG, Pierce JH, LaRochelle WJ. Stat6 and Jak1

are common elements in platelet-derived growth factor and interleukin-4 signal transduction

pathways in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1996;271:22175-82.

227. Patel BK, Pierce JH, LaRochelle WJ. Regulation of interleukin 4-mediated signaling

by naturally occurring dominant negative and attenuated forms of human Stat6.

Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:172-7.

228. Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, Duschl A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(3):173-88.

229. Schedel M, Frei R, Bieli Ch, Cameron L, Adamski J, Lauener R and Kabesch M. An IgE-associated polymorphism in STAT6 alters NF-kB binding, STAT6 promoter activity, and mRNA expression. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(3):583-9.

230. Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat 4 and Stat6. *Oncogene.* 2000;19(21):2577-84.

231. Xu X, Sun YL, Hoey T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science.* 1996;273(5276):794-7.

232. Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE Jr. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J.* 1996;15(20):5616-26.

233. Chen W, Daines MO, Hershey GK Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity. *J Immunol.* 2004 Jun 1;172(11):6744-50.

234. Musacchio A, Gibson T, Lehto VP, Saraste M. SH3, an abundant protein domain in search of a function. *FEBS Lett* 1992;307:55–61.

235. Morton CJ, Campbell ID. SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr Biol* 1994;4:615–617.
236. Pawson T, Gish GD. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 1992;71:359–62.
237. Mikita T, Daniel C, Wu P, Schindler U. Mutational analysis of the STAT6 SH2 domain. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17634-42.
238. Litterst CM, Pfitzner E. Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1. *J Biol Chem*. 2001;276(49):45713-21.
239. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 1996; 4:313–9.
240. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*. 1996; 380:630–3.
241. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 1996; 380:627–30.
242. Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol*. 2011 Jul;23(7):415-20. doi: 10.1093/intimm/dxr029. Epub 2011 Jun 1.
243. Wurster AL, Rodgers VL, White MF, Rothstein TL, Grusby MJ. Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J Biol Chem*. 2002; 277:27169–75.
244. Takeda K, Kamanaka M, Tanaka T, Kishimoto T, Akira S. Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J Immunol*. 1996; 157:3220–2.
245. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:451–83.
246. Yao Y, Li W, Kaplan MH, Chang CH. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005; 201:1899–903.
247. Khaled WT, Read EK, Nicholson SE, Baxter FO, Brennan AJ, Came PJ, Sprigg N, McKenzie AN,

- Watson CJ. The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development*. 2007; 134:2739–50.
248. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, Elias JA, Sheppard D, Erle DJ. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med*. 2002; 8:885–9
249. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*. 1995 Feb;11(2):69-74.
250. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today*. 2000 Feb;21(2):60-4.
251. Chatila TA. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med*. 2004 Oct;10(10):493-9.
252. Khan MM. „Cytokine receptors and signaling.“ *Immunopharmacology*. New York: Springer, 2008. 61-86. Tlač. ISBN 978-0-387-77975-1
253. Tanner JW, Chen W, Young RL, Longmore GD, Shaw AS. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem*. 1995 Mar 24;270(12):6523-30.
254. Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K, Schindler U. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10):5811-20.
255. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: Biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
256. Fenghao X, Saxon A, Nguyen A, Ke Z, Diaz-Sanchez D, Nel A. Interleukin 4 activates a signal transducer and activator of transcription (Stat) protein which interacts with an interferongamma activation site-like sequence upstream of the I ypsilon exon in a human B cell line. Evidence for the involvement of Janus kinase 3 and interleukin-4 Stat. *J Clin Invest*. 1995;96:907–14.
257. Schindler U, Wu P, Rothe M, Brasseur M, McKnight SL. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity*. 1995;2:689–97.

258. Elo LL, Jarvenpaa H, Tuomela S, Raghav S, Ahlfors H, Laurila K, Gupta B, Lund RJ, Tahvanainen J, Hawkins RD, Oresic M, Lahdesmaki H, Rasool O, Rao KV, Aittokallio T, Lahesmaa R. Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming. *Immunity*. 2010;32:852–62.
259. Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K, Schindler U. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol*. 1996 Oct;16(10):5811–5820
260. Messner B, Stütz AM, Albrecht B, Peiritsch S, Woisetschläger M. Cooperation of binding sites for STAT6 and NF kappa B/rel in the IL-4-induced up-regulation of the human IgE germline promoter. *J Immunol*. 1997 Oct 1;159(7):3330-7.
261. Qiu G, Stavnezer J. Overexpression of BSAP/Pax-5 inhibits switching to IgA and enhances switching to IgE in the I.29 mu B cell line. *J Immunol*. 1998 Sep 15;161(6):2906-18.
262. Stütz AM and Woisetschläger M. Functional synergism of STAT6 with either NF-kB or PU.1 to mediate IL-4-induced activation of IgE germline gene transcription. *The Journal of Immunology* 1999;163:4383-91.
263. Litterst CM, Pfitzner E. An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36052-60. Epub 2002 Jul 22.
264. Yang J, Aittomäki S, Pesu M, Carter K, Saarinen J, Kalkkinen N, Kieff E, Silvennoinen O. Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II. *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4950-8.
265. Välineva T, Yang J, Silvennoinen O. Characterization of RNA helicase A as component of STAT6-dependent enhanceosome. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(14):3938-46. Epub 2006 Aug 12.
266. Tamura K, Arakawa H, Suzuki M, Kobayashi Y, Mochizuki H, Kato M, Tokuyama K, Morikawa A. Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(10):1509-14.
267. Duetsch G, Illig T, Loesgen S, Rohde K, Klopp N, Herbon N, Gohlke H, Altmueller J, Wjst M. STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum Mol Genet*. 2002;11(6):613-21.

268. Gao PS, Heller NM, Walker W, Chen CH, Moller M, Plunkett B, Roberts MH, Schleimer RP, Hopkin JM, Huang SK. Variation in dinucleotide (GT) repeat sequence in the first exon of the STAT6 gene is associated with atopic asthma and differentially regulates the promoter activity in vitro. *J Med Genet.* 2004;41(7):535-9.
269. Nagarkatti R, B-Rao C, Vijayan V, Sharma SK, Ghosh B. Signal transducer and activator of transcription 6 haplotypes and asthma in the Indian population. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31(3):317-21. Epub 2004 Apr 22
270. Schedel M, Carr D, Klopp N, Woitsch B, Illig T, Stachel D, Schmid I, Fritzscher C, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M. A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. 2004;114(5):1100-5.
271. Weidinger S, Klopp N, Wagenpfeil S, Rummeler L, Schedel M, Kabesch M, Schäfer T, Darsow U, Jakob T, Behrendt H, Wichmann HE, Ring J, Illig T. Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. *J Med Genet.* 2004;41(9):658-63.
272. Pykäläinen M, Kinoshita R, Valkonen S, Rydman P, Kilpeläinen M, Laitinen LA, Karjalainen J, Nieminen M, Hurme M, Kere J, Laitinen T and Riitta Lahesmaa R. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *Journal of allergy and clin. immunol* 2005;115(1):1100-5.
273. Huang CZ, Zou D, Yang J, Qiao HL. Polymorphisms of STAT6 and specific serum IgE levels in patients with penicillin allergy. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2012;50(7):461-7.
274. Leung TF, Chan IH, Wong GW, Li CY, Tang NL, Yung E and Lam CW. Association between candidate genes and lung function growth in Chinese asthmatic children. *Clinical and Experimental Allergy* 2007;37:1480-6.
275. Li CY, Leung TF, Tang NL, Wong GW, Sung YM, Chan IH, Lam CW, Fok TF. STAT6 in17SNP1 and in18SNP1 polymorphisms are not associated with asthma or atopy in Chinese children. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(Suppl):S205.
276. Wang Q, Bai XT, Xu DQ, Li H, Xu CY, Fang JL. Association of polymorphisms of STAT6 and SO(2) with Chinese childhood asthma: a case-control study. *Biomed Environ Sci.* 2011;24(6):670-7.

277. Granada M, Wilk JB, Tuzova M, Strachan DP, Weidinger S, Albrecht E, Gieger C, Heinrich J, Himes BE, Hunninghake GM, Celedón JC, Weiss ST, Cruikshank WW, Farrer LA, Center DM, O'Connor GT. A genome-wide association study of plasma total IgE concentrations in the Framingham Heart Study. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(3):840-5.e21. Epub 2011 Nov 9.
278. Gao PS, Mao XQ, Roberts MH, Arinobu Y, Akaiwa M, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Sasaki S, Hamasaki N, Izuhara K, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet.* 2000;37(5):380-2.
279. Negoro T, Orihara K, Irahara T, Nishiyama H, Hagiwara K, Nishida R, Takagi H, Satoh K, Yamamoto Y, Shimizu S, Hagiwara T, Ishii M, Tanioka T, Nakano Y, Takeda K, Yoshimura I, Iikura Y, Tobe T. Influence of SNPs in cytokine-related genes on the severity of food allergy and atopic eczema in children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006;17(8):583-90.
280. Amoli MM, Hand S, Hajeer AH, Jones KP, Rolf S, Sting C, Davies BH, Ollier WE. Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy. *Genes Immun.* 2002;3(4):220-4.
281. Wu B, Li YF, Xiong HY and Zhang L. Case- control study of STAT6 gene polymorphisms for asthma in Chongqing. *Immunology Journal,* 2006;22(3):308-10.
282. Powell RM, Wicks J, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE. The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Jul;31(1):13-21. Epub 2004 Jan 23.
283. Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Oct;10(5):654-9.
284. Yoshinaka T, Nishii K, Yamada K, Sawada H, Nishiwaki E, Smith K, Yoshino K, Ishiguro H, Higashiyama S. Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene.* 2002 Jan 9;282(1-2):227-36.
285. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 2003 Jan 1;17(1):7-30.
286. Zou J, Zhu F, Liu J, Wang W, Zhang R, Garlisi CG, Liu YH, Wang S, Shah H, Wan Y, Umland SP. Catalytic activity of human

- ADAM33. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12;279(11):9818-30. Epub 2003 Dec 15.
287. Haitchi HM, Powell RM, Shaw TJ, Howarth PH, Wilson SJ, Wilson DI, Holgate ST, Davies DE. ADAM33 expression in asthmatic airways and human embryonic lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 May 1;171(9):958-65. Epub 2005 Feb 11.
288. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Howarth PH, Haitchi HM, Babu S, Davies DE. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Mar;117(3):496-506; quiz 507.
289. Umland SP, Wan Y, Shah H, Garlisi CG, Devito KE, Braunschweiger K, Gheyas F, Del Mastro R. Mouse ADAM33: two splice variants differ in protein maturation and localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Apr;30(4):530-9. Epub 2003 Sep 11.
290. Kurisaki T, Wakatsuki S, Sehara-Fujisawa A. Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. *FEBS Lett*. 2002 Dec 18;532(3):419-22.
291. Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem*. 1998 Jan 2;273(1):157-66.
292. Lee JY, Park SW, Chang HK, Kim HY, Rhim T, Lee JH, Jang AS, Koh ES, Park CS. A disintegrin and metalloproteinase 33 protein in patients with asthma: Relevance to airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):729-35. Epub 2005 Dec 30.
293. Foley SC, Mogas AK, Olivenstein R, Fiset PO, Chakir J, Bourbeau J, Ernst P, Lemièrre C, Martin JG, Hamid Q. Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Apr;119(4):863-71. Epub 2007 Mar 6.
294. Yang Y, Haitchi HM, Cakebread J, Sammut D, Harvey A, Powell RM, Holloway JW, Howarth P, Holgate ST, Davies DE. Epigenetic mechanisms silence a disintegrin and metalloprotease 33 expression in bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun;121(6):1393-9. Epub 2008 Apr 21.
295. Puxeddu I, Pang YY, Harvey A, Haitchi HM, Nicholas B, Yoshisue H, Ribatti D, Clough G, Powell RM, Murphy G, Hanley

- NA, Wilson DI, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE. The soluble form of a disintegrin and metalloprotease 33 promotes angiogenesis: implications for airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun;121(6):1400-6. Epub 2008 Apr 14.
296. Gaultier A, Cousin H, Darribère T, Alfandari D. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23336-44. Epub 2002 Apr 19.
297. Haitchi HM, Bassett DJ, Bucchieri F, Gao X, Powell RM, Hanley NA, Wilson DI, Holgate ST, Davies DE. Induction of a disintegrin and metalloprotease 33 during embryonic lung development and the influence of IL-13 or maternal allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Sep;124(3):590-7. Epub 2009 Aug 8.
298. Shaffiq A, Haitchi HM, Pang YY, Alangari AA, Jones MG, Marshall BG, Howarth PH, Davies DE, O'Reilly KM. A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 33 protein in patients with pulmonary sarcoidosis. *Respirology*. 2012 Feb;17(2):342-9.
299. Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmüller J, Knapp M, Heinrich J and Wjst M. Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in *ADAM33*. *Clinical and Experimental Allergy* 2004;34:26-31
300. Lee JH, Park H-S, Park SW, Jang AS, Uh ST, Rhim T, Park C-S, Hong S-J, Holgate ST, Holloway JW and Shin HD. *ADAM33* polymorphism: association with bronchial hyper-responsiveness in Korean asthmatics. *Clinical and Experimental Allergy* 2004;34:860-865
301. Hirota T, Hasegawa K, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Shirakawa T, Doi S, Fujita K, Suzuki Y, Nakamura Y and Tamari M. Association between *ADAM33* polymorphisms and adult asthma in the Japanese population. *Clinical and Experimental Allergy* 2006;36:884-891
302. Blakey J Halapi E, Bjornsdottir US, Wheatley A, Kristinsson S, Upmanyu R, Stefansson K, Hakonarson HandHall IP. Contribution of *ADAM33* polymorphisms to the population risk of asthma. *Thorax* 2005;60:274-276
303. Howard TD, Postma D, Jongepier H, Moore W, Koppelman G, Zheng S, Xu J, Bleecker E, Meyers D. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (*ADAM33*) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:717-722

304. Kedda MA, Duffy DL, Bradley B, O'Hehir RE and Thompson P J. ADAM33 haplotypes are associated with asthma in a large Australian population. *European Journal of Human Genetics* 2006;14:1027–1036
305. 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, González Burchard E. ADAM33 is not associated with asthma in Puerto Rican or Mexican populations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(11):1312-6. Epub 2003 Sep 4.
306. Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, Vonk JM, Koppelman GH, Zheng SL, Meyers DA, Bleecker ER, Postma DS. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004 May;34(5):757-60.
307. Simpson A, Maniatis N, Jury F, Cakebread JA, Lowe LA, Holgate ST, Woodcock A, Ollier WE, Collins A, Custovic A, Holloway JW, John SL. Polymorphisms in a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) predict impaired early-life lung function. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(1):55-60. Epub 2005 Apr 1.
308. Raby BA, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Lange C, Lazarus R, Weiss ST. ADAM33 polymorphisms and phenotype associations in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(6):1071-8.
309. Miyake Y, Tanaka K, Arakawa M. ADAM33 polymorphisms, smoking and asthma in Japanese women: the Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012 Jul;16(7):974-9. Epub 2012 May 8.
310. Al-Khayyat AI, Al-Anazi M, Warsy A, Vazquez-Tello A, Alamri AM, Halwani R, Alangari A, Al-Frayh A, Hamid Q, Al-Muhsen S. T1 and T2 ADAM33 single nucleotide polymorphisms and the risk of childhood asthma in a Saudi Arabian population: a pilot study. *Ann Saudi Med*. 2012;32(5):479-86.
311. Blakey J, Halapi E, Bjornsdottir US, Wheatley A, Kristinsson S, Upmanyu R, Stefansson K, Hakonarson H, Hall IP. Contribution of ADAM33 polymorphisms to the population risk of asthma. *Thorax*. 2005;60(4):274-6.

312. Michel S, Liang L, Depner M, Klopp N, Ruether A, Kumar A, Schedel M, Vogelberg C, von Mutius E, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Laub O, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Gut IG, Schreiber S, Lathrop M, Illig T, Kabesch M. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PLoS One*. 2010 Nov 12;5(11):e13894. doi: 10.1371/journal.pone.0013894.
313. Qin ZS, Niu T, Liu JS. Partition-Ligation-Expectation-Maximization Algorithm for Haplotype Inference with Single-Nucleotide Polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2002;70:1242-47.
314. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003;73:1162-69.
315. Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, Naidu RP, Ehrlich E, Duffy DL, Schou C, Levett PN, Marsh DG, Beaty TH. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:485-91.
316. Celedón JC., Soto-Quiros M E, Avila L, Lake SL, Liang C, Fournier E, Spesny M, Hersh C P, Sylvia JS, Hudson TJ, Verner A, Klanderma BJ, Freimer NB, Silverman EK, Weiss ST. Significant linkage to airway responsiveness on chromosome12q24 in families of children with asthma in Costa Rica, *Hum. Genet*. 2007;120:691–699
317. Daley D, Lemire M, Akhabir L, Chan-Yeung M, He JQ, McDonald T, Sandford A, Stefanowicz D, Tripp B, Zamar D, Bosse Y, Ferretti V, Montpetit A, Tessier MC, Becker A, Kozyrskyj AL, Beilby J, McCaskie PA, Musk B, Warrington N, James A, Laprise C, Palmer LJ, Paré PD, Hudson TJ. Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Hum Genet*. 2009;125(4):445-59.
318. Schedel M, Depner M, Schopen C, Weiland SK, Vogelberg C, Niggemann B, Lau S, Illig T, Klopp N, Wahn U, von Murous E, Nickel R, Kabesch M. The role of polymorphisms in ADAM33, a disintegrin and metalloprotease 33, in childhood asthma and lung function in two German populations. *Respiratory Research* 2006, 7:91
319. Bridges LC, Sheppard D, Bowditch RD. ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7. *Biochem J* 2005;387:101–108

320. Wiester LM, Giachelli CM. Expression and function of the integrin $\alpha 9\beta 1$ in bovine aortic valve interstitial cells. *J Heart Valve Dis* .2003;12:605–616.
321. Martino DJ, Prescott SL: Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease. *Allergy* 2010; 65: 7–15
322. Biel M, Wascholowski V, Giannis A. Epigenetics – An epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angewandte Chemie Int. Edition* 2005; 44: 3186 – 3216
323. Kim ST, Fields PE, Flavell RA. Demethylation of a specific hypersensitive site in the Th2 locus control region. *PNAS* 2007; 104:17052-17057
324. Child F, Lenney W, Clayton S, Davies S, Jones PW, Alldersea JE, Strange RC, Fryer AA. The association of maternal but not paternal genetic variation in GSTP1 with asthma phenotypes in children. *Respir Med*. 2003 Dec;97(12):1247-56.
325. Mao XO, Shirakawa T, Sasaki S, Enomoto T, Morimoto K, Hopkin JM. Maternal inheritance of atopy at the Fc epsilon RI beta locus in Japanese sibs. *Hum Hered*. 1997 May-Jun;47(3):178-80.
326. Dolinoy DC, Das R, Weidman JR, Jirtle RL. Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. *Pediatr Res* 2007; 61:30R–37R.
327. Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KV, Whitelaw E. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2538-43.
328. Raby BA, Soto-Quiros ME, Avila L, Lake SL, Murphy A, Liang C, Fournier E, Spesny M, Sylvia JS, Verner A, Hudson TJ, Klanderma BJ, Freimer NB, Silverman EK, Celedón JC. Sex-specific linkage to total serum immunoglobulin E in families of children with asthma in Costa Rica. *Hum Mol Genet*. 2007 Feb 1;16(3):243-53. Epub 2006 Dec 1.
329. Hunninghake GM, Lasky-Su J, Soto-Quirós ME, Avila L, Liang C, Lake SL, Hudson TJ, Spesny M, Fournier E, Sylvia JS, Freimer NB, Klanderma BJ, Raby BA, Celedón JC. Sex-stratified linkage analysis identifies a female-specific locus for IgE to cockroach in Costa Ricans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Apr 15;177(8):830-6. doi: 10.1164/rccm.200711-1697OC. Epub 2008 Jan 31.

330. Rigoli L, Salpietro DC, Lavalle R, Cafiero G, Zuccarello D, Barberi I. Allelic association of gene markers on chromosome 11q in Italian families with atopy. *Acta Paediatr.* 2000 Sep;89(9):1056-61.