

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mateja BALANTIČ

VPLIV IZBRANIH POLIMORFIZMOV NA STOPNJO
IZRAŽANJA ASTME PRI OTROCIH

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mateja BALANTIČ

**VPLIV IZBRANIH POLIMORFIZMOV NA STOPNJO IZRAŽANJA
ASTME PRI OTROCIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF POLYMORPHISMS ON CHILDHOOD ASTHMA
SEVERITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko v Bolnišnici Golnik – Klinični oddelek za pljučne bolezni in alergijo.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 12.4.2010 za mentorico imenovala doc. dr. Tanjo Kunej in somentorja doc. dr. Petra Korošca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Tanja KUNEJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Peter KOROŠEC
Bolnišnica Golnik – KOPA, Laboratorij za klinično imunologijo in molekularno genetiko

Članica: izr. prof. dr. Janja MARC
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora: 25. avgust 2010

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mateja BALANTIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 606: 616.248: 577.21 (043.2)
KG	astma/polimorfizem/stopnja izražanja astme/ <i>IL18/STAT6/TBXA2R/ORMDL3/VEGFA/CHI3L1/IL33</i>
AV	BALANTIČ, Mateja
SA	KUNEJ, Tanja (mentor)/KOROŠEC, Peter (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2010
IN	VPLIV IZBRANIH POLIMORFIZMOV NA STOPNJO IZRAŽANJA ASTME PRI OTROCIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 49, [6] str., 23 pregl., 14 sl., 1 pril., 80 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Astma je ena najpogostejših kroničnih bolezni v zadnjih desetletjih, saj prizadane okrog deset odstotkov ljudi. Na njen razvoj vpliva tako okolje, kot genetska zasnova posameznikov. Kljub mnogim raziskavam genetsko ozadje še ni razjasnjeno, saj gre za večgensko bolezen. Raziskovalci skušajo astmo genetsko opredeliti s študijami na velikih vzorcih in s potrjevanjem rezultatov predhodnih raziskav. Namen diplomskega dela je bil, ugotoviti ali izbrani polimorfizmi posameznih nukleotidov vplivajo na stopnjo izražanja astme pri otrocih. V raziskavo je bilo vključenih 151 otrok z različnimi stopnjami izražanja astme in 16 otrok s sumom na astmo, katera ni bila potrjena. Vsi otroci so bili doma iz okolice Maribora. Genotipe smo posameznikom določili z metodo alelne diskriminacije. Ugotovili smo povezanost polimorfizmov rs3786989 (p=0,03) in rs8113232 (p=0,02) v <i>TBXA2R</i> , rs4795405 (p=0,04) v <i>ORMDL3</i> in rs833058 (p=0,02) v <i>VEGFA</i> s stopnjo izražanja astme pri slovenskih otrocih. Povezave polimorfizmov rs5744247 v <i>IL18</i> , rs7025417 v <i>IL33</i> , rs324011 v <i>STAT6</i> , rs2146323 v <i>VEGFA</i> in rs4950928 v <i>CHI3L1</i> s stopnjo izražanja astme pri slovenskih otrocih nismo potrdili.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 606: 616.248: 577.21 (043.2)
CX asthma/polymorphism/asthma severity/ *IL18/STAT6/TBXA2R/ORMDL3/VEGFA/CHI3L1/IL33*
AU BALANTIČ, Mateja
AA KUNEJ, Tanja (supervisor)/KOROŠEC Peter (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2010
TI THE EFFECT OF POLYMORPHISMS ON CHILDHOOD ASTHMA SEVERITY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 49, [6] p., 23 tab., 14 fig., 1 ann., 80 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Asthma is one of the most frequent chronic diseases in last few decades. Its incidence is about ten percent. Besides the genetic predisposition, environmental factors play an important role in the development of asthma. Despite many researches in this field, genetic background is still not clarified. That is due to many genes involved in the disease. Researchers are trying to genetically define asthma through studies on big samples and with confirming results obtained from different patient samples. The aim of the present graduate thesis was, to determine the effect of some polymorphisms on childhood asthma severity. We analysed 151 children with different asthma severity and 16 children with unconfirmed asthma. All children were from Maribor region. Genotypes were determined with allelic discrimination assay. We confirmed the effect of rs3786989 ($p=0,03$) and rs8113232 ($p=0,02$) in *TBXA2R*, rs4795405 ($p=0,04$) in *ORMDL3* and rs833058 ($p=0,02$) in *VEGFA* on asthma severity of Slovenian children. We did not confirm the effect of polymorphisms rs5744247 in *IL18*, rs7025417 in *IL33*, rs324011 in *STAT6*, rs2146323 in *VEGFA*, and rs4950928 in *CHI3L1* on asthma severity of Slovenian children.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key word documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	IIX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ASTMA	3
2.2 STOPNJA IZRAŽNJA ASTME	3
2.3 GENETIKA ASTME	4
2.4 MUTACIJE, KI POVZROČIJO RAZVOJ BOLEZNI	5
2.5 RAZISKOVANJE GENETIKE ASTMATIKOV	7
2.5.1 Študije vezanega dedovanja na podlagi vzorcev oseb v sorodu	7
2.5.2 Asociacijske študije	7
2.5.3 Asociacijske študije na celotnem genomu	7
2.6 IZBRANI GENI ZA ANALIZO	8
2.6.1 Interlevkin 18	8
2.6.2 Interlevkin 33	9
2.6.3 Signalizacijski dejavnik in aktivator prepisovanja 6	11
2.6.4 Receptor za tromboksan A2	12
2.6.5 Orozomukoidu 1 podoben protein 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	13
2.6.6 Vaskularni endotelni rastni dejavik A	14
2.6.7 Hitinazi 3 podoben protein 1	15
2.7 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	16
2.7.1 Test alelne diskriminacije	16
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 POPULACIJA OTROK ASTMATIKOV	19
3.2 IZOLACIJA DNA	19
3.3 PRIPRAVA REAKCIJSKE MEŠANICE ZA ANALIZO	21
3.3.1 Material	21
3.3.2 Postopek dela	21
3.4 IMENA GENOV	22
3.5 OBDELAVA PODATKOV	22
3.5.1 Hardy-Weinbergovo ravnotežje	22
3.5.2 Statistična analiza	23
3.5.2.1 Test χ^2 -kvadrat	23
3.5.2.2 Relativno tveganje in razmerje obetov	23
3.6 OZNAČEVANJE GENOV NA KARIOTIPU	23
4 REZULTATI	25
4.1 SNP-JI IN ASTMA	26

4.1.1	Hardy-Weinbergovo ravnotežje	26
4.1.2	Povezanost SNP-jev s stopnjo izražanja astme	26
4.1.2.1	Interlevkin 18	27
4.1.2.2	Interlevkin 33	28
4.1.2.3	Signalizacijski dejavnik in aktivator prepisovanja 6	28
4.1.2.4	Receptor za tromboksan A2	30
4.1.2.5	ORM1 podobnen protein 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	31
4.1.2.6	Vaskularni endotelni rastni dejavnik A	32
4.1.2.7	Hitinazi 3 podobnen protein 1	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	36
5.1	HARDY-WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE	36
5.2	IZBRANI SNP-JI IN ASTMA	36
5.2.1	IL18	36
5.2.2	IL33	36
5.2.3	STAT6	36
5.2.4	TBXA2R	37
5.2.5	ORMDL3	37
5.2.6	VEGFA	37
5.2.7	CHI3L1	38
5.3	VLOGA SNP-JEV	38
5.3.1	SNP-ji v intronih	38
5.3.2	SNP-ji v intergenskih območjih	38
5.3.3	SNP-ji in sinonimne mutacije	38
5.4	UPORABNOST GENETSKIH ANALIZ ASTMATIKOV	39
5.5	SKLEPI IN PRIHODNJE DELO	40
6	POVZETEK	41
7	VIRI	42
ZAHVALA		
PRILOGA A		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacija stopnje izražanja astme po GINA (GINA, 2003).	3
Preglednica 2: Pogostnosti genotipov in alelov rs7025417 v različnih populacijah iz baze podatkov Hapmap.	10
Preglednica 3: Sestava rekacijske mešanice za reakcijo alelne diskriminacije.	21
Preglednica 4: Osnovne informacije o analiziranih genih in povzetki rezultatov.	26
Preglednica 5: Rezultati izračuna Hardy-Weinbergovega ravnotežja.	26
Preglednica 6: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs5744247 v <i>IL18</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	27
Preglednica 7: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs5744247 v <i>IL18</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	27
Preglednica 8: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs7025417 v <i>IL33</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	28
Preglednica 9: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs7025417 v <i>IL33</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	28
Preglednica 10: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs324011 v <i>STAT6</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	28
Preglednica 11: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs324011 v <i>STAT6</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	29
Preglednica 12: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs3786989 v <i>TBXA2R</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	30
Preglednica 13: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs3786989 v <i>TBXA2R</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	30
Preglednica 14: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs8113232 v <i>TBXA2R</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	30
Preglednica 15: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs8113232 v <i>TBXA2R</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	31
Preglednica 16: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs4795405 v <i>ORMDL3</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	31
Preglednica 17: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs4795405 v <i>ORMDL3</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	32
Preglednica 18: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs833058 v <i>VEGFA</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	32

Preglednica 19: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs833058 v <i>VEGFA</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	33
Preglednica 20: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs2146323 v <i>VEGFA</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	33
Preglednica 21: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs2146323 v <i>VEGFA</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	34
Preglednica 22: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs4950928 v <i>CHI3L1</i> pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	34
Preglednica 23: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs4950928 v <i>CHI3L1</i> bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Vrste funkcionalnih zaporedij v katerih lahko nastanejo bolezenske mutacije.	6
Slika 2: Lega preučevanega SNP-ja rs5744247 v <i>IL18</i> (Applied Biosystems, 2010).	9
Slika 3: Lega preučevanega SNP-ja rs7025417 v <i>IL33</i> (Applied Biosystems, 2010).	10
Slika 4: Lega preučevanega SNP-ja rs324011 v genu <i>STAT6</i> (Applied Biosystems, 2010).	12
Slika 5: Lega preučevanih SNP-jev rs3786989 in rs8113232 v <i>TBXA2R</i> (Applied Biosystems, 2010).	13
Slika 6: Lega preučevanega SNP-ja rs4795405 v <i>ORMDL3</i> (Applied Biosystems, 2010).	14
Slika 7: Lega preučevanih SNP-jev rs833058 in rs2146362 v <i>VEGFA</i> (Applied Biosystems, 2010).	15
Slika 8: Lega preučevanega SNP-ja rs4950928 v <i>CHI3L1</i> (Applied Biosystems, 2010).	16
Slika 9: Shematski prikaz poteka reakcije alelne diskriminacije (Allelic discrimination..., 2007).	17
Slika 10: Prikaz rezultatov alelne diskriminacije.	18
Slika 11: Protokol za izolacijo DNA.	20
Slika 12: Abi Prism 7500 Real time PCR system.	22
Slika 13: Položaj analiziranih genov na kromosomih.	25
Slika 14: Pojavljanje alela c (%) v rs324011 pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.	29

KAZALO PRILOG

Priloga A: Genotipi analiziranih polimorfizmov pri posameznih bolnikih.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
FEV1	prisiljena izdihana prostornina zraka v prvi sek izdiha (<i>angl. forced expiratory volume</i>)
GWAS	asociacijska študija na celotnem genomu (<i>angl. genome-wide association study</i>)
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnotežje (<i>angl. Hardy-Weinberg equilibrium</i>)
IFN γ	interferon gama (<i>angl. interferon-gamma</i>)
IgE	imunoglobulin E (<i>angl. immunoglobulin E</i>)
IL	interlevkin (<i>angl. interleukin</i>)
LD	vezavno neravnotežje (<i>angl. linkage disequilibrium</i>)
NTC	negativna kontrola, kjer je namesto DNA dodana voda brez nukleaz (<i>angl. non template control</i>)
OMIM	<i>angl. Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	razmerje obetov
p	vrednost p
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. polymerase chain reaction</i>)
PEF	maksimalni pretok zraka v izdihi (<i>angl. peak expiratory flow</i>)
RR	relativno tveganje
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (<i>angl. single nucleotide polymorphism</i>)
SP	stopinje prostosti
SP2	interlevkinski receptor 1 (<i>angl. IL1 receptor-like-1</i>)
Th	celice T pomagalke (<i>angl. T helper cells</i>)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (<i>angl. tumor necrosis factor</i>)
UTR	neprevedljivo območje DNA (<i>angl. untranslated region</i>)
YKL40	hrustančni glikoprotein 39 (<i>angl. cartilage glycoprotein-39</i>)
VEGFA	vaskularni endotelni rastni dejavnik A (<i>angl. vascular endothelial growth factor A</i>)
TBXA2R	receptor za tromboksan A2 (<i>angl. thromboxane A2 receptor</i>)
STAT	signalizacijski dejavnik in aktivator prepisovanja (<i>angl. signal transducer and activator of transcription</i>)
CHI3L1	hitinazi 3 podobni protein 1 (<i>angl. chitinase 3-like 1</i>)
ORMDL3	orozomukoidu 3 podoben protein 1 (<i>S. cerevisiae</i>) (<i>angl. ORM1-like 3 (S. cerevisiae)</i>)

SLOVARČEK

OBSTRUKCIJA Obstrukcija v pulmologiji pomeni oviranje pretoka zraka v dihalnih poteh. Vzrok je običajno zožanje dihalnih poti, zlasti bronhiolov. Posledično vdihne bolnik z obstruktivno boleznijo dihal manj zraka in v arterijsko kri pride manj kisika.

BRONHIALNA PREODZIVNOST Zaradi bronhialne preodzivnosti se bronhiji pri bolnikih z astmo hitreje in intenzivneje zožijo v stiku z dejavniki, ki sicer pri zdravih osebah le malenkostno spremenijo premer svetline bronhijev.

ASOCIACIJSKE ŠTUDIJE Asociacijske študije ocenjujejo povezanost genotipa s fenotipom. Pogosto se uporabljajo pri iskanju rizičnih genov, ki povzročijo razvoj bolezni.

CELICE T POMAGALKE Po prvi spodbudi z antigenom izdelujejo celice T pomagalke predvsem interlevkin 2. Nadaljnje antigensko spodbujanje teh celic usmeri njihovo diferenciacijo v celice Th0, ki izdelujejo številne citokine. Sčasoma se celice Th0 diferencirajo v podvrste Th1 ali Th2, ki imajo razmeroma omejen izbor citokinov, ki jih izločajo. Zato tudi različno vplivajo na imunski odziv.

POLIMORFIZMI POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV (*angl. single nucleotide polymorphism; SNP-ji*) SNP-ji predstavljajo več kot 90 % vseh variacij v genomu. Definirani so kot eno nukleotidna mesta v genomske DNA, ki so lahko različna pri posameznikih v eni ali večih populacijah. SNP-ji so uporabljeni kot genetski označevalci za določitev genov, ki prispevajo k razvoju bolezni. Vloga SNP-jev pri razvoju bolezni je lahko znana ali neznana.

1 UVOD

Astma je kronična bolezen dihal, za katero je značilno vnetje in preoblikovanje dihalnih poti, ki vodi v reverzibilno obstrukcijo dihal. Astmo predstavlja spekter različnih simptomov, kot so kihanje, oteženo dihanje, kašelj, zatekanje oči ter nosu in drugo. Simptomi se med posameznimi obolelimi razlikujejo, tako v stopnji kot pogostnosti. Definicija astme se s časom spreminja, skladno z razumevanjem etiopatologije astme. Pri astmi prihaja do vstopanja mastocitov, bazofilcev, eozinofilcev, limfocitov, makrofagov in drugih celic v bronhialni mukozni sloj. Zgoraj omenjene celice skupaj s celicami respiratornega trakta, kot so epitelne celice, povzročajo vnetja in preoblikovanje dihalnih poti (Kumar in Ghosh, 2009).

Astma je najpogostejsa resna kronična bolezen otrok. Pojavlja se pri več kot 10 % otrocih do 18. leta starosti. Astma je kompleksna kronična vnetna bolezen dihalnih poti. Kot pri večini kompleksnih bolezni, so tudi pri patogenezi astme udeleženi tako genetski dejavniki kot okolje. Genetsko povezanost so ugotavljali že v devetnajstem stoletju, na študijah z enojajčnimi dvojčki, kjer so ugotovili 30 do 40 % skladnost za astmo. To pomeni, da okoli 60 % k pojavu astme doprinesejo okoljski dejavniki, ki lahko spodbudijo ali zavrejo njen razvoj.

Hiter napredok genetike v zadnjih letih je omogočil odkritje mnogih genov povezanih s patogenezo astme. Kot že omenjeno je astma kompleksna bolezen. To pomeni, da so učinki posameznih genov zelo majhni, vendar so njihovi skupni učinki v povezavi z okoljskimi dejavniki lahko zelo veliki. Astma je bolezen na katero vpliva več dejavnikov. Hkrati se kaže v obliki mnogih različnih fenotipov in se razlikuje od klasičnih t.i. Mendlovi monogenskih bolezni. Bolezni te vrste so posledica mutacij enega samega gena, medtem ko na pojav astme vpliva mnogo genov, kar pomeni težavnejše genetske analize. Kljub mnogim raziskavam in napredkom še vedno niso identificirani vsi geni vpleteni v patogenezo astme. Tudi nekateri že znani geni niso potrjeni kot zanesljivi vzročni geni, ki bi doprinesli k razvoju astme.

Pojavljajo se tudi problemi pri ponovitvah študij, saj se odnos med genotipom in fenotipom med populacijami močno razlikuje. Večina do sedaj znanih z astmo povezanih genov, je bila identificirana z ugotavljanjem povezave med polimorfizmi posameznih nukleotidov in fenotipskimi znaki astme. Ti znaki vključujejo respiratorne lastnosti, na primer bronhialno povečano odzivnost, imunološke lastnosti, kot je prisotnost specifičnih IgE ali pa so to klinični znaki, na primer pojav atopijskega dermatitisa (Vercelli, 2008).

V okviru diplomske naloge smo analizirali devet SNP-jev v sedmih različnih genih, ki bi bili lahko statistično značilno povezani s patogenezo astme, oziroma natančneje s stopnjo izražanja astme pri otrocih. Izbrane SNP-je smo določili 151 otrokom z različnimi stopnjami izražanja astme (huda, zmerna, blaga) in 16 otrokom, pri katerih je bila obstajal sum na astmo, a ta ni bila klinično dokazana. Z namenom zmanjšanja genetske raznolikosti so bili otroci vključeni v raziskavo vsi doma iz okolice Maribora. V raziskavo so bili vključeni naslednji polimorfizmi: rs5744247 v *IL18* (Harada in sod., 2009); rs7025417 v *IL33* (HapMap; 2010); rs324011 v *STAT6*, rs3786989 in rs8113232 v *TBXA2R* (Daley in sod., 2009); rs4795405 v *ORMDL3* (Rogers in sod., 2009); rs833058 in rs2146323 v

VEGFA (Sharma in sod., 2009) in rs4950928 v *CHI3L1* (Ober in sod., 2008). Vsi analizirani polimorfizmi, razen polimorfizma v *IL33*, so bili izbrani iz novejših objav. Polimorfizem v *IL33* je bil v tej raziskavi analiziran prvič in je bil izbran s pomočjo baze podatkov HapMap. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali so zgoraj navedni polimorfizmi značilno povezani s stopnjo izražanja astme pri slovenskih otrocih.

Delovna hipoteza je bila, da so polimorfizmi rs5744247 v *IL18*, rs7025417 v *IL33*, rs324011 v *STAT6*, rs3786989 in rs8113232 v *TBXA2*, rs4795405 v *ORMDL3*, rs833058 in rs2146323 v *VEGFA* in rs4950928 v *CHI3L1*, značilno povezani s stopnjo izražanja astme pri slovenskih otrocih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ASTMA

Astma ali naduha ni bolezen današnje dobe, kot to mnogokrat beremo v poljudnjem slovstvu. Poznamo jo že tisočletja. Že pred 3500 leti so v »Eberjevem« papirusu egiptanski zdravniki zapisali klinične značilnosti astme, kot jih vidimo še danes. Sama beseda astma je grškega izvora Ασθμα in pomeni zadihanost. Homer jo je uporabil v svoji Iliadi, ko je opisoval hude napore, ki so jih grški junaki doživljali, ko so drveli v boj preko ravnice pred Trojo. Petsto let pozneje je Hipokrat isto besedo uporabil za opis bolezenskih znamenj pri nekaterih bolnikih. O astmi pišejo tudi rimski zdravniki. Leta 1190 slavni zdravnik sultana Saladina Maimonides v svoji knjigi natančno opisuje klinična znamenja astme. Posebno poudari nenađne napade oteženega dihanja. V sedemnajstem in osemnajstem stoletju so ugotovili, da je pri astmatičnem napadu posebno prizadeto dihanje, zaradi nenađne zožitve bronhiolov, kar imenujemo obstrukcija dihal. Okoli leta 1960 je postalo jasno, da je astma vnetje, ki nastane zaradi nenađene vzdražnosti imunskega sistema, ki ga sprožijo dejavniki kot so pelodi, živalska dlaka in hišni prah. Astma ni redka bolezen, saj prizadene nekje med 10 in 15 % prebivalstva (Kotnik, 2005).

2.2 STOPNJA IZRAŽNJA ASTME

Po klasifikaciji GINA (*angl. Global Initiative for Asthma*) bolnike delimo v skupine glede na stopnjo izražanja astme, katero določimo po značilnih znakih, ki so navedeni v preglednici 1. Stopnjo izražanja lahko določimo glede na najhujši simptom ali znak. Ocena izražanja astme je v pomoč pri predpisu zdravil proti astmi, predvsem pa koristi pri epidemioloških in kliničnih raziskavah, ker vsaj deloma omogoči primerjavo bolnikov po posameznih krajih ali raziskovalnih centrih (GINA, 2003).

Preglednica 1: Klasifikacija stopnje izražanja astme po GINA (GINA, 2003).

	Simptomi	Poslabšanja	Nočna astma (pogostost)	Razmerje FEV1/PEF	Variabilnost PEF
BLAGA ASTMA	< 1x dnevno	redka, lahko motijo spanec	> 2x mesečno	> 80% normalnega	20 – 30%
ZMERNA ASTMA	vsak dan	pogosta, lahko motijo spanec in telesno aktivnost	> 1x tedensko	60 – 80% normalnega	> 30%
HUDA ASTMA	stalni	zelo pogosta	večkrat na noč	< 60%	> 30%

Legenda:

PEF - maksimalni pretok zraka pri izdihi (*angl. Peak Expiratory Flow*).

FEV1 - prisiljena izdihana prostornina zraka v prvi sekundi izdiha (*angl. Forced Expiratory Volume*).

2.3 GENETIKA ASTME

Že v devetnajstem stoletju so domnevali, da sta astma in atopija genetsko pogojeni. Na študijah skladnosti pri enojajčnih dvojčkih so ugotovili 70 % skladnost za atopijo in 30 do 40 % skladnost za astmo. Vpliv dednosti je večji pri otroški astmi. Pomemben del etiopatogeneze astme in atopije lahko pripisemo vplivom okolja. Tudi hiter porast atopijskih bolezni ne more biti posledica genetskih dejavnikov, temveč predvsem sprememb v človekovem okolju in načinu življenja. Aktualna higienska hipoteza predvideva, da je vzrok porasta atopijskih bolezni v spremenjenem načinu življenja, za katerega je značilna manjša izpostavljenost parazitom in nekaterim mikrobom. Nekatere nalezljive bolezni v zgodnjem otroštvu namreč spodbujajo razvoj imunske tolerance preko stimulacije regulacijskih celic, ki zavirajo imunski odziv.

Polimorfizmi posameznih nukleotidov so mesta v človeškem genomu, kjer se posamezniki pogosteje razlikujemo. Na omenjenih mestih se lahko pojavijo različni nukleotidi. V genetiki jih uporabljamо kot označevalce za genetsko analizo. Z analizo genetske vezave, asociacijskimi študijami in študijami ekspresije so doslej identificirali več kot 100 kandidatnih genov za astmo (Berce in sod., 2008). Identificirana območja na kromosomih, ki so najtesneje povezana z astmo so 2q, 5q, 6q, 11q, 12q in 13q. Na teh kromosomskih odsekih se namreč nahajajo kandidatni geni, ki so po dosedanjih študijah najtesneje povezani z astmo (Bierbaum in Heinzmann, 2007).

Pri astmi gre torej za večgensko bolezen, kar pomeni da na njen razvoj vpliva več različnih genov. Rezultati asociacijskih študij se med populacijami močno razlikujejo, kar kaže na različne vzročne kandidatne gene za astmo. Pomembno je razumeti, da se populacije po genetskih ozadjih razlikujejo, zato lahko enaki polimorfizmi različno vplivajo na razvoj astme. Največ kandidatnih genov se nahaja na petem kromosому, in sicer na lokusih, ki kodirajo pomembne citokine (interlevkine) alergijskega vnetja. Pomembni so tudi lokusi na šestem kromosому, kjer se nahajajo geni glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (*angl. major histocompatibility complex; MHC*). Ta kodira proteine, ki so udeležene v patogenezo alergijskega vnetja, in sicer pri predstavitvi in prepoznavanju antigenov. Tudi razlike v odgovoru na zdravljenje astme so močno genetsko pogojene in povezane s polimorfizmi v genih receptorjev za zdravila (Berce in sod., 2008).

Mnogo študij je pokazalo močan vpliv genov na razvoj astme, zato je razumevanje genetike astme ključno pri postavljanju natančnih diagoz, preventivi in zdravljenju astme. Že samo dejstvo, da standardna natančna definicija astme ne obstaja, otežuje študije genetskega ozadja. Poskusi definiranja astme so običajno opisne narave in ni kvantitativnih kriterijev, ki bi omogočili standardizacijo za klinične, epidemiološke ali genetske aplikacije. Večkrat se kot kvantitativni znaki uporablja stopnje specifičnih protiteles IgE (*angl. Immunoglobulin E*) ali podobne mere, ki dejansko ne predstavljajo celotnega stanja astmatika.

Genetske študije otežuje tudi dejstvo, da je astma tipična večenska bolezen, kar pomeni da več genov v interakcijah povzroči nek fenotip. Značilna je genetska heterogenost, saj so lahko pri različnih posameznikih rizični različni aleli.

Do sedaj je bilo objavljenih preko 600 asociacijskih študij astme v katerih je bilo 120 genov povezanih z astmo, 54 od teh je bilo ponovljenih v dveh do petih neodvisnih vzorcih in deset v 410 neodvisnih vzorcih (Szalai in sod., 2008).

Polimorfizmi lahko na patogenezo astme vplivajo na različne načine. Polimorfizem lahko spremeni funkcijo gena s spremembami aminokislinskega (AK) zaporedja proteina, ki ga kodira ali vpliva na prepisovanje genov. Lahko se zgodi, da polimorfizem katerega smo povezali z astmo dejansko sam ne vpliva na bolezen, ampak je ta polimorfizem le dedovan skupaj s pravim vzročnim polimorfizmom. Ta pojav imenujemo vezavno neravnotežje (angl. *Linkage Disequilibrium; LD*). Ta se lahko razteza celo do 1000 baznih parov. V tem primeru bi bilo zelo težko definirati kateri je res pravi vzročni polimorfizem, ki doprinese k razvoju astme. V takem primeru so nujne funkcionalne študije. Ne nazadnje se lahko zgodi, da je povezava, ki smo jo odkrili lažno pozitivna. To je lahko posledica napak pri genotipiziranju, stratifikaciji populacije ali drugo.

Vercelli (2008) kandidatne gene, ki so povezani z patogenezo astme razvrsti v štiri glavne skupine:

1. Geni prijene imunosti in imunoregulacije.

Sem sodijo geni, ki so vpleteni v sproženje imunskega odziva. Na alergijsko vnetje in regulacijo nastajanja IgE močno vplivajo polimorfizmi v genih, ki kodirajo receptorje. Sem sodijo: *CD14, TLR2, TLR4, TLR10, NOD1, NOD2, IL10, STAT3, ...*

2. Geni povezani z razvojem celic T pomagalk tipa 2 (angl. T helper cells 2; Th2) in njihovimi efektorskimi funkcijami.

V to skupino uvrščamo gene, ki regulirajo diferenciacijo naivnih CD4+ Th celic v Th2 efektorsko celico. To so: *GATA3, STAT6, IL4RBX21, IL13, IL4, IL4RA, ...*

3. Geni povezani z biologijo epitelija in mukozno imunostjo.

Geni v tej skupini so izraženi v epitelnih celicah. Sem sodijo: *CCL5, DEFB1, CC16, SPINK5, FLG, ...*

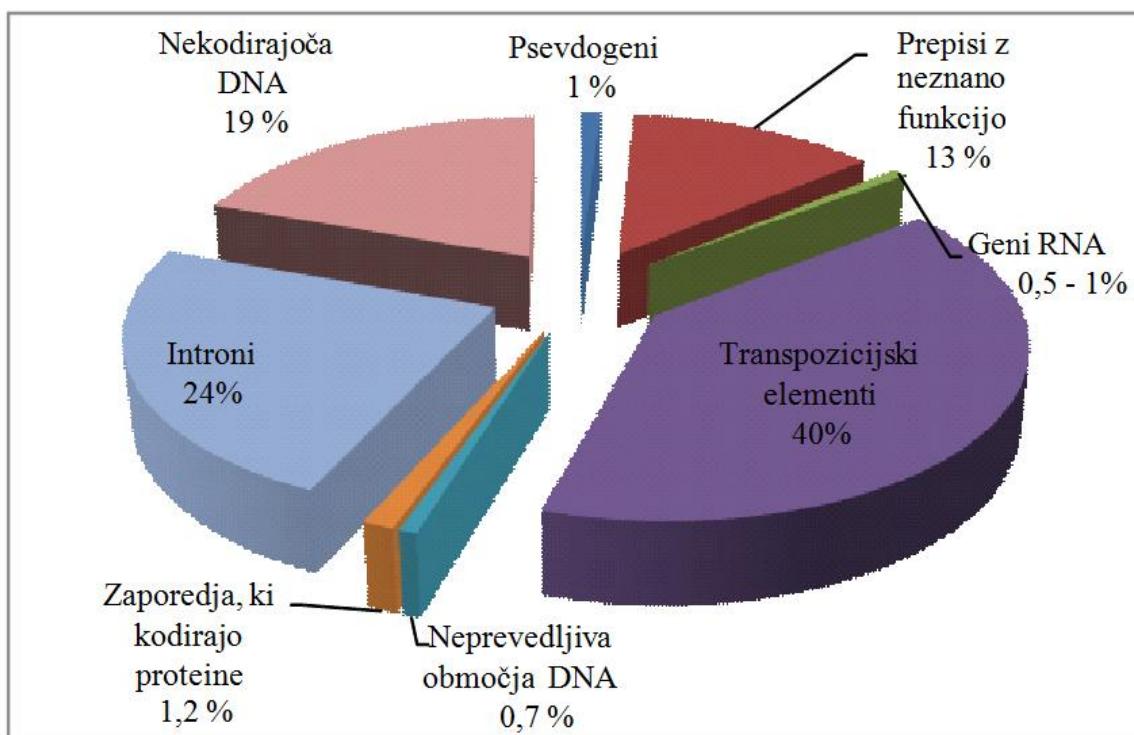
4. Geni povezani s funkcijo pljuč, dihalnih poti in stopnjo izražanja astme.

Geni povezani s funkcijo pljuč so bolj heterogeni. Ta skupina vključuje: *ADRB2* in *TBXA2R*.

2.4 MUTACIJE, KI POVZROČIJO RAZVOJ BOLEZNI

Dedne bolezni so posledica mutacij genov. Vsaka mutacija genov ne pomeni nujno razvoja neke bolezni. Pomembno je, da je učinek mutacij dovolj velik, da povzroči razvoj določenih patoloških znakov, ki so ovrednoteni kot določena bolezen. To pomeni, da so

mnoge mutacije potencialno bolezenske, vendar je njihov učinek premajhen, da bi bistveno vplival na fenotip bolezni. Mutacije, ki povzročijo razvoj različnih dednih bolezni se lahko nahajajo v najrazličnejših delih genoma. Te mutacije lahko nastanejo v zaporedjih, ki kodirajo proteine, v intronih, prepisih z neznano funkcijo, mobilnih elementih, neprevedljivih regijah, regulatornih zaporedjih in genih RNA (Cooper in sod., 2010), kar je prikazano na sliki 1.



Slika 1: Vrste funkcionalnih zaporedij v katerih lahko nastanejo bolezenske mutacije.

2.5 RAZISKOVANJE GENETIKE ASTMATIKOV

2.5.1 Študije vezanega dedovanja na podlagi vzorcev oseb v sorodu

Pri študijah vezanih genov preučujemo osebe, ki so bolezensko prizadete in so v sorodu. Družinskim članom določimo genotipe na enakomerno razmagnjenih genetskih označevalcih, ki pokrivajo vse kromosome. Nato iščemo genomska območja, kjer se določeni genetski označevalci pojavljajo pogosteje kot je bilo pričakovano. Taka območja se pogosto razprostirajo čez 20 do 30 milijonov baznih parov DNA in vsebujejo stotine genov. Nekje znotraj takega genomskega območja se nahaja rizični gen. Takemu območju rečemo da je vezano, saj se deduje skupaj z genetskim označevalcem, ki ga analiziramo. Ta območja nato ožimo dokler ne preidemo do vzročnega gena. Te študije so zanimive predvsem za identifikacijo novih genov, ker ne zahtevajo predhodne hipoteze. Slabost je predvsem ta, da na tak način lahko identificiramo le gene z velikimi fenotipskimi učinki (Vercelli, 2008).

2.5.2 Asociacijske študije

Asociacijske študije se osredotočajo na gene, ki jih izberemo na glede na njihovo vlogo v patogenezi bolezni. Primerjajo se pogostnosti alelov ali genotipov v kandidatnih genih bolnikov in zdravih kontrol. V primerjavi z družinski študijami lahko na ta način lažje zberemo večje število vzorcev, kar pomeni močnejšo statistično podporo rezultatov (Vercelli, 2008).

Zgoraj opisan način analize za ugotavljanje vzročnih mutacij, ki povzročijo nastanek bolezni smo uporabili v naši raziskavi. Uporabili smo vzorec bolnikov, pri katerih smo ugotavljali alele SNP-jev in njihovo značilno pogostnost pojavljanja pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

2.5.3 Asociacijske študije na celotnem genomu

Asociacijske študije na celotnem genomu (*angl. Genome-wide association studies; GWAS*) so trenutno najobetavnejša metoda za študije genetike astmatikov. GWAS omogoča pregled stotine vzorcev, pri čemer vsakemu lahko določimo tisoče označevalcev SNP, ki se nahajajo v celotnem človeškem genomu. Na voljo so algoritmi s katerimi lahko obdelamo množico rezultatov. Z GWAS lahko določimo majhna območja na kromosomih, ki omogočajo hitro detekcijo rizičnih genov. Hkrati pa je pomembna prednost študij GWAS tudi v tem, da lahko zaznamo gene, ki imajo na povečanje tveganja za nastanek bolezni le majhen vpliv (Szalai in sod., 2008).

2.6 IZBRANI GENI ZA ANALIZO

2.6.1 Interlevkin 18

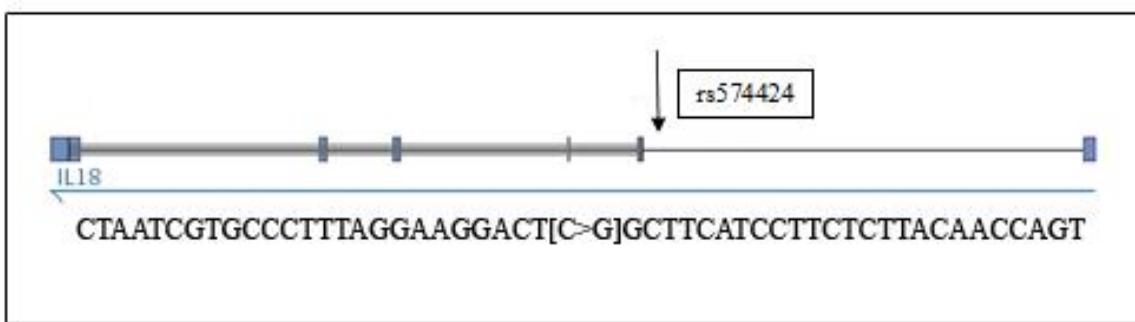
Interlevkin 18 (angl. *interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor; IL18)*) kodira interferon gama spodbujajoči faktor, ki sodi v družino citokinov IL1. IL18 deluje kot spodbujevalec na celice T in na celice naravne ubijalke, da pričnejo proizvajati interferon gama (angl. *interferon gamma; IFN γ*). Ob odsotnosti IL12 pa naj bi usmerjal imunski odziv v smer celic Th2. Ti dve vlogi nakazujeta imunomodulatorno vlogo IL18. Pri vnetjih prihaja do prekomernega nastajanja IL18 (Muhl in Pfeilschifter, 2004).

IL18 ima pomembne vloge pri kroničnih vnetjih in številnih infekcijah, saj ojači prirojen imunski odziv ter stimulira pridobljen imunski odziv, in sicer poveča delovanje celic Th1 in Th2 (Harada in sod., 2009). Po prvi spodbudi z antigenom izdelujejo celice T pomagalke predvsem IL2. Nadaljnje antigensko spodbujanje teh celic usmeri njihovo diferenciacijo v celice Th0, ki izdelujejo številne citokine. Sčasoma se celice Th0 diferencirajo v podvrste Th1 ali Th2, ki imajo razmeroma omejen izbor citokinov, ki jih izločajo. Zato tudi različno vplivajo na imunski odziv (Gushchinin sod., 1994). Celice Th2 proizvajajo IL4, IL5 in IL13, Celice Th1 pa IFN γ in IL2. IL18 proizvajajo imunske in druge celice, kot so monociti in bronhialne epitelne celice. Sprva so mu pripisovali le vlogo spodbujanja nastajanja IFN γ v celicah Th1, zadnje raziskave pa mu pripisujejo tudi spodbujanje nastajanja IL4 in IL13 (Harada in sod., 2009).

Na mišjih modelih so pokazali, da vnos antigena in IL18 stimulira celice Th1, kar povzroči resna vnetja dihalnih poti preko IFN γ in IL13. Pri ljudeh je povečano nastajanje IFN γ povezano z resnostjo astme. Poročali so tudi o povečanem izražanju in serumskih koncentracijah IL18 pri alergijskih boleznih (Harada in sod., 2009).

Harada in sod. (2009) so pokazali, da alel G v rs5744247 poveča aktivnost prepisovanja mRNA v normalnih humanih bronhialnih celicah, čemur pravimo alelno specifičen učinek na prepisovanje mRNA. Po izpostavljenosti lipopolisaharidom so osebe homozigotne za alel G kazale povečano izražanje mRNA *IL18* v monocitih. Genetske različice v genu *IL18* torej vplivajo na serumski koncentracije IL18. V raziskavi so odkrili tudi pozitivno soodvisnost med genotipom rs5744247 in stopnjo izražanja astme ($p=0,036$).

Gen *IL18* obsega šest eksonov in se razteza preko 19,5 kb (Kalina in sod., 2000). Lociran je na 11q22.2-q22.3 (OMIM; 2010). SNP rs5744247 C>G se nahaja v intronu in je transverzijska zamenjava (Applied Biosystems, 2010). Odsek zaporedja z rs5744247 v *IL18* in genska organizacija so prikazani na sliki 2.



Slika 2: Lega preučevanega SNP-ja rs5744247 v *IL18* (Applied Biosystems, 2010).

2.6.2 Interlevkin 33

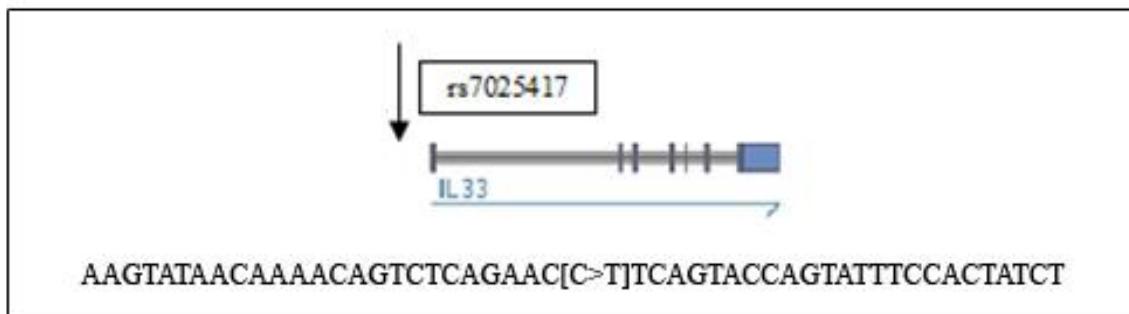
IL33 sodi v družino IL1 in je izražen po pred-vnetnem dražljaju v mnogih celicah. V okolico naj bi se sprostil po celični lizi. Receptor za IL33 je sestavljen iz membransko vezanega receptorja ST2 (*angl. interleukin 1 receptor-like 1; ST2*) in receptorskega proteina IL1. ST2 sodi v družino Toll-u podobnih receptorjev. Ta receptor je izražen predvsem na površini celic Th2 in na mastocitih. IL33 ščiti pred helmintskimi okužbami in vzpodbuja imunski odziv Th2 in na ta način povečuje tveganje za nastanek astme.

mRNA *IL33* je izražena v mnogih organih in celicah. IL33 je najbolj izražen v fibroblastih, epitelnih in endotelnih celicah. Ob odstotnosti pred-vnetnega dražljaja se IL33 nahaja v jedru, kar omogoča zaporedje aminoterminalnega konca proteina. Šele celična nekroza omogoča sproščanje IL33, vendar mehanizmi še niso znani. Nekroza, kot posledica prisotnosti toksinov, stresa ali poškodbe celice vključuje izgubo integritete celične membrane in posledično zlitje vsebine celice v okolje. Ta oblika celične smrti se običajno pojavi kot posledica vnetij (Liew in sod., 2010).

IL33 vpliva na celice, ki izražajo ST2. To so celice Th2, medtem ko celice Th1 tega receptorja ne izražajo (Xu in sod., 1998). Izpostavljanje celic Th2 IL33, je povzročilo povečano nastajanje IL5 in IL13, poleg tega pa izpostavljanje prekurzorskih celic T IL33 polarizira te celice tako, da pričnejo proizvajati IL5 in IL13 brez prisotnosti IL4 (Kurowska-Stolarska in sod., 2008). IL33 je pomemben kemoatraktant, saj privlači celice Th2, tako *in vivo* kot *in vitro*. Ne nazadnje IL33 poveča nastajanje citokinov celic Th2 in Th1 (Smithgall in sod., 2008). IL33 ojači nastajanje dejavnika tumorske nekroze (*angl. Tumor Necrosis Factor; TNF*) v makrofagih po izpostavljanju lipopolisaharidom (Espinassous in sod., 2009). IL33 z vplivanjem na povečano nastajanje IL13 polarizira alternativno aktivirane makrofage, da proizvajajo več CCL17 (*angl. Chemokine (C-C motif) ligand 17*) in CCL24 (*angl. Chemokine (C-C motif) ligand 24*), kar poveča tveganje za vnetje dihalnih poti (Kurowska-Stolarska in sod., 2009).

Pri astmatikih so odkrili povečano izražanje IL33 v primerjavi z zdravimi kontrolami (Prefontaine in sod., 2009). Na mišjih modelih z astmo so opazili eozinofilno vnetje in prekomerno odzivnost dihal po vnosu IL33 neporedno v pljuča (Kondo in sod., 2008).

Gen *IL33* obsega sedem eksonov in se razteza preko 16 kb. Lociran je na 9p24.1 (OMIM, 2010). SNP rs7025417 C>T se nahaja v intergenskem območju in je tranzicijska zamenjava (Applied Biosystems, 2010). Odsek zaporedja s polimorfizmom rs7025427 in genska organizacija *IL33* je prikazana na sliki 3.



Slika 3: Lega preučevanega SNP-ja rs7025417 v *IL33* (Applied Biosystems, 2010).

Polimorfizem v *IL33* je bil izbran na podlagi pogostnosti alelov v zbirki podatkov HapMap, saj predhodno še ni bilo objavljene nobene genetske analize tega gena, kljub mnogim člankom, ki omenjajo povezavo *IL33* z astmo. V bazi podatkov HapMap najdemo mnogo različnih SNP-jev odkritih pri genomskeh analizah pri različnih populacijah ljudi. Prikazane so pogostnosti genotipov in alelov posameznih polimorfizmov, ki so značilne za posamezno populacijo. Alel rs7025417 smo izmed mnogih za analizo izbrali zaradi visoke stopnje heterozigostnosti, ki pomeni višjo informativnost. Pogostnosti alelov in genotipov rs7025417 različnih populacij so prikazane v preglednici 2.

Preglednica 2: Pogostnosti genotipov in alelov rs7025417 v različnih populacijah iz baze podatkov HapMap.

Populacija	Pogostnosti genotipov	Pogostnosti alelov
SW (A)	TT 0,62 CT 0,36 CC 0,02	T 0,802 C 0,198
CEU (C)	TT 0,53 CT 0,42 CC 0,05	T 0,739 C 0,261
CHB (H)	TT 0,31 CT 0,44 CC 0,25	T 0,53 C 0,47
CHD (D)	TT 0,35 CT 0,44 CC 0,21	T 0,571 C 0,429
GIH (G)	TT 0,57 CT 0,36 CC 0,07	T 0,75 C 0,25
JPT (J)	TT 0,24 CT 0,44 CC 0,31	T 0,465 C 0,535
LWK (L)	TT 0,73 CT 0,24 CC 0,02	T 0,856 C 0,144
MEX (M)	TT 0,72 CT 0,28 CC 0	T 0,86 C 0,14
MKK (K)	TT 0,62 CT 0,34 CC 0,04	T 0,79 C 0,21
TSI (T)	TT 0,67 CT 0,28 CC 0,05	T 0,812 C 0,188
YRI (Y)	TT 0,65 CT 0,32 CC 0,04	T 0,805 C 0,195

Legenda:

- SW (A) Prebivalci z afriškimi predniki v jugozahodni ZDA
CEU (C) Prebivalci Utaha, ki imajo prednike iz severne in zahodne Evrope
CHB (H) Kitajci iz Pekinga
CHD (D) Kitajci iz Denverja
GIH (G) Indijanci iz Houstona
JPT (J) Japonci iz Tokia

LWK (L)	Kenijci iz Webuya
MEX (M)	Prebivalci z mehiškimi predniki iz Los angelesa
MKK (K)	Masaji iz Kinyawe
TSI (T)	Prebivalci Toskane
YRI (Y)	Prebivalci iz Ibdaba

2.6.3 Signalizacijski dejavnik in aktivator prepisovanja 6

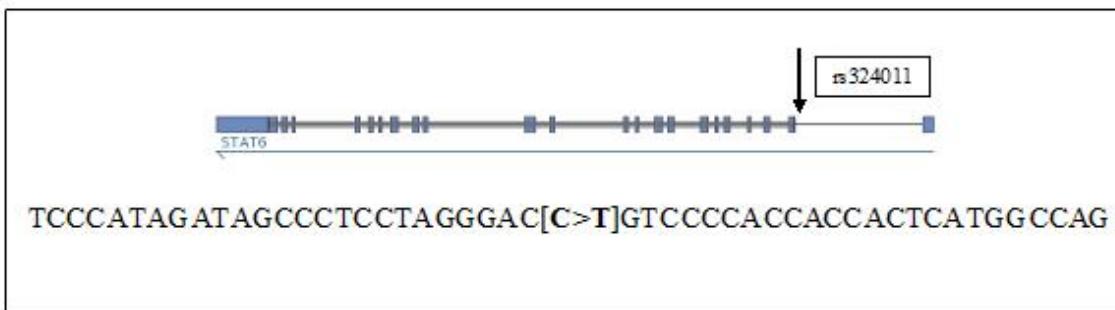
Signalizacijski dejavniki in aktivatorji prepisovanja (*angl. signal transducer and activator of transcription; STAT*) so proteini, ki delujejo kot transkripcijski dejavniki. Signal prenašajo iz izvenceličnega okolja v jedro. Motnje regulacije signaliziranja proteinov STAT povzročajo alergijske bolezni. Proteini STAT se aktivirajo s fosforilacijo ohranjenega tirozinskega ostanka, kar povzroči spremembo v tridimensionalni strukturi, kar omogoči dimerizacijo in prenos dimera v jedro. Ta v jedru deluje kot transkripcijski dejavnik. Signal za fosforilacijo je običajno vezava citokinov na receptorje na površini celice. STAT6 poleg fosforilacije zahteva še sodelovanje nedavno odkritega kofaktorja imenovanega CoaSt6. Prehod proteinov STAT iz citoplazme v jedro je ključen za njihovo funkcijo. Ker je aktivacija proteinov STAT vpletena v mnoge poti pri razvoju alergijskih bolezni in vnetij bi ta prehod lahko izrabili kot tarčo za zdravljenje (Weiguo in Hersey, 2007).

STAT6 ozioroma signalizacijski dejavnik in aktivator prepisovanja 6 je ključni regulator z alergenom induciranih vnetij dihalnih poti, saj ima pomembne vloge pri uravnavanju Th2 mehanizmov, nastajanju kemokinov in povečani odzivnosti dihalnih poti. STAT6 namreč spodbuja številne gene vpletene v alergijsko vnetne procese, kamor sodita arginaza I in P-selektin. STAT6 regulatorne mehanizme uravnavata predvsem IL4 in IL13, medtem ko IFN γ zavira STAT6 odvisno izražanje genov (Chen in Hershey, 2007). IL4 in IL13 se vežeta na receptor na površini celic T in inducirata aktivacijo Janusove tirozin kinaze. Leta nato fosforilira znotrajcelični STAT6, kar povzroči tvorbo homodimera STAT6. Ta lahko potuje v jedro, kjer se veže na specifična genska območja promotorjev induciranih z IL4 in IL13. Tako so aktivirane ključne tarče za sintezo IgE.

Na mišjih modelih so dokazali, da je STAT6 ključen za razvoj alergijskega vnetja dihalnih poti ob akutni izpostavljenosti alergenu, medtem ko kronična vnetja uravnava le delno (Trifilieff in sod., 2000). Študije na mišjih modelih katerim je manjkal gen STAT6 so pokazale, da so bile te miši nesposobne preklopa v IgE in niso bile sposobne diferenciacije prekurzorskih celic T v celice Th2 (Schedel in sod., 2004).

Schedel in sod. (2009) so pokazali, da polimorfizem v intronu gena *STAT6* deluje kot regulatorni element. Polimorfni alel T v rs324011, ki je bil že v prejšnjih študijah povezan s povišanimi stopnjami IgE, poveča aktivnost promotorja STAT6 *in vitro* v primerjavi z alejom C. Ta efekt kaže na to, da se s prisotnostjo alela T tvori vezavno mesto za transkripcijski dejavnik t.i. jedrni faktor kB v celicah T. Posledično so bile zaznane povišane stopnje IgE. Povezano alela T z astmo so potrdili tudi Kabesch in sod. (2006). Polimorfizem rs324011 gena *STAT6* je bil v študijah astmatikov povezan s povišanimi stopnjami IgE. Kot rizičen alel se navaja alel T (Weidinger in sod., 2004).

Gen *STAT6* se razteza skozi 19 kb, obsega 23 eksonov in se nahaja na 12q3 (OMIM, 2010). SNP rs324011 C>T se nahaja v intronu in je tranzicijska zamenjava (Applied Biosystems, 2010). Odsek zaporedja DNA z rs324011 in genska organizacija *STAT6* je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Lega preučevanega SNP-ja rs324011 v genu *STAT6* (Applied Biosystems, 2010).

2.6.4 Receptor za tromboksan A2

Tromboksan A2 (*angl. thromboxane A2; TBXA2*) se tvori iz arahidonske kisline, ob sodelovanju ciklogenaznih encimov. TBXA2 vpliva na krčenje bronhialnih gladkih mišic, spodbuja delitve celic bronhialnih gladkih mišic in povečuje pritrjanje in združevanje trombocitov (Rolin in sod., 2006).

Receptori za tromboksan A2 (*angl. thromboxane A2 receptor; TBXA2R*) se nahajajo na celičnih membranah in na znotrajceličnih strukturah. So transmembranski G-protein vezavni receptori. Receptori TBXA2R se lahko vežejo z različnimi G-proteini iz vsaj štirih družin in so posledično udeleženi v mnogih celičnih odzivih. Sodelujejo pri organizaciji citoskeleta, aktivaciji integrinov in kinaz, vpletene pa naj bi bili tudi v sintezi DNA, celične delitve in celično smrt. Aktivacija vseh teh poti je posledica draženja receptorjev TBXA2R, vendar je aktivacija posamezne poti tkivno in celično specifična. Obstajata dve izoformi receptorjev TBXA2R. α -izoforma je sestavljena iz 343 AK in β -izoforma, ki ima podaljšano C-terminalno citoplazemsko domeno in je sestavljena iz 407 AK. Obe izoformi imata enakih prvih 329 AK. Izražanje posamezne oblike je celično specifično (Huang in sod., 2003).

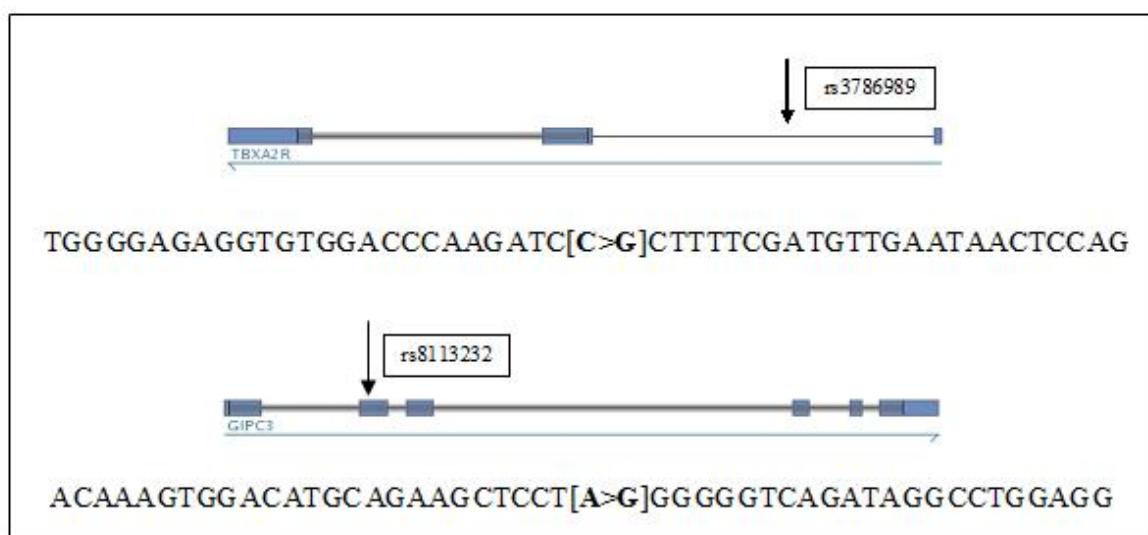
Receptore TBXA2R najdemo v različnih tkivih in celicah. Nekatera tkiva izražajo povečano število le-teh, na primer pljuča, možgani, timus, ledvice, uterus in placenta (Halushka, 2000). TBXA2 in TBXA2R sta vpletena v krčenje dihalnih gladkih mišic in v nastajanje acetilholina, zato imata pomembno vlogo pri bronhialnem vnetju in povečani odzivnosti (Hong, 2004). TBXA2 naj bi bil vpletен v patogenezo različnih bolezni, vključno z bronhialno astmo (OMIM, 2010). TBXA2R je vključen tudi v prostaglandinsko in leukotriensko sintezo in ima različne fiziološke oziroma patofiziološke vplive v alergijah, imunskejem odgovoru, aterosklerozi in neovaskularizaciji (Nakahata, 2008).

Wenzel in sod. (1991) so odkrili povišane stopnje TBXA2 v dihalih astmatikov po izpostavljenosti alergenu. Nekaj drugih študij je pokazalo povišane koncentracije tega

metabolita tudi v bronhoalveolarni tekočini, urinu in plazmi astmatikov (Kumlin in sod., 1992). Aktivacija receptorjev s TBXA2 vodi do vstopanja kalcija v celice, kar povzroči krčenje dihalnih poti (Hall, 2000). Receptor TBXA2R doprinese tudi k nenormalnemu povečanju števila celic bronhialnih gladkih mišic in preoblikovanju dihalnih poti, ki se pojavi kot odziv na kronično vnetje dihalnih poti pri astmi (Vignola in sod., 2003). Zdravljenje z antagonistimi TBXA2R se je pokazalo kot uspešno, saj se je zmanjšala bronhialna povečana odzivnost, hkrati pa se je dalo uspešno uravnavati simptome astme (Hoshino in sod., 1999).

TBXA2R je bil proučevan v japonski in korejski populaciji, kjer so odkrili da so nekateri SNP-ji močno povezani z astmo in s koncentracijami IgE v krvi (Ober in Hoffjan, 2006; Kim in sod., 2008). Ravno tako so odkrili povezavo nekaterih polimorfizmov z astmo v kavkaški populaciji (Daley in sod., 2009).

Gen *TBXA2R* je v genomu prisoten v eni kopiji in se razteza preko 15 kb. Obsega tri eksone, ki so razdeljeni z dvema intronoma in se nahaja na 19p3.3 (OMIM, 2010). SNP rs3786989 C>G se nahaja v intronu in je transverzijska zamenjava SNP rs8113232 A>G se nahaja v eksonu, je tranzicijska zamenjava in je sinonimna zamenjava oziroma tiha mutacija (Applied Biosystems, 2010). Odsek zaporedja s polimorfizmom rs3786989 in rs8113232 in genska organizacija v *TBXA2R* je prikazana na sliki 5.



Slika 5: Lega preučevanih SNP-jev rs3786989 in rs8113232 v *TBXA2R* (Applied Biosystems, 2010).

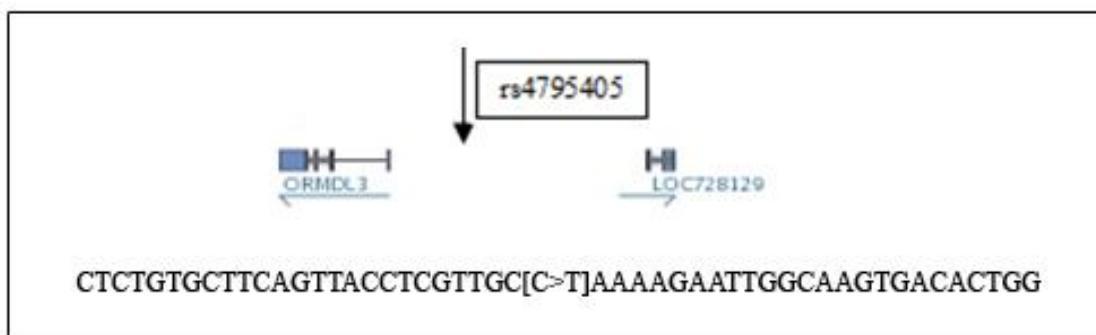
2.6.5 Orozomukoidu 1 podoben protein 3 (*S. cerevisiae*)

Orozomukoidu 1 (ORM1) podobni proteini 3 (*S. cerevisiae*) (angl. *ORM1-like 3* (*S. cerevisiae*); ORMDL3) kodirajo transmembranske proteine endoplazmatskega retikulum, ki so visoko izraženi v limfocitih, kar bi lahko nakazovalo na imunološki aspekt povezan z astmo (Tavendale, 2008). Sicer funkcija ORMDL3 do sedaj še ni znana.

ORMDL3, kot rizični gen za nastanek astme so odkrili Moffatt in sod. (2007) z analizo GWAS, kjer so preučevali več kot 317000 SNP-jev pri 994 astmatikih in 1243 zdravih

kontrolah. Potrdili so visoko povezanost genskega odseka 17q21 z astmo pri otrocih. Povezavo z astmo so potrdili še na dveh neodvisnih populacijah otrok. Medtem pa Wjst (2008) dvomi, da je podatkov dovolj, da lahko zagotovo trdimo, da je ravno *ORMDL3* tisti gen, ki naj bi bil povezan z astmo. Opozarja tudi na to, da se nobeden od SNP-jev iz Moffattove študije dejansko ne nahaja v genu *ORMDL3*. Rogers in sod. (2009) so pri proučevanju SNP-jev v *ORMDL3*, odkrili rizičen alel C za pojav astme ($p=0,04$) v SNP-ju rs4795405.

Gen *ORMDL3* obsega tri eksone in se razteza vsaj preko 2kb. Nahaja se na 17q21.1 (OMIM, 2010). SNP rs4795405 C>T se nahaja v intergenskem območju in je tranzicijska zamenjava (Applied Biosystems, 2010). Odsek zaporedja s polimorfizmom rs47954052 in genska organizacija v *ORMDL3* je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Lega preučevanega SNP-ja rs4795405 v *ORMDL3* (Applied Biosystems, 2010).

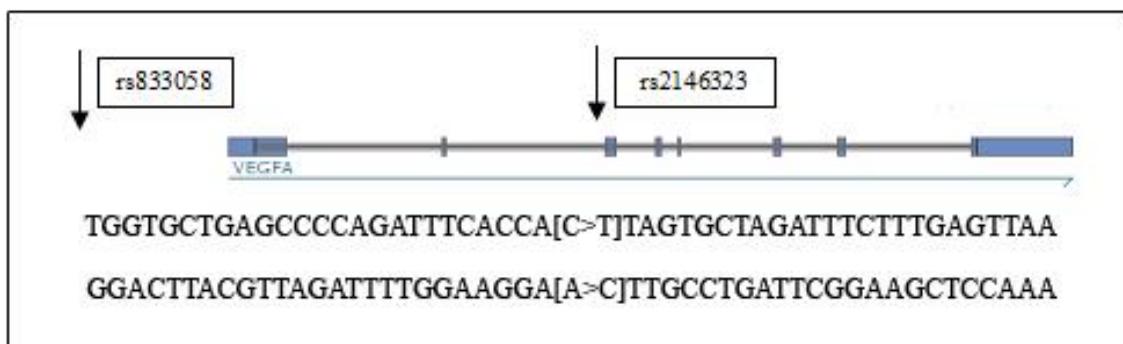
2.6.6 Vaskularni endotelni rastni dejavik A

Vaskularni endotelni rastni dejavnik A (angl. *vascular endothelial growth factor A*; *VEGFA*) je regulator vaskularne angiogeneze oziroma ožiljanja in vaskularne permeabilnosti za vodo in proteine. Ena od značilnosti astmatikov je rast in tvorba novih veziklov. Pri bolnikih so odkrili povišane stopnje *VEGFA* v primerjavi z zdravimi kontrolami. Povečana vaskularizacija bronhialne mukoze astmatikov je povezana s povečano količino *VEGFA* pozitivnih celic, kar nakazuje na vlogo *VEGFA* v patogenezi astme. Glavni producenti *VEGFA* so makrofagi, celice CD34+ in eozinofilci. Povišane stopnje *VEGFA* so v negativni korelaciji s stopnjo obstrukcije dihalnih poti in v pozitivni korelaciji z vaskularno permeabilnostjo. Povečana permeabilnost naj bi bila povezana tudi s povečanim krčenjem dihalnih poti astmatikov ob naporu. *VEGFA* naj bi bil povezan tudi s preoblikovanjem dihalnih poti (Chetta in sod., 2005; Papaioannou in sod., 2006). Študije so pokazale, da je odstotek veziklov v bronhialni mukozi višji pri astmatikih v primerjavi z zdravimi kontrolami (Li in Wilson, 1997). Izražanje *VEGFA* je regulirano z mnogimi faktorji, kot so: lipopolisaharidi, rastni faktorji, hipoksijo, citokini in drugimi (Lachheb in sod., 2008). *VEGFA* proizvajajo epitelne celice in celice Th2, kar spet nakazuje na ključno vlogo celic Th2 pri vnetjih (Lee in sod., 2004).

Sharma in sod. (2009) so odkrili statistično značilno povezavo gena *VEGFA* oziroma natančneje SNP-ja rs833058 z astmo. Kot rizičen se je izkazal alel T. To so potrdili v dveh

neodvisnih populacijah. Ta SNP je bil povezan še s povečano odzivnostjo dihal, kjer so nosilci alela T v obeh preučevanih populacijah kazali povečano odzivnost. Pri polimorfizmu rs2146362 so ugotovili različno odzivnost bolnikov na zdravljenje s kortikosteroidi glede na alelno različico. Nosilci alela A so se na zdravljenje odzivali bolje v primerjavi z tistimi, ki niso nosilci alela A.

Gen *VEGFA* obsega osem eksonov in se nahaja na 6p12 (OMIM, 2010). SNP rs833058 C>T se nahaja v intergenskem območju in je tranzicijska zamenjava. SNP rs2146362 A>C se nahaja v intronu in je transverzijska zamenjava (Applied Biosystems, 2010). Odsek zaporedja s polimorfizmom rs833058 in rs2146323 in genska organizacija v *VEGFA* je prikazana na sliki 7.

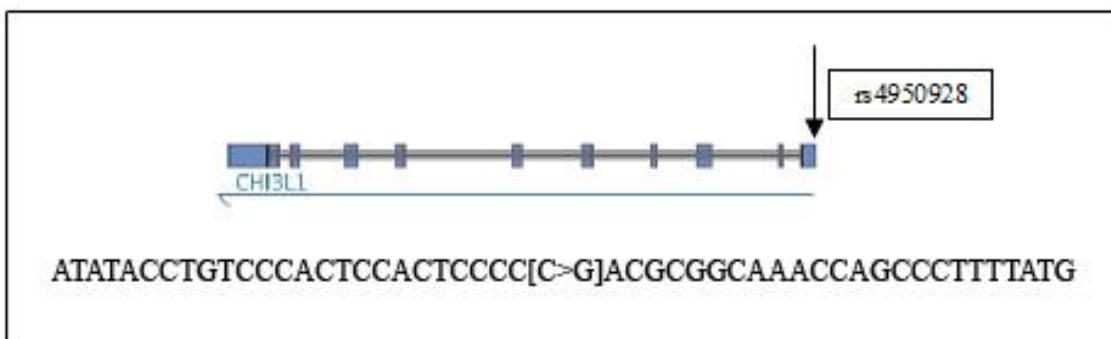


Slika 7: Lega preučevanih SNP-jev rs833058 in rs2146362 v *VEGFA* (Applied Biosystems, 2010).

2.6.7 Hitinazi 3 podoben protein 1

Hitinazi 3 podobni protein 1 YKL40 (*angl. human cartilage glycoprotein-39*), katerega kodira *CHI3L1* (*angl. Chitinase 3-like 1*; CHI3L1) nima hitinazne aktivnosti, vendar se veže na hitin in je povezan z vnetji in preoblikovanjem tkiva (Johansen, 2006). Pri astmatikih so odkrili povišane stopnje serumskega YKL40, ki so v korelaciji s stopnjo izražanja astme in pljučno funkcijo (Chupp in sod., 2007). Ober in sod. (2008) so v rs4790928 gena *CHI3L1* opazili značilno povezavo alela C s fenotipom astmatika ($p=0,047$) in povečano bronhialno občutljivostjo ($p=0,002$).

Gen *CHI3L1* obsega deset eksonov in se razteza preko osem kb. Lociran je na 1q32.1 (OMIM, 2010). SNP rs4950928 C>G se nahaja v 5' neprevedljivi regiji (UTR; *angl. untranslated region*) in je transverzijska zamenjava (Applied Biosystems, 2010). Odsek zaporedja s polimorfizmom rs4950928 in genska organizacija v *CHI3L1* je prikazana na sliki 8.



Slika 8: Lega preučevanega SNP-ja rs4950928 v *CHI3L1*(Applied Biosystems, 2010).

2.7 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Za izvedbo verižne reakcije s polimerazo v realnem času TaqMan® potrebujemo poleg dveh začetnih oligonukleotidov še fluorescentno označeno alelno specifično sondu. Sonda je enoverižni oligonukleotidni odsek DNA, ki se komplementarno prilega tarčni sekvenci, ki jo pomnožujemo. Na 5' koncu je označena z reporterskim fluorescentnim barvilkom (FAM, VIC, JOE), na 3' koncu pa z dušilcem. Uporabljamo lahko sonde označene s TAMRA fluorescentnim dušilec in sonde označene z MGB (*angl. minor groove binder*) nefluorescentnim dušilcem. Sonde MGB vsebujejo dodatno molekulo, ki stabilizira zadnjih pet do šest baznih parov na 3' koncu sonde. TAMRA sonde so dolge med 20 in 30 baznih parov, sonde MGB so do deset nukleotidov krajše. Zaradi krajše dolžine sond MGB in posledično krajših pomnožkov, z njimi dosežemo boljšo učinkovitost pomnoževanja. Sonde MGB imajo sedem do deset °C višje temperature prileganja od začetnih oligonukleotidov in so zato bolj specifične (Valasek in Repa, 2005).

Ko je sonda intaktna prihaja do fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz reporterskega barvila na dušilec. Po prileganju in začetku podaljševanja 5' ekszonukleazna aktivnost polimeraze povzroči hidrolizo sond, obe barvili pa se sprostita v raztopino. Ko sta barvili ločeni pride do ireverzibilnega porasta fluorescence reporterja. Fluorescensa reporterja tako narašča sorazmerno z nastajanjem produkta PCR (Arko, 2004; Heid in sod., 1996).

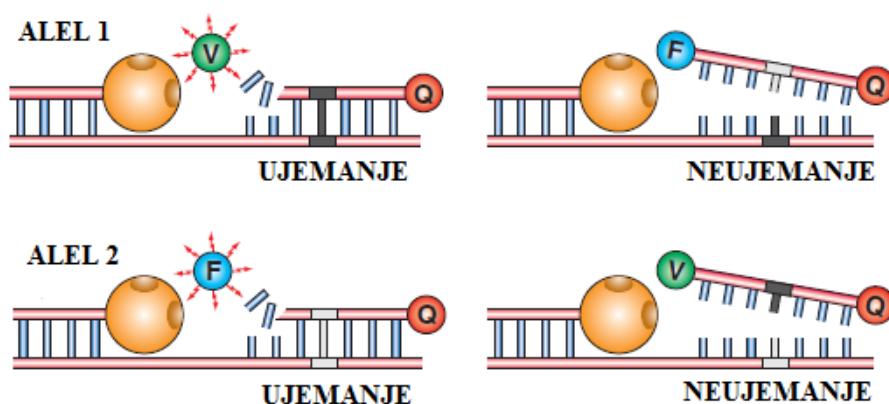
Kopičenje produkta PCR zaznamo neposredno s spremljanjem povečanja fluorescence reporterja samo če je tarčno zaporedje komplementarno sondi. V nasprotnem primeru ne pride do hidrolize in tako ostaneta reporter in dušilec blizu in posledično ni signala (Germer in Russell, 2008).

2.7.1 Test alelne diskriminacije

Test alelne diskriminacije je hkratna reakcija PCR, saj v eni reakciji potrebujemo par začetnih oligonukleotidov in par sond. Prisotnost dveh začetnih oligonukleotidov in dveh sond nam omogoča določitev dveh različnih nukleotidov na določenem mestu tarčnega zaporedja, kar označujemo kot SNP. Rezultate pridobimo po končani reakciji PCR.

Za vsak vzorec v testu alelne diskriminacije potrebujemo par sond označenih z različnima fluorescentnima reporterjema, ki se prilegata na tarčno sekvenco, ki vključuje SNP. Če

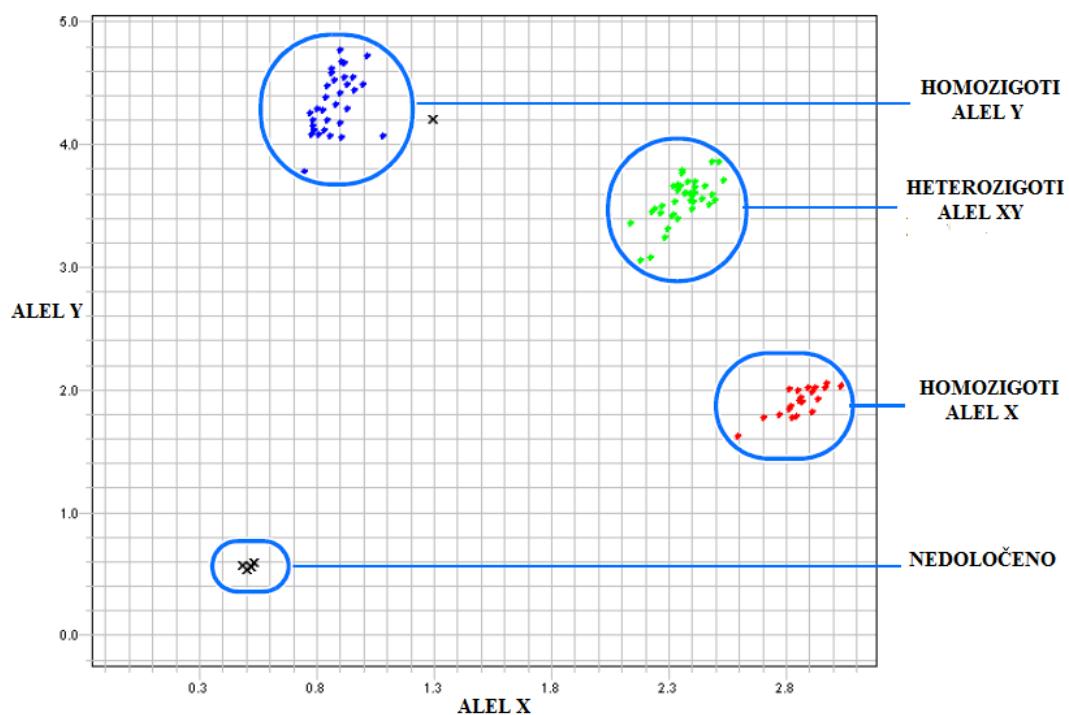
želimo ločiti med dvema aleloma potrebujemo dve sondi, od katerih se ena ujema z prvim aleлом in druga z drugim alelom. Sondi sta označeni z različnimi barvili, ena z VIC® in druga s FAM™. Z merjenjem povečanja intenzitete fluorescence posameznega barvila pridobimo informacije o homozigotnosti oziroma heterozigotnosti SNP-ja. Če se poveča le fluorescensa barvila VIC® je vzorec homozigot za prvi alel, če se poveča le fluorescensa barvila FAM™ je vzorec homozigot za drugi alel. V primeru da narasteta oba fluorescenčna signala je vzorec heterozigot za preiskovana alela. Osnova reakcije alelne diskriminacije je prikazana na sliki 9.



Slika 9: Shematski prikaz poteka reakcije alelne diskriminacije (Allelic Discrimination..., 2007).

Za izvedbo alelne diskriminacije potrebujemo tarčno DNA, kjer želimo določiti alelno različico nekega SNP-ja. DNA mora biti ustrezne kvalitete, in sicer A260/A280 mora biti višja od 1,7 in ne sme vsebovati inhibitorjev PCR. Koncentracija DNA mora biti okrog 10 ng/ μ l. Potrebujemo tudi negativno kontrolo (*angl. Non Template Control; NTC*), kjer je namesto DNA v enaki količini dodana voda. NTC kaže signal ozadja, hkrati pa omogoča zaznavanje morebitne kontaminacije, ki bi lahko dala lažno pozitiven signal. Za izvedbo potrebujemo še TaqMan® Universal PCR Master Mix in SNP Genotyping Assay (Allelic Discrimination..., 2007).

Po končani reakciji se nam rezultati izrišejo v obliki prikazani na sliki 10.



Slika 10: Prikaz rezultatov alelne diskriminacije.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POPULACIJA OTROK ASTMATIKOV

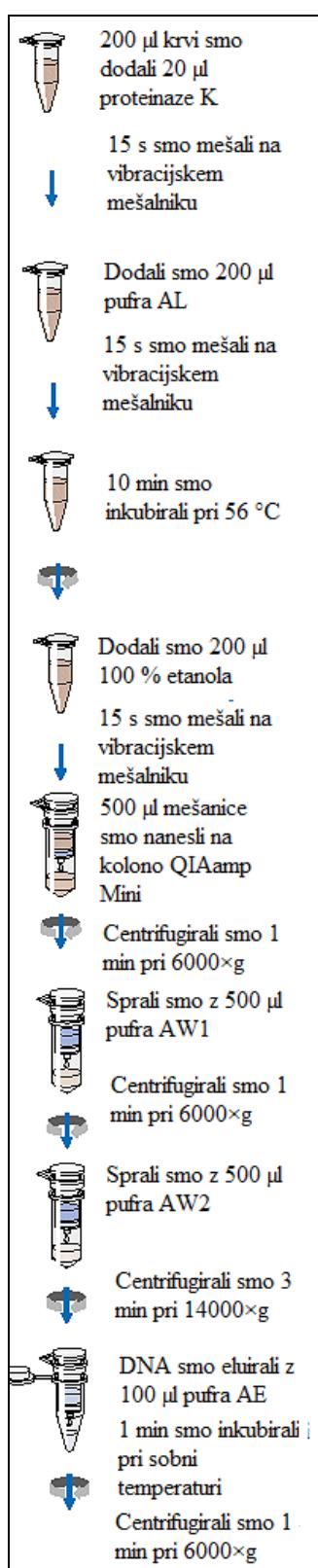
Analizirali smo 167 otrok iz okolice Maribora. Vsi otroci prihajajo iz enakega okolja, kar omogoča zmanjšanje genetske raznolikosti in na ta način izboljša kvaliteto študije. V raziskavo je bilo vključenih 151 otrok z različnimi stopnjami izražanja astme in 16 otrok pri katerih je obstajal sum na astmo, a ta ni bila dokazana. 37 otrok ima hudo obliko astme, 68 zmerno, 46 blago obliko. Pri 16 otrocih je obstajal sum na astmo, a ta ni bila klinično dokazana. 54 % preučevanih otrok je bilo moškega spola in 45 % ženskega spola. Povprečna starost otrok je bila $13,4 \pm 2,9$ let.

3.2 IZOLACIJA DNA

DNA smo izolirali iz krvi s kompletom QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Nemčija) po sledečem protokolu. Postopek izolacije DNA je prikazan na sliki 12.

1. V 1,5 ml mikrocentrifugirko smo odpipetirali 200 μl vzorca krvi.
2. Dodali smo 20 μl proteinaze K in 15 s mešali na vibracijskem mešalniku (*angl. vortex*).
3. Dodali smo 200 μl pufra AL in 15 s mešali na vibracijskem mešalniku.
4. Nato smo 10 min inkubirali pri 56 °C in kratko centrifugirali, s čimer smo odstranili kapljice na pokrovčku.
5. Dodali smo 200 μl 100 % etanola in 15 s mešali na vibracijskem mešalniku in nato še kratko centrifugirali.
6. 500 μl mešanice smo nanesli na QIAamp Mini kolono in namestili na zbiralno mikrocentrifugirko ter nato centrifugirali pri $6000\times g$ 1 min. Kolono smo nato namestili na čisto zbiralno mikrocentrifugirko.
7. Na kolono smo dodali 500 μl pufra AW1 in centrifugirali pri $6000\times g$ 1 min. Kolono smo nato namestili na čisto zbiralno mikrocentrifugirko.
8. Na kolono smo nanesli 500 μl pufra AW2 in centrifugirali pri $14000\times g$ 3 min. Kolono smo nato namestili na čisto zbiralno mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 min pri polni hitrosti.
9. Kolono smo namestili na čisto zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 100 μl pufra AE.
10. Na koncu smo vzorce inkubirali 1 min pri sobni temperaturi in nato pri $6000\times g$ centrifugirali 1 min.

Vzorce izolirane DNA smo shranili pri -30 °C (QIAamp®, 2007).



Slika 11: Protokol za izolacijo DNA.

3.3 PRIPRAVA REAKCIJSKE MEŠANICE ZA ANALIZO

3.3.1 Material

TaqMan® Universal PCR Master Mix (2×)

SNP Genotyping Assay Mix (20×)

Voda brez nukleaz (Nuclease free water)

Mikrotitrská plošča, centrifuga, pipete, nastavki za pipete, vibracijski mešalnik.

3.3.2 Postopek dela

Izolirano DNA smo 25× redčili, ker za izvedbo reakcije potrebujemo DNA s koncentracijo okrog 10 ng/µl. 4 µl DNA smo redčili v 96 µl sterilne vode brez nukleaz in jo premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo si pripravili reakcijsko mešanico. Ta je bila sestavljena iz 2× TaqMan® Universal osnovne zmesi PCR (Applied Biosystems) in zmesi 20× SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), ki je bil specifičen za določanje tarčnega alela. V preglednici 3 je navedena sestava reakcijske mešanice.

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo alelné diskriminacie.

Reagenti	Ena reakcija	Reakcijska mešanica
TaqMan® Universal PCR Master Mix	5 µl	500 µl
20× SNP Genotyping Assay Mix	0,5 µl	50 µl

To smo premešali na vibracijskem mešalniku in nanesli v vdolbinice mikrotitrské plošče. V vsako vdolbinicu smo nanesli 5,5 µl reakcijske mešanice in 4,5 µl ustrezno redčene DNA. Vse analize smo delali v dveh ponovitvah. Dodali smo še negativno kontrolo NTC, kjer smo namesto DNA v dveh ponovitvah nanesli vodo brez nukleaz. Ploščo smo prelepili z zaščitno folijo, ki preprečuje izhlapevanje vzorcev. Ploščo smo stresali v stresalniku Eppendorf Mix Mate pri 500 obratih/min 1 min. Nato smo ploščo centrifugirali v aparatu Eppendorf 5810R pri 515×g 2 min.

Tako pripravljeno ploščo smo vstavili v napravo ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Sequence Detection System opremljen s programske opremo SDS version 1.3.0), ki je prikazan na sliki 12.



Slika 12: ABI PRISM 7500 Real time PCR System.

3.4 IMENA GENOV

Imena genov so bila v diplomski nalogi poenotena v skladu z veljavno nomenklaturo, ki jo predpisuje Hugo Gene Nomenclature Comitte (Hugo Gene Nomenclature Comitte, 2010). Poenotenje je bilo potrebno, ker se v objavah pogosto uporablja različna stara imena genov.

3.5 OBDELAVA PODATKOV

3.5.1 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

V odsotnosti migracij, mutacij, nenaključnega parjenja in selekcije so pogostnosti genotipov funkcija pogostnosti alelov. Ta pojav imenujemo Hardy-Weinbergovo ravnotežje (*angl. Hardy-Weinberg equilibrium; HWE*) in je bil prvič opisan v začetku dvajsetega stoletja. Takrat je bil to pomemben mejnik v zgodovini populacijskih študij. Danes je določevanje, ali opazovane pogostnosti genotipov ustrezajo pričakovanim, eden osnovnih korakov pri analizi populacij. Pričakovane pogostnosti držijo za večino populacij, vendar lahko prihaja tudi do odstopanj.

Če je p pogostnost alela A in q pogostnost alela a za bialelni lokus, potem je v skladu z HWE pričakovana pogostnost za AA genotip p^2 , za Aa genotip $2pq$ in za aa genotip q^2 . Vsota deležev vseh treh genotipov mora biti torej ena.

Ocenjevanje HWE je pogosto prvi pomemben korak pri preverjanju kakovosti genetskih študij. Test HWE predvideva, da so genotipi oseb v študiji vzorčeni naključno iz splošne populacije (Li M. in Li C., 2008).

3.5.2 Statistična analiza

3.5.2.1 Test χ -kvadrat

Kadar želimo vedeti, ali se ugotovljene pogostnosti razlikujejo od pogostnosti, ki bi jih pričakovali na temelju hipoteze, pri statistični analizi uporabljamo test χ -kvadrat. Oblika porazdelitve je odvisna od stopnje prostosti (SP), ki so določene s številom neodvisnih pogostnosti v kontingenčni tabeli. Osnovni domnevi priredimo ničelno domnevo. Posledica zavrnitve ničelne domneve je sprejetje osnovne domneve. Pri analizi določimo še interval zaupanja in kritične meje intervala zaupanja (Adamič, 1989). V našem primeru smo test χ -kvadrat uporabili za izračun HWE. Izbrali smo 5 % stopnjo tveganja, torej je interval zaupanja 95 %. Kritična meja intervala je 3,84 pri SP = 1.

3.5.2.2 Relativno tveganje in razmerje obetov

V medicini pogosto govorimo o binarnem izidu, zato je potrebno ugotoviti še kolikšna je povezava. Pri tem uporabljamo relativno tveganje (RR) in razmerje obetov (OR). Relativno tveganje je razmerje tveganj v dveh skupinah, kjer je p_1 tveganje v prvi skupini in p_2 tveganje v drugi skupini. Tveganju za nek izid p določimo vrednost za nasprotni izid ($1-p$), iz razmerja teh dveh števil pa izračunamo obete $p/(1-p)$. Razmerje obetov je kvocient obetov v dveh skupinah. Pri vrednostih $1 < \Theta < \infty$, so obeti za nek dogodek v prvi skupini večji kot v drugi skupini (Stare, 1998).

Razmerje obetov, intervale zaupanja in vrednosti p smo izračunali s Fisherjevim ekzaktnim testom s pomočjo programa GraphPad Prism 5.

3.6 OZNAČEVANJE GENOV NA KARIOTIPU

Za preglednejšo predstavitev analiziranih genov, smo jih vrisali v kromosomske karte s pomočjo aplikacije v Ensemblu (Ensembl, 2010). To smo storili po naslednjih korakih. Najprej smo poiskali položaj genov na kromosomih. Ti podatki so na voljo v različnih podatkovnih zbirkah, mi smo jih pridobili iz zbirke Ensembl. Te podatke smo zapisali v naslednji obliki:

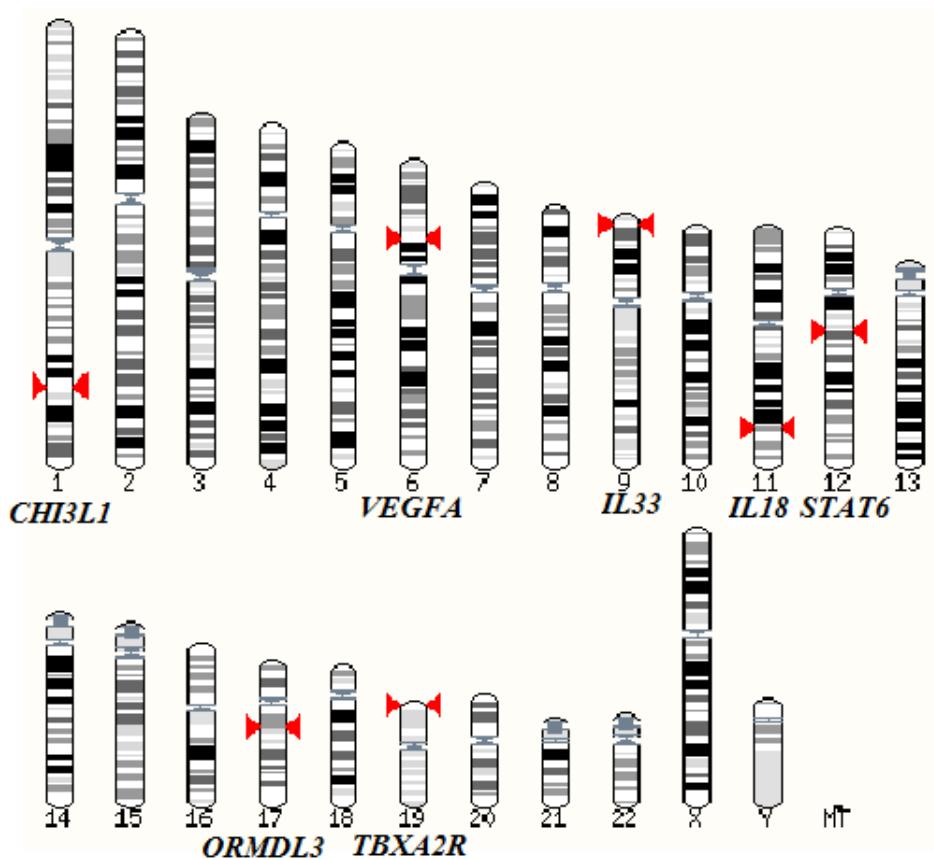
	Položaj gena (bp)		Ime gena
11	112013976	112034840	IL18
12	57489195	57505161	STAT6
19	3594504	3606658	TBXA2R
17	38077294	38083854	ORMDL3
6	43737921	43754224	VEGFA
9	6215809	6257983	IL33
1	203148059	203155922	CHI3L1

Nato smo v internetnem iskalniku odprli Ensemblovo domačo stran. Izbrali smo genom “Human” in nato v stranskem seznamu “*Sample entry points – Karyotype*”. Nadalje smo izbrali “*Manage your data*” in nato naložili zgoraj navedene podatke. V zavihku “*Karyotype panel*” smo nato izbrali “*User attached data*” in izbrali puščice za označitev naloženih genov na kromosomski karti. Vse te nastavitev smo shranili in nato odprli prikaz rezultatov, kateri so prikazani na sliki 13 v poglavju rezultati.

4 REZULTATI

V okviru diplomske naloge smo analizirali devet SNP-jev na sedmih različnih genih, ki bi bili lahko značilno povezani s patogenezo astme oziroma natančneje s stopnjo izražanja astme pri otrocih. Izbrane SNP-je smo določili 151 otrokom z različnimi stopnjami izražanja astme (huda, zmerna, blaga) in 16 otrokom pri katerih je obstajal sum na astmo, a ta ni bila dokazana. Z namenom zmanjšanja vplivov genetske raznolikosti so bili otroci vključeni v raziskavo vsi doma iz okolice Maribora. V raziskavo so bili vključeni polimorfizmi v naslednjih genih: rs5744247 v *IL18*, rs7025417 v *IL33*, rs324011 v *STAT6*, rs3786989 in rs8113232 v *TBXA2R*, rs4795405 v *ORMDL3*, rs833058 in rs2146323 v *VEGFA* in rs4950928 v *CHI3L1*.

Alelne variante SNP-jev posameznikov smo določili z metodo alelne diskriminacije. Določili smo pogostnosti genotipov in posameznih alelov za določen polimorfizem pri skupinah z različnimi stopnjami izražanja astme. Na sliki 14 so prikazani analizirani geni in njihove pozicije na kromosomih, ki smo jih narisali s pomočjo bioinformacijskega orodja znotraj podatkovne zbirke Ensembl.



Slika 13: Položaj analiziranih genov na kromosomih.

Z raziskavo smo dokazali da so s stopnjo izražanja astme povezani širje polimorfizmi treh genov: rs811323 in rs3786989 v *TBXA2R*, rs4795405 v *ORMDL3* in rs833058 v *VEGFA*. Informacije o analiziranih polimorfizmih in povzetki rezultatov so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4: Osnovne informacije o analiziranih genih in povzetki rezultatov.

Gen	Kromosom	SNP	Položaj SNP-ja	Tip zamenjave	Povezava SNP-ja z izražanjem astme
<i>IL18</i>	11	rs5744247	intron	C>G transverzija	ne
<i>STAT6</i>	12	rs324011	intron	C>T tranzicija	ne
<i>TBXA2R</i>	19	rs3786989	intron	C>G transverzija	zmerna/blaga
		rs8113232	ekson	A>G sinonimna	huda/blaga, zmerna/blaga
<i>ORMDL3</i>	17	rs4795405	intergensko območje	C>T tranzicija	huda/zmerna, zmerna/blaga
<i>VEGFA</i>	6	rs833058	intergensko območje	C>T tranzicija	huda/zmerna
		rs2146323	intron	A>C transverzija	ne
<i>IL33</i>	9	rs7025417	intergensko območje	C>T tranzicija	ne
<i>CHI3L1</i>	1	rs4950928	5' neprevedljivo območje	C>G transverzija	ne

4.1 SNP-JI IN ASTMA

4.1.1 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Za izračun Hardy-Weinbergovega ravnotežja smo uporabili statistiko χ^2 ($\alpha=0,05$, SP=1). Mejna kritična vrednost je 3,84. Rezultati so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Rezultati izračuna Hardy-Weinbergovega ravnotežja.

	<i>IL18</i>	<i>STAT6</i>	<i>TBXA2R</i>	<i>TBXA2R</i>	<i>ORMDL3</i>	<i>VEGFA</i>	<i>VEGFA</i>	<i>IL 33</i>	<i>CHI3L1</i>
Alel	rs5744247	rs324011	rs3786989	rs8113232	rs4795405	rs833058	rs2146323	rs7025417	rs4950928
χ^2	6,27	0,01	1,10	0,47	0,66	0,01	0,23	0,03	0,06

Vsi genotipi, razen pri *Rs5744247* v *IL18*, so bili porazdeljeni skladno s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem. χ^2 vrednosti so namreč pri vseh genotipih, razen pri rs5744247 manjše od mejne kritične vrednosti 3,84.

4.1.2 Povezanost SNP-jev s stopnjo izražanja astme

Genotipe bolnikov smo določili z metodo alelne diskriminacije. Pogostnosti genotipov in posameznih alelov astmatikov so po posameznih skupinah bolnikov podani v spodnjih preglednicah: rs5744247 v *IL18* (preglednica 6), rs7025417 v *IL33* (preglednica 8), rs324011 v *STAT6* (preglednica 10), rs3786989 (preglednica 12) in rs8113232 (preglednica 14) v *TBXA2R*, rs4795405 v *ORMDL3* (preglednica 16), rs833058 (preglednica 18) in rs2146323 (preglednica 20) v *VEGFA* in rs4950928 v *CHI3L1* (preglednica 22). Skupina otrok pri katerih je obstajal sum na astmo, a ta ni bila klinično dokazana, je v preglednicah zaradi boljše preglednosti, navedena pod besedo izključena.

Povezanost posameznega polimorfizma s stopnjo izražanja astme, smo statistično ovrednotili. Primerjali smo po dve skupini bolnikov z različnim izražanjem astme. Primerjali smo pogostnosti alelov in pogostnosti združenih rizičnih genotipov pri dveh skupinah z različno težo astme. Kot rizični genotipi so bili izbrani genotipi glede na predhodne objave. Določili smo vrednosti p, razmerja obetov in intervale zaupanja. Rezultati so prikazani v spodnjih preglednicah: rs5744247 v *IL18* (preglednica 7), rs7025417 v *IL33* (preglednica 9), rs324011 v *STAT6* (preglednica 11), rs3786989 (preglednica 13) in rs8113232 (preglednica 15) v *TBXA2R*, rs4795405 v *ORMDL3* (preglednica 17), rs833058 (preglednica 19) in rs2146323 (preglednica 21) v *VEGFA* in rs4950928 v *CHI3L1* (preglednica 23). Statistično značilne povezave so v preglednicah označene krepko.

4.1.2.1 Interlevkin 18

Preglednica 6: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs5744247 v *IL18* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

IL18

Stopnja izražanja astme	Genotipi, n (%)			Aleli, n (%)	
	CC	CG	GG	C	G
Huda	1 (2,7)	7 (18,9)	29 (78,4)	9 (12,2)	65 (87,8)
Zmerna	2 (2,9)	17 (25,0)	49 (72,1)	21 (15,4)	115 (84, 6)
Blaga	2 (4,4)	5 (10,9)	39 (84, 8)	9 (9,8)	83 (90,2)
Izključena	1 (6,3)	0 (0,0)	15 (93,8)	2 (6,3)	30 (93, 8)

Iz pogostnosti genotipov in alelov ni razvidnega značilnega trenda upadanja ali naraščanja skladno s stopnjo izražanja astme. Na splošno je najbolj pogost genotip GG pri vseh treh oblikah astme, še bolj pogosto se genotip GG pojavlja pri osebah pri katerih je pri katerih je bila obstajal sum na astmo, a ta ni bila klinično dokazana.

Preglednica 7: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs5744247 v *IL18* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>IL18</i> rs5744247	C : G		CC + CG : GG	
	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p
Huda/Zmerna	0,758 (0,33 - 1,75)	0,680	1,091 (0,01 - 12,46)	1,000
Huda/Blaga	1,277 (0,48 - 3,40)	0,627	1,636 (0,14 - 18,80)	1,000
Huda/Izključena	2,077 (0,42 - 10,21)	0,498	2,400 (0,14 - 40,96)	0,517
Zmerna/Blaga	1,684 (0,73 - 3,86)	0,237	1,500 (0,20 - 11,05)	1,000
Zmerna/Izključena	2,739 (0,61 - 12,34)	0,254	2,200 (0,19 - 25,90)	0,474
Blaga/Izključena	1,627 (0,33 - 7,96)	0,727	1,467 (0,12 - 17,37)	1,000

Povezava med stopnjo izražanja astme in pogostnostjo alelov C in G v rs5744247 ni statistično značilna.

4.1.2.2 Interlevkin 33

Preglednica 8: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs7025417 v *IL33* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>IL33</i>		Genotipi, n (%)			Aleli, n (%)	
rs7025417	Stopnja izražanja astme	CC	CT	TT	C	T
Huda	0 (0,0)	9 (24,3)	28 (75,7)		9 (12,2)	65 (87,8)
Zmerna	2 (2,5)	18 (26,5)	48 (70,6)		22 (16,2)	114 (83,8)
Blaga	3 (6,5)	15 (32,2)	28 (60,9)		21 (22,8)	71 (77,2)
Izključena	0 (0,0)	4 (25,0)	12 (75,0)		4 (12,5)	28 (87,5)

Iz pogostnosti genotipov in alelov je razviden trend naraščanja pojavnosti alela T v skladu s težjimi oblikami astme. Na splošno je pri vseh oblikah astme najbolj pogost genotip TT.

Preglednica 9: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs7025417 v *IL33* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>IL33</i>		C : G		CC + CG : GG	
rs7025417	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p	
Huda/Zmerna	0,738 (0,36 - 1,50)	0,459	0,537 (0,03 - 8,85)	1,000	
Huda/Blaga	0,706 (0,32 - 1,55)	0,426	1,636 (0,14 - 18,80)	1,000	
Huda/Izključena	0,837 (0,29 - 2,38)	0,801	2,400 (0,14 - 40,96)	0,517	
Zmerna/Blaga	0,957 (0,47 - 1,95)	1,000	3,045 (0,27 - 34,63)	0,564	
Zmerna/Izključena	1,134 (0,42 - 3,07)	0,798	4,467 (0,26 - 75,57)	0,347	
Blaga/Izključena	1,185 (0,42 - 3,37)	0,787	1,467 (0,12 - 17,37)	1,000	

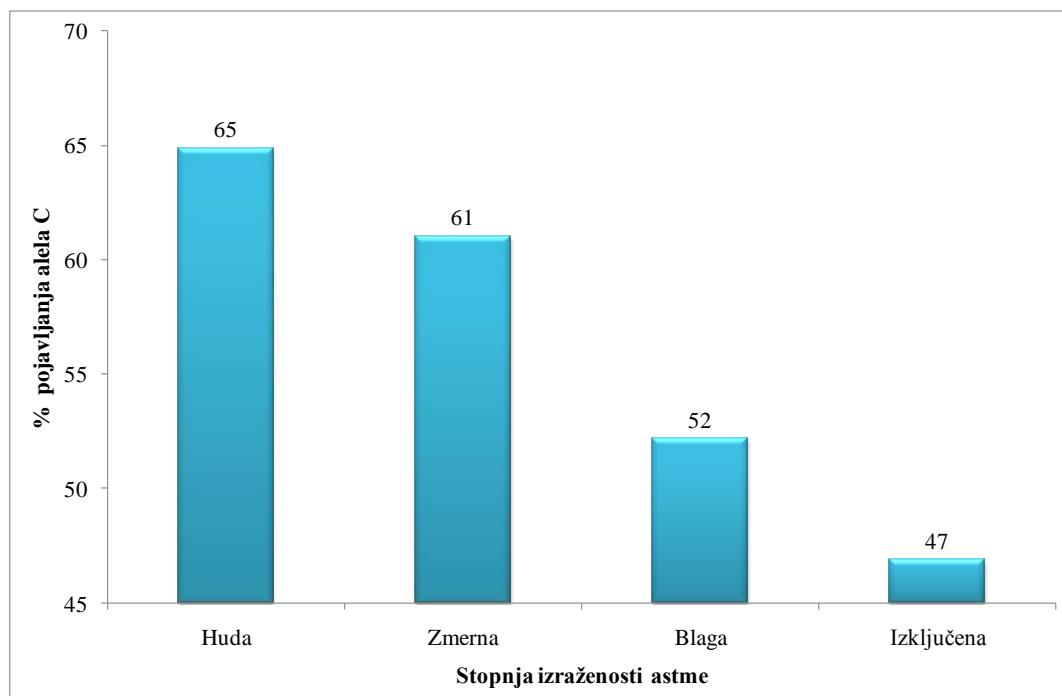
Povezava med stopnjo izražanja astme in pogostnostjo pojavljanja alelov C in G v rs7025417 ni statistično značilna.

4.1.2.3 Signalizacijski dejavnik in aktivator prepisovanja 6

Preglednica 10: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs324011 v *STAT6* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>STAT6</i>		Genotipi, n (%)			Aleli, n (%)	
rs324011	Stopnja izražanja astme	CC	CT	TT	C	T
Huda	17 (46,0)	14 (37,8)	6 (16,2)		48 (64,9)	26 (35,1)
Zmerna	24 (35,3)	35 (51,5)	9 (13,2)		83 (61,0)	53 (39,0)
Blaga	12 (26,1)	24 (52,2)	10 (21,5)		48 (52,2)	44 (47,8)
Izključena	3 (18,8)	9 (56,3)	4 (25,0)		15 (46,9)	17 (53,1)

Iz pogostnosti genotipov in alelov je razviden trend naraščanja alela C skladno s stopnjo izražanja astme. Pri težjih oblikah astme je alel C oziroma genotip CC pogostejši kot pri blažjih oblikah (slika 14).



Slika 14: Pojavljanje alela C (%) v rs324011 pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

Preglednica 11: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs324011 v STAT6 bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

STAT6 rs324011	T : C		TT + TC : CC	
	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p
Huda/Zmerna	1,179 (0,65 - 2,12)	0,655	0,642 (0,28 - 1,45)	0,303
Huda/Blaga	1,692 (0,90 - 3,17)	0,115	0,415 (0,17 - 1,05)	0,068
Huda/Izključena	2,092 (0,90 - 4,86)	0,091	0,272 (0,07- 1,12)	0,073
Zmerna/Blaga	1,436 (0,84 - 2,45)	0,219	0,647 (0,28 - 1,48)	0,315
Zmerna/Izključena	1,775 (0,82 - 3,85)	0,166	0,423 (0,11 - 1,63)	0,247
Blaga/Izključena	1,236 (0,55 - 2,77)	0,683	0,653 (0,16 - 2,70)	0,739

Povezava med stopnjo izražanja astme in pogostnostjo alelov T in C v rs324011 ni statistično značilna. Polimorfizem alela rs324011 sicer ni statistično značilno povezan s stopnjo izražanja astme, vendar je iz pojavljanja alela C razviden trend upadanja v smeri blažjih oblik astme (slika 15).

4.1.2.4 Receptor za tromboksan A2

Preglednica 12: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs3786989 v *TBXA2R* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>TBXA2R</i>		Genotipi n (%)			Aleli, n (%)	
rs3786989	Stopnja izražanja astme	CC	CG	GG	C	G
Huda	0 (0,0)	4 (10,8)	33 (89,2)	4 (5,4)	70 (94,6)	
Zmerna	1 (1,5)	2 (2,9)	65 (95,6)	4 (2,9)	132 (97,1)	
Blaga	0 (0,0)	8 (17,4)	38 (82,6)	8 (8,7)	84 (91,3)	
Izključena	0 (0,0)	0 (0,0)	16 (100,0)	0 (0,0)	32 (100,0)	

Preglednica 13: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs3786989 v *TBXA2R* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>TBXA2R</i>		G : C		GG + GC : CC	
rs3786989	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p	
Huda/Zmerna	1,886 (0,46 - 7,77)	0,456	2,626 (0,55 - 12,43)	0,239	
Huda/Blaga	0,600 (0,17 - 2,08)	0,551	0,576 (0,16 - 2,09)	0,534	
Huda/Izključena	4,149 (0,22 - 79,42)	0,313	4,433 (0,22 - 87,39)	0,303	
Zmerna/Blaga	0,318 (0,09 - 1,09)	0,072	0,219 (0,05 - 0,88)	0,027	
Zmerna/Izključena	2,208 (0,12 - 42,07)	1,000	1,763 (0,09 - 35,87)	1,000	
Blaga/Izključena	6,538 (0,37 - 116,60)	0,111	7,286 (0,40 - 133,80)	0,099	

Polimorfizem alela rs3786989 je povezan s stopnjo izražanja astme ko primerjamo pogostnosti združenih genotipov rizičnega alela G, pri čemer je statistično značilna razlika v pogostnosti pojavljanja med zmerno in blago obliko astme. Pri primerjavi ostalih fenotipov ni statistično značilnih razlik v pojavljanju alela G in C.

Preglednica 14: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs8113232 v *TBXA2R* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>TBXA2R</i>		Genotipi n (%)			Aleli, n (%)	
rs8113232	Stopnja izražanja astme	AA	AG	GG	A	G
Huda	0 (0,0)	5 (13,5)	32 (86,5)	5 (6,8)	69 (93,2)	
Zmerna	0 (0,0)	10 (14,7)	58 (85,3)	10 (7,4)	126 (92,7)	
Blaga	1 (2,2)	15 (32,6)	30 (65,2)	17 (18,5)	75 (81,5)	
Izključena	0 (0,0)	3 (18,8)	13 (81,3)	3 (9,4)	29 (90,6)	

Iz pogostnosti genotipov in alelov je razviden trend naraščanja alela G skladno s stopnjo izražanja astme. Pri težjih oblikah astme je alel GG oziroma genotip G pogostejši kot pri blažjih oblikah.

Preglednica 15: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs8113232 v *TBXA2R* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>TBXA2R</i> rs8113232	G : A		GG + GA : AA	
	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p
Huda/Zmerna	0,913 (0,30 - 2,78)	1,000	0,906 (0,28 - 2,88)	1,000
Huda/Blaga	0,320 (0,11 - 0,91)	0,037	0,293 (0,10 - 0,90)	0,041
Huda/Izključena	0,701 (0,16 - 3,13)	0,695	0,677 (0,14 - 3,26)	0,685
Zmerna/Blaga	0,350 (0,15 - 0,80)	0,013	0,323 (0,13 - 0,80)	0,022
Zmerna/Izključena	0,767 (0,20 - 2,97)	0,715	0,747 (0,18 - 3,10)	0,706
Blaga/Izključena	2,191 (0,60 - 8,04)	0,277	2,311 (0,57 - 9,32)	0,348

Polimorfizem alela rs8113232 je povezan s stopnjo izražanja astme, pri čemer je statistično značilna razlika v pogostnosti pojavljanja med hudo in blago ($p=0,037$ pri primerjavi pogostnosti alelov G in A; $p=0,041$ pri primerjavi združenih rizičnih genotipov GG in GA) ter zmerno in blago obliko astme ($p=0,013$ pri primerjavi pogostnosti alelov G in A; $p=0,022$ pri primerjavi združenih rizičnih genotipov GG in GA). Povezava med stopnjo izražanja astme in aleлом rs8113232 je statistično značilna tako pri primerjavi pogostnosti posameznega alela, kot pri primerjavi združenih rizičnih genotipov. Med ostalimi fenotipi ni statistično značilnih razlik v pojavljanju alela G in A.

4.1.2.5 ORM1 podobnen protein 3 (*S. cerevisiae*)

Preglednica 16: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs4795405 v *ORMDL3* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>ORMDL3</i> rs4795405	Genotipi n (%)			Aleli, n (%)	
	Stopnja izražanja astme	CC	CT	TT	C
Huda	18 (48,7)	16 (43,2)	3 (8,1)	52 (70,3)	22 (29,7)
Zmerna	16 (23,5)	35 (51,5)	17 (25,0)	67 (49,3)	69 (50,7)
Blaga	20 (43,5)	21 (43,5)	6 (13,0)	60 (65,2)	32 (34,8)
Izključena	9 (56,3)	4 (25,0)	3 (18,8)	22 (68,8)	10 (31,3)

Iz pogostnosti genotipov in alelov ni razvidnega značilnega trenda upadanja ali naraščanja skladno s stopnjo izražanja astme. Na splošno je najbolj redek genotip TT pri vseh treh oblikah astme.

Preglednica 17: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs4795405 v *ORMDL3* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>ORMDL3</i> rs4795405	C : T		CC + CT : TT	
	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p
Huda/Zmerna	2,434 (1,33 - 4,44)	0,004	3,778 (1,03 - 13,89)	0,040
Huda/Blaga	1,261 (0,65 - 2,43)	0,510	1,700 (0,39 - 7,32)	0,725
Huda/Izključena	1,074 (0,44 - 2,64)	1,000	2,615 (0,47 - 14,66)	0,351
Zmerna/Blaga	0,518 (0,30 - 0,89)	0,021	0,45 (0,16 - 1,25)	0,155
Zmerna/Izključena	0,441 (0,19 - 1,00)	0,052	0,692 (0,18 - 2,73)	0,751
Blaga/Izključena	0,852 (0,36 - 2,02)	0,830	1,538 (0,34 - 7,04)	0,683

Polimorfizem alela rs4795405 je povezan s stopnjo izražanja astme, pri čemer je statistično značilna razlika v pogostnosti pojavljanja alelov med hudo in zmerno ($p=0,004$ pri primerjavi pogostnosti alelov C in T; $p=0,040$ pri primerjavi združenih rizičnih genotipov CC in CT) ter zmerno in blago obliko astme ($p=0,021$ pri primerjavi pogostnosti alelov C in T). Povezava med hudo in zmerno astmo in aleлом rs4795405 je statistično značilna tako pri primerjavi pogostnosti posameznega alela, kot pri primerjavi združenih rizičnih genotipov. Povezava alela rs4795405 s pojavljanjem zmerne in blaga astme je statistično značilna le pri primerjavi pojavljanja pogostnosti posameznega alela. Med ostalimi fenotipi ni statistično značilnih razlik v pojavljanju alela C in T.

4.1.2.6 Vaskularni endotelni rastni dejavnik A

Preglednica 18: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs833058 v *VEGFA* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>VEGFA</i> rs833058	Genotipi n (%)			Aleli, n (%)	
	Stopnja izražanja astme	CC	CT	TT	C
Huda	10 (27,0)	20 (54,1)	7 (18,9)	40 (54,1)	34 (46,0)
Zmerna	35 (51,5)	24 (35,3)	9 (13,2)	94 (69,1)	42 (30,9)
Blaga	16 (34,8)	24 (52,2)	6 (13,0)	56 (60,9)	36 (39,1)
Izključena	4 (25,0)	10 (62,5)	2 (12,5)	18 (56,3)	14 (43,8)

Iz pogostnosti genotipov in alelov ni razvidnega značilnega trenda upadanja ali naraščanja skladno s stopnjo izražanja astme. Na splošno je alel T pogostejši kot alel C.

Preglednica 19: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs833058 v *VEGFA* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

VEGFA rs833058	T : C		TT + CT : CC	
	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p
Huda/Zmerna	0,525 (0,29 - 0,94)	0,036	2,864 (1,20 - 6,82)	0,023
Huda/Blaga	0,756 (0,41 - 1,41)	0,430	1,440 (0,56 - 3,71)	0,485
Huda/Izključena	0,915 (0,40 - 2,11)	1,000	0,900 (0,23 - 3,45)	1,000
Zmerna/Blaga	1,439 (0,83 - 2,51)	0,204	0,503 (0,23 - 1,09)	0,088
Zmerna/Izključena	1,741 (0,80 - 3,83)	0,211	0,314 (0,09 - 1,07)	0,093
Blaga/Izključena	1,210 (0,54 - 2,73)	0,680	0,625 (0,17 - 2,26)	0,549

Polimorfizem alela rs833058 je povezan s stopnjo izražanja astme, pri čemer je statistično značilna razlika v pogostnosti pojavljanja alelov med hudo in zmerno obliko astme ($p=0,036$ pri primerjavi pogostnosti alelov C in T; $p=0,023$ pri primerjavi pogostnosti združenih rizičnih genotipov CC in CT). Povezava med stopnjo izražanja astme in aleлом T v rs833058 je statistično značilna tako pri primerjavi pogostnosti posameznega alela, kot pri primerjavi pogostnosti združenih rizičnih genotipov. Med ostalimi fenotipi ni statistično značilnih razlik v pojavljanju alela C in T.

Preglednica 20: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs2146323 v *VEGFA* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

VEGFA rs2146323	Genotipi n (%)			Aleli, n (%)	
	AA	AC	CC	A	C
Stopnja izražanja astme					
Huda	5 (13,5)	18 (48,7)	14 (37,8)	28 (37,8)	46 (62,2)
Zmerna	13 (19,1)	25 (36,8)	30 (44,1)	51 (37,5)	85 (62,5)
Blaga	7 (13,0)	23 (50,0)	17 (37,0)	35 (38,0)	57 (62,0)
Izključena	2 (12,5)	10 (62,5)	4 (25,0)	14 (43,8)	18 (56,3)

Iz pogostnosti genotipov in alelov je razviden minimalen trend upadanja alela C z blažjimi oblikami astme, vendar so te razlike zelo majhne. Do razlike pride pri primerjavi pogostnosti alela C pri astmatikih in pri otrocih pri katerih je bila obstajal sum na astmo, a ta ni bila klinično dokazana.

Preglednica 21: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs2146323 v *VEGFA* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>VEGFA</i> rs2146323	A : C		AA + AC : CC	
	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p
Huda/Zmerna	1,014 (0,57 - 1,82)	1,000	1,297 (0,57 - 2,94)	0,679
Huda/Blaga	0,991 (0,53 - 1,86)	1,000	0,963 (0,39 - 2,36)	1,000
Huda/Izključena	0,783 (0,34 - 1,82)	0,666	0,548 (0,15 - 2,04)	0,530
Zmerna/Blaga	0,977 (0,57 - 1,69)	1,000	0,743 (0,34 - 1,60)	0,561
Zmerna/Izključena	0,771 (0,35 - 1,68)	0,549	0,422 (0,12 - 1,44)	0,257
Blaga/Izključena	0,7895 (0,3492 - 1,785)	0,675	0,569 (0,16 - 2,05)	0,542

Povezava med stopnjo izražanja astme in pogostnostjo alelov A in C v rs2146323 ni statistično značilna.

4.1.2.7 Hitinazi 3 podobnen protein 1

Preglednica 22: Pogostnosti genotipov in alelov polimorfizma rs4950928 v *CHI3L1* pri bolnikih z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>CHI3L1</i> rs4950928	Genotipi n (%)			Aleli, n (%)	
	CC	CG	GG	C	G
Stopnja izražanja astme					
Huda	22 (59,5)	14 (37,8)	1 (2,7)	58 (78,4)	16 (21,6)
Zmerna	46 (67,7)	21 (30,9)	1 (1,5)	113 (83,1)	23 (16,9)
Blaga	33 (71,7)	11 (23,9)	2 (4,4)	77 (83,7)	15 (16,3)
Izključena	11 (68,8)	4 (25,0)	1 (6,2)	26 (81,3)	6 (18,8)

Iz pogostnosti genotipov in alelov ni razvidnega značilnega trenda upadanja ali naraščanja skladno s stopnjo izražanja astme. Na splošno je pri vseh oblikah astme najbolj pogost genotip CC.

Preglednica 23: Razmerje obetov in vrednosti p pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih genotipov rs4950928 v *CHI3L1* bolnikov z različnimi stopnjami izražanja astme.

<i>CHI3L1</i> rs4950928	C : T		CC + CT : TT	
	RO (95 % IZ)	p	RO (95 % IZ)	p
Huda/Zmerna	0,718 (0,31 - 1,65)	0,543	0,771 (0,31 - 1,93)	0,652
Huda/Blaga	0,468 (0,20 - 1,10)	0,104	0,500 (0,19 - 1,30)	0,167
Huda/Izključena	0,969 (0,28 - 3,41)	1,000	0,964 (0,25 - 3,75)	1,000
Zmerna/Blaga	0,653 (0,33 - 1,27)	0,230	0,648 (0,29 - 1,43)	0,315
Zmerna/Izključena	1,351 (0,43 - 4,24)	0,788	1,250 (0,36 - 4,35)	1,000
Blaga/Izključena	2,070 (0,65 - 6,58)	0,307	1,929 (0,54 - 6,92)	0,375

Povezava med stopnjo izražanja astme in pogostnostjo alelov C in T v rs4950928 ni statistično značilna.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V študiji smo ugotavljali vpliv devetih izbranih polimorfizmov v sedmih različnih genih na stopnjo izražanja astme pri otrocih. V študijo je bilo vključenih 167 otrok iz okolice Maribora. Vsi polimorfizmi, razen polimorfizma v *IL33*, so bili izbrani na podlagi predhodnih študij, medtem ko je bil *IL33* v povezavi z astmo analiziran prvič. Ker je astma dedna bolezen na katero vpliva mnogo dejavnikov, pogojena tudi z okoljskimi dejavniki, so za potrditve vzročnih bolezenskih genov potrebne številne potrditvene študije.

5.1 HARDY-WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE

Vsi genotipi, razen pri *IL18*, so bili porazdeljeni v skladu s HWE. Odstopanje od HWE je lahko posledica neobičajne strukture populacije, napak pri določanju genotipov ali je odstopanje posledica povezanosti genetskega označevalca s prizadetim fenotipom (Wigginton in sod., 2005). V našem primeru je verjetnost napak pri določanju genotipov izključena. Bolj verjetno je odstopanje posledica premajhnega števila analiziranih oseb oziroma nenavadne strukture populacije.

5.2 IZBRANI SNP-JI IN ASTMA

5.2.1 IL18

Z našo raziskavo nismo potrdili rezultatov pridobljenih v študiji, ki so jo izvedli Harada in sod. (2009), kjer so ugotovili pozitivno korelacijo alela G rs5744247 s stopnjo izražanja astme. Pri vseh štirih skupinah bolnikov je prevladoval genotip GG, vendar njegova pogostnost s stopnjo izražanja astme ni naraščala. Neskladnost s študijo Harade in sod. je lahko posledica številnih dejavnikov. Vzrok je lahko premajhno število analiziranih oseb, drugačnem genetskem ozadju analiziranih bolnikov (Altmüller in sod., 2005) ali ta polimorfizem ne vpliva na stopnjo izražanja astme.

5.2.2 IL33

Polimorfizem rs7025417 je bil izbran na podlagi pogostnosti genotipov v podatkovni zbirkri HapMap, vendar ni povezan s stopnjo izražanja astme. V literaturi najdemo veliko povezav *IL33* z astmo (Prefontaine, 2009; Kondo in sod., 2008), vendar za enkrat še ni objavljene nobene genetske študije, ki bi ga povezale z nastankom astme.

5.2.3 STAT6

Polimorfizem rs324011 v *STAT6* je bil že v mnogih raziskavah povezan z astmo. Kot rizičen navajajo alel T (Weidinger in sod., 2006; Kabesch in sod., 2006). V predhodnih študijah so dokazali povezanost zgoraj omenjenega alela z astmo pri primerjavi pogostnosti alela T med astmatiki in zdravimi kontrolami. Mi smo želeli ugotoviti ali je ta SNP povezan tudi s stopnjami izražanja astme. Naša raziskava je pokazala da s stopnjo izražanja astme narašča pogostnost alela C. Statistično značilne povezave polimorfizma rs324011 s stopnjo izražanja astme nismo dokazali.

5.2.4 TBXA2R

Daley in sod. (2009) so odkrili povezavo alela G v rs3786989 in alela A v rs8113232 s fenotipom astmatika. V naši študiji smo odkrili statistično značilno povezavo genotipov v rs3786989 s stopnjo izražanja astme, pri primerjavi pogostnosti združenih rizičnih genotipov GG in GA pri bolnikih z zmerno in blago obliko astme. Polimorfizem v rs8113232 je statistično značilno povezan s stopnjo izražanja astme, kjer smo odkrili nasprotne ugotovitve kot Daley in sod., saj se je kot rizičen izkazal alel A. Pogostnost alela A s stopnjami izražanja astme namreč narašča. Statistično značilno povezavo polimorfizma v rs8113232 smo odkrili pri primerjavi pogostnosti alelov in združenih rizičnih genotipov (pri čemer sta bila kot rizična uporabljena potrjena genotipa iz literature in to sta GG in GA) pri hudi in blagi astmi, ter zmerni in blagi astmi. Daley in sod. (2009) so zgoraj navedena polimorfizma kot rizična za nastanek astme potrdili pri primerjavi pogostnosti med bolniki in zdravimi kontrolami, z našo študijo smo kot prvi dokazali povezavo teh dveh SNP-jev s stopnjo izražanja astme.

5.2.5 ORMDL3

Rogers in sod (2007) in Moffat in sod. (2009) so odkrili povezavo polimorfizma rs4795405 v *ORMDL3* z nastankom astme. V naši raziskavi smo ta polimorfizem povezali tudi s stopnjo izražanja astme, saj smo potrdili statistično značilno povezavo pogostnosti združenih rizičnih genotipov in pogostnosti alelov s hudo in zmerno obliko astme. Odkrili smo tudi statistično značilno povezavo pogostnosti alelov pri nastanku zmerne in blage oblike astme. *ORMDL3* je bil z astmo povezan že pri več različnih populacijah, pri mehiški, latino in afriško ameriški populaciji (Galanter in sod., 2008) ter pri nemcih in britancih (Moffat n sod., 2007). Kljub njegovi neznani funkciji, so potrdili njegovo povezanost z astmo v rasno in etično različnih populacijah. Nadaljnji cilji raziskovalcev so ugotoviti, kako SNP-ji v *ORMDL3* vplivajo na razvoj astme, torej želijo opredeliti pomen teh SNP-jev na funkcionalni ravni. Vsi do sedaj analizirani polimorfizmi v *ORMDL3*, ki so jih povezali z astmo se nahajajo v intronih. *ORMDL3* je eden redkih genov, ki je bil z astmo povezan v več različnih populacijah (Galanter in sod., 2008). Tudi rezultati naše raziskave podpirajo teorijo, da je *ORMDL3* povezan z astmo.

5.2.6 VEGFA

Sharma in sod. (2009) so odkrili povezavo polimorfizma rs833058 z nastankom astme. V naši študiji smo odkrili povezavo rs833058 s stopnjo izražanja astme. Odkrili smo statistično značilno povezavo pogostnosti združenih rizičnih genotipov in pogostnosti alelov z nastankom hude in zmerne astme. Pri polimorfizmu rs2146323 nismo odkrili statistično značilne povezave s stopnjo izražanja astme. Sharma in sod. so odkrili le različen odziv na zdravljenje s kortikosteroidi glede na alelna variante v rs2146323 posameznika. Študije genetskih različic v *VEGFA* in njihove povezanosti z astmo so pomembne, ker lahko služijo kot označevalci pri prepoznavanju ogroženih posameznikov, katere bi lahko zdravili z zdravili, ki so usmerjena v metabolne poti *VEGFA*. Kljub temu, da rs2146323 ni bil povezan s stopnjo izražanja astme, je pomembno da smo določili genotipe. Te otroke bomo v naslednjih letih spremljali in ugotavljali njihov odziv na

zdravljenje astme z določeno vrsto zdravil. Morda se bo ta SNP izkazal kot pomemben na področju farmakogenetike.

5.2.7 CHI3L1

Polimorfizem rs4950928 ni povezan s stopnjo izražanja astme pri otrocih, kar nasprotuje raziskavi Obra in sod. (2006), ki so pokazali da naj bi bil ta SNP povezan s tveganjem za nastanek astme, bronhialno povečano občutljivostjo in zmanjšano pljučno funkcijo. Alel G naj bi zmotil vezavo transkripcijskih dejavnikov MYC in MAX, kar naj bi povzročilo zmanjšano izražanje gena *CHI3L1*.

5.3 VLOGA SNP-JEV

5.3.1 SNP-ji v intronih

Polimorfizem rs3786989 v *TBXA2R* vpliva na stopnjo izražanja astme. Ta polimorfizem se nahaja v intronu. Polimorfizem je lahko v vezavnem neravnotežju z nekim drugim nukleotidom in posledično sam ne povzroča fenotipskih razlik. Gre za nenaključno povezanost dveh alelov na vezanem lokusu v populaciji. Druga možnost je, da se z zamenjavo nukleotida spremenijo mesta za izrezovanje intronov. Torej so tudi intronske zamenjave funkcionalne narave in lahko vplivajo na nastanek bolezni (Huang in sod., 2010). V intronskih območjih se nahajajo tudi intronski ojačevalci. Če polimorfizem leži znotraj teh zaporedij, lahko zamenjava vpliva na razvoj astme (Barton in sod., 2009).

5.3.2 SNP-ji v intergenskih območjih

Polimorfizem rs833058 v *VEGFA* in rs4795405 v *ORMDL3* se nahajata v intergenskem območju in vplivata na stopnjo izražanja astme. Intergenska območja so območja med gručami genov (*angl. gene clusters*). Tudi v intergenskih območjih prihaja do prepisovanja. Prepise te vrste imenujemo prepisi z neznano funkcijo. Kljub temu, da večina teh prepisov ni anotirana oziroma njihova funkcija še ni znana, postajajo v zadnjih nekaj letih vedno bolj zanimivi (Cooper in sod., 2010). Tudi v intergenskih območjih se namreč lahko nahajajo pomembni regulatorni elementi (Loots in sod., 2000).

5.3.3 SNP-ji in sinonimne mutacije

Polimorfizem rs8113232 v *TBXA2R* je povezan s stopnjo izražanja astme. Gre za sinonimno mutacijo, kar pomeni da kljub zamenjavi nukleotida ne pride do spremembe pripadajoče AK. Tihe mutacije ne vplivajo neposredno na AK zaporedje, vplivajo lahko na stabilnost prepisov mRNA in naj bi celo vplivale na strukturo in delovanje proteinov, kot je bilo pokazano na primeru katehol-O-metyltransferaze (Cooper in sod., 2010).

Polimorfizmi z vplivom na stopnjo izražanja astme, analizirani v naši raziskavi, se vsi nahajajo v intronih, intergenskih območjih ali gre za sinonimne mutacije. Zato le na podlagi zaporedij, brez nadaljnjih raziskav, ne moremo ugotoviti kakšen specifičen fenotip povzročajo oziroma na kaj dejansko vplivajo. Da bi lahko razložili vplive teh

polimorfizmov bi bilo potrebno narediti funkcionalne študije. Funkcionalne študije se v prvi stopnji navezujejo na ugotavljanje vplivov polimorfizmov na moteno izražanje genov, prepisovanje in stabilnost mRNA in nadaljnje na moteno delovanje proteinov (Vercelli, 2003; Futoshi in sod., 2007).

5.4 UPORABNOST GENETSKIH ANALIZ ASTMATIKOV

Genetske analize astmatikov nam omogočajo podrobnejše razumevanje patofiziologije bolezni. To nam omogoča razvoj novih diagnostičnih metod, uporabo bolj učinkovitih postopkov zdravljenja in razvoj strategij za preprečevanje nastanka bolezni pri dovzetnih osebah (Wiesch in sod., 1999). Genetske analize nam lahko prinesejo mnogo podatkov, ki jih lahko uporabimo na klinični ali farmacevtski ravni. Farmakogenomske analize nam dajejo možnost predvidevanja odziva posameznih bolnikov na določeno vrsto zdravila in nam tako omogočijo izbiro terapije prilagojene posamezniku. Na ta način je zdravljenje lahko hitrejše, bolj učinkovito ali z manj stranskimi učinki. Omogoča tudi izbiro ustreznih odmerkov zdravil in hkrati razvoj novih zdravil (Kazani in sod., 2010). Mnogo raziskav se osredotoča predvsem na genetske dejavnike, ki povečujejo tveganje za nastanek astme oziroma so povezani s klinično sliko posameznikov. Z različnimi študijami so že dokazali, da genetsko ozadje astmatikov vpliva na bronhialno povečano odzivnost, stopnje IgE in kar smo potrdili tudi z našo raziskavo, na stopnjo izražanja astme (Holloway in sod., 2008).

Da bi lahko polimorfizme, ki smo jih v tej raziskavi potrdili kot povezane s stopnjo izražanja astme, vpeljali v klinične ali diagnostične namene, bi bilo potrebno to raziskavo še dodatno potrditi z analizo na večjih vzorcih bolnikov. Izmed devetih analiziranih SNP-jev smo z dokazom, da so nekateri od njih (*TBXA2R*, *ORMDL3*, *VEGFA*) povezani s stopnjo izražanja astme, zožili nabor potencialno ustreznih kandidatnih SNP-jev, ki bi lahko bili osnova za diagnozo. V našem primeru bi lahko bolnikom, ki so glede na alele SNP-jev bolj dovzetni za razvoj hujših oblik astme, preventivno svetovali kako naj živijo, da se izognejo napredovanju bolezni. Naši rezultati so torej osnova za nadaljnje raziskovanje in potrjevanje naših ugotovitev, ki bi imele v diagnozi astme lahko ključen pomen.

Asociacijske študije in študije kandidatnih genov, ki bi lahko doprinesli k razvoju ali teži astme so pogosto slabo ponovljivi in z njimi težko ovrednotimo pomembnost specifičnih polimorfizmov. Že v zasnovi se pojavijo problemi z definicijo fenotipov astmatikov, ki otežujejo enotne študije. Druga težava je zbiranje zadosti velikih reprezentativnih vzorcev populacije astmatikov in stratifikacija populacije. Mnogokrat enak polimorfizem daje različne rezultate med populacijami, na primer v evropski populaciji je njegov vpliv na razvoj bolezni močan, v japonski populaciji pa ne vpliva na razvoj bolezni (Kedda in sod. 2004). Pri analizah kompleksnih boleznih pogosto ne potrdimo ugotovitev že izvedenih genetskih asociacijskih študij. Vzrok je lahko velikost vzorca bolnikov, ki jih zajamemo v analizo ali razvoj različnih fenotipov na podlagi različnih okoljskih razmer (Nakashima in sod., 2006).

5.5 SKLEPI IN PRIHODNJE DELO

V raziskavi smo potrdili povezavo nekaterih izbranih polimorfizmov s stopnjo izražanja astme, ki so navedeni spodaj.

- Polimorfizmi rs5744247 v *IL18*, rs324011 v *STAT6*, rs2146323 v *VEGFA*, rs7025417 v *IL33* in rs4950928 v *CHI3L1* niso povezani s stopnjo izražanja astme pri slovenskih otrocih.
- Pogostnost rizičnih genotipov GG in GC v rs3786989 v *TBXA2R* se statistično značilno razlikuje pri otrocih z zmerno in blago astmo ($p=0,027$).
- Pogostnost rizičnih genotipov GG in GA v rs8113232 v *TBXA2R* se statistično značilno razlikuje pri otrocih s hudo in blago astmo ($p=0,041$) ter pri otrocih z zmerno in blago astmo ($p=0,022$). Pogostnosti alelov se statistično značilno razlikujejo pri otrocih s hudo in blago astmo ($p=0,037$) ter pri otrocih z zmerno in blago astmo ($p=0,013$).
- Pogostnost rizičnih genotipov CC in CT v rs4795405 v *ORMDL3* se statistično značilno razlikuje pri otrocih s hudo in zmerno astmo ($p=0,004$). Pogostnosti alelov se statistično značilno razlikujejo pri otrocih s hudo in zmerno astmo ($p=0,004$) in pri otrocih z zmerno in blago astmo ($p=0,021$).
- Pogostnost rizičnih genotipov TT in CT v rs833058 v *VEGFA* se statistično značilno razlikuje pri otrocih s hudo in zmerno astmo ($p=0,023$). Pogostnosti alelov se statistično značilno razlikujejo pri otrocih z hudo in zmerno astmo ($p=0,036$).

V okviru razširitve študije bodo vključene še zdrave kontrole, ki bodo omogočile razdelitev vzorca na dve veliki skupini in s tem primerjavo frekvenc genotipov med astmatiki in zdravimi ljudmi. Na ta način bo statistična moč vplivov posameznih polimorfizmov na fenotip astmatika izboljšana. Raziskavo bomo razširili še v farmakogenomske področje, kjer bomo primerjali povezavo med SNP-ji in odzivom astmatikov na zdravljenje.

6 POVZETEK

Astma je kompleksna dedna bolezen, z mnogimi različnimi fenotipi, ki niso opredeljeni z enotno definicijo, ki bi natančno povzela vse oblike astme. Ključno bi k razumevanju, preprečevanju in zdravljenju astme prispevalo znanje o genetskih vzrokih, ki doprinesajo k razvoju te bolezni. Ker astma prizadene okrog deset % otrok, po vsem svetu poteka mnogo raziskav, ki bi jo genetsko opredelile. Na nastanek astme vpliva mnogo genov, katerih učinki so majhni in posledično še vedno niso znani vsi geni, ki nanjo vplivajo. Z različnimi raziskavami in potrjevanjem preteklih raziskav lahko najbolje definiramo množico genov, ki z različnimi učinki vplivajo na razvoj astme.

Z raziskavo smo ugotavljali vplive devetih različnih polimorfizmov posameznih nukleotidov v sedmih različnih genih na stopnjo izražanja astme na vzorcu 167 otrok iz okolice Maribora. Potrdili smo povezanost štirih polimorfizmov s stopnjo izražanja astme pri slovenskih otrocih, in sicer v rs3786989 in rs8113232 v *TBXA2R*, rs4795405 v *ORMDL3* in rs833058 v *VEGFA*. Kot prvi na svetu smo pokazali, da je SNP rs8113232 v *TBXA2R* močno povezan s stopnjo izražanja astme. V pripravi je objava, s katero bomo rezultate predstavili tudi na mednarodni ravni.

Ugotovitve diplomskega dela bodo osnova za nadaljnje raziskave genetskih dejavnikov vključenih v razvoj astme, kjer bomo najprej vključili še zdrave kontrole in s tem dodatno ovrednotili vpliv teh polimorfizmov na astmo. Predvsem se bomo posvetili nadaljnim raziskavam SNP-ja rs8113232 v *TBXA2R* in njegove povezanosti z astmo, saj se je v naši raziskavi izkazal kot pomemben kandidat za napovedovanje poteka astme. V primeru dobrih rezultatov bi ta SNP lahko vsakodnevno uporabljali v klinični diagnostiki.

7 VIRI

Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izdaja. Ljubljana, Univerza Edvarda Kardelja v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 195 str.

Allelic Discrimination Getting Started Guide for 7300/7500/7500 Fast Systems. 2006. ZDA, Applied biosystems: 70 str.

Altmüller J., Seidel C., Lee Y. A., Loesgen S., Bulle D., Friedrichs F., Jellouschek H., Keller A., Schuster A., Silbermann M., Wahlen W., Wolff P., Schlenvoigt G., Rüschenhoff F., Nürnberg P., Wjst M. 2005. Phenotypic and genetic heterogeneity in a genome-wide linkage study of asthma families. BMC Pulmonary Medicine, 5: 1

Applied Biosystems. 2010.

<https://products.appliedbiosystems.com> (2. julij 2010)

Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farmacevtski vestnik, 55: 215-220

Barton S. J., Koppelman G. H., Vonk J. M., Browning C. A., Nolte I. M., Stewart C. E., Bainbridge S., Mutch S., Rose-Zerilli M. J., Postma D. S., Maniatis N., Henry A. P., Hall I. P., Holgate S. T., Tighe P., Holloway J. W., Sayers I. 2009. PLAUR polymorphisms are associated with asthma, PLAUR levels, and function decline. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 123, 6: 1391-1400

Berce V., Potočnik U., Repnik K. 2008. Povezava nekaterih polimorfizmov v genih za IL-4, NOD2 in CCR5 z astmo pri otrocih. Zdravniški vestnik, 77: 585-591

Bierbaum S., Heinzmann A. 2007. The genetics of bronchial asthma in children. Respiratory Medicine, 101: 1369-1375

Chen W., Hershey G. K. 2007. Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 119: 529-541

Chetta A., Zanini A., Foresi A., D'Ippolito R., Tipa A., Castagnaro A., Baraldo S., Neri M., Saetta M., Olivieri D. 2005. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma. Clinical and Experimental Allergy, 35, 11: 1437-1442

Chupp G. L., Lee C. G., Jarjour N., Shim Y. M., Holm C. T., He S., Dziura J. D., Reed J., Coyle A. J., Kiener P., Cullen M., Grandsaigne M., Dombret M. C., Aubier M., Pretolani M., Elias J. A. 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. The New England Journal of Medicine, 357: 2016-2027

- Cooper D. N., Chen J. M., Ball E. V., Howells K., Mort M., Phillips A. D., Chuzhanova N., Krawczak M., Kehrer-Sawatzki H., Stenson P. D. 2010. Genes, Mutations, and Human Inherited Disease at the Dawn of the Age of Personalized Genomics. *Human mutation*, 31, 6: 631-655
- Daley D., Lemire M., Akhabir L., Chan-Yeung M., He J. Q., McDonald T., Sandford A., Stefanowicz D., Tripp B., Zamar D., Bosse Y., Ferretti V., Montpetit A., Tessier M. C., Becker A., Kozyrskyj A. L., Beilby J., McCaskie P. A., Musk B., Warrington N., James A., Laprise C., Palmer L. J., Paré P. D., Hudson T. J. 2009. Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Human Genetics*, 125: 445-459
- Ensembl. 2010.
<http://www.ensembl.org> (24. maj 2010)
- Espinassous Q., Garcia-de-Paco E., Garcia-Verdugo I., Synguelakis M., von Aulock S., Sallenave J. M., McKenzie A. N., Kanellopoulos J. 2009. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrofages by regulating lipopolysaccharide-receptor complex. *The Journal of Immunology*, 183: 1446-1455
- Futoshi M., Kazuhiro C., Yuichiro H., Yoshiharu K., Yasuo M., Takeshi O., Masaki M., Michihiro K., Morio M., Kouichi O., Toshihiro T., Atsushi T., Toshikazu K., Tomoatsu K., Yoshiaki T., Shiro I. 2007. A Functional Polymorphism in COL11A1, Which Encodes the $\alpha 1$ Chain of Type XI Collagen, Is Associated with Susceptibility to Lumbar Disc Herniation. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 6: 1271-1277
- Galanter J., Choudhry S., Eng C., Nazario S., Rodríguez-Santana J. R., Casal J., Torres-Palacios A., Salas J., Chapela R., Watson H. G., Meade K., LeNoir M., Rodríguez-Cintrón W., Avila P. C., Burchard E. G. 2008. ORMDL3 Gene Is Associated with Asthma in Three Ethnically Diverse Populations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177: 1194-1200
- Germer S., Russell H. 2008. Homogeneous Allele-Specific PCR in SNP Genotyping. V: Single Nucleotide Polymorphisms Methods and Protocols. Pui-Yan K. (ur.). Humana Press: 197-214
- GINA - Global Initiative for Asthma. 2003. Global strategy for asthma management and prevention. National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, NIH Publication: 2-3659
- Gushchin I. S., Prozorovsky N. S., Ignatyeva E. M., Chitaeva V. G., Leskov V. P. 1994. Histamine releasing activity of blood mononuclear cells is acquired by means of activation of mast cells. *Agents Actions*; 41: 16-18

- Hall I. P. 2000. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. European Respiratory Journal, 15, 6: 1120-1127
- Halushka P. V. 2000. Thromboxane A(2) receptors: where have you gone? Prostaglandins Other Lipid Mediators, 60:175-89.
- HapMap - The International HapMap Project. 2010.
<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> (13. jan 2010)
- Harada M., Obara K., Hirota T., Yoshimoto T., Hitomi Y., Sakashita M., Doi S., Miyatake A., Fujita K., Enomoto T., Taniguchi M., Higashi N., Fukutomi Y., Nakanishi K., Nakamura Y., Tamari M. 2009. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. American Journal of Respiratory and Critical Medicine, 180: 1048-1055
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P. M. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research, 6, 10: 986-994
- Holloway J. W., Yang I. A., Holgate S. T. 2008. Interpatient variability in rates of asthma progression: Can genetics provide an answer? The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 121, 3: 573-579
- Hong S. 2004. IL-5 and thromboxane A2 receptor gene polymorphisms are associated with decreased pulmonary function in Korean children with atopic asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 114, 4: 758-763
- Hoshino M., Sim J., Shimizu K., Nakayama H., Koya A. 1999. Effect of AA-2414, a thromboxane A2 receptor antagonist, on airway inflammation in subjects with asthma. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 103: 1054–61
- Huang J. S., Ramamurthy S. K., Lin X., Le Breton G. C. 2003. Cell signaling through thromboxane A2 receptors. Cellular signalling, 16: 521-533
- Huang M., Han Y., Zhang X., Pei F., Deng J., Kang J., Yan C. 2010. An intron polymorphism in the CXCL16 gene is associated with increased risk of coronary artery disease in Chinese Han population: A large angiography-based study. Atherosclerosis 210, 1: 160-165
- Hugo Gene Nomenclature Comittee. 2010.
<http://www.genenames.org/> (13. maj 2010)
- Johansen J. S. 2006. Studies on serum YKL-40 as biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. Danish Medical Bulletin, 53: 172-209

- Kabesch M., Schedel M., Carr D., Woitsch B., Fritzsch C., Weiland S. K., von Mutius E. 2006. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117: 269-274
- Kalina U., Ballas K., Koyama N., Kauschat D., Miethling C., Arnemann J., Martin H., Hoelzer D., Ottmann O. G. 2000. Genomic Organization and Regulation of the Human Interleukin-18 Gene. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52, 6: 525-530
- Kazani S., Wechsler M. E., Israel E. 2010. The role of pharmacogenomics in improving the management of asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 2: 295-302
- Kedda M. A., Shi J., Duffy D., Phelps S., Yang I., O'Hara K., Fong K., Thompson P. J. 2004. Characterization of two polymorphisms in leukotriene C4 synthase gene in an Australian population of subjects with mild, moderate and severe asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 5: 889-895
- Kim J. H., Lee S. Y., Kim H. B., Jin H.S., Yu J. H., Kim B. J., Kim B. S., Kang M. J., Jang S. O., Hong S. J. 2008. TBXA2R gene polymorphism and responsivness to leukotriene receptor antagonist in children with asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 51-59
- Kondo Y., Yoshimoto T., Yasuda K., Futatsugi-Yumikura S., Morimoto M., Hayashi N., Hoshino T., Fujimoto J., Nakanishi K. 2008. Administration of IL-33 induces airway hiperresponsivness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence od adaptive immune system. *International Immunology*, 20: 791-800
- Kotnik V. 2005. Prispevek imunologije k razumevanju astme: Imunološki pogled na težko astmo, Ljubljana, 16. apr. 2005. Košnik M. (ur.), Ljubljana, Alergološka in imunološka sekcija SZD: 8-12
- Kumar A., Ghosh B. 2009. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. *Clinical and molecular allergy*, 7: 7
- Kumlin M., Dahlén B., Björck T., Zetterström O., Granström E., Dahlén S. E. 1992. Urinary excretion of leukotriene E4 and 11-dehydro-thromboxane B2 in response to bronchial provocation with allergen, aspirin, leukotriene D4, and histamine in asthmatics. *American Review of Respiratory Disease*, 146: 96-103
- Kurowska-Stolarska M., Kewin P., Murphy G., Russo R. C., Stolarski B., Garcia C. C., Komai-Koma M., Pitman N., Li Y., Niedbala W., McKenzie A. N., Teixeira M. M., Liew F. Y., Xu D. 2008. IL-33 induces antigen-specific IL-5 T cells and promotes allergic induced airway inflammation independent of IL-4. *The Journal of Immunology*, 181: 4780-4790

- Kurowska-Stolarska M., Stolarski B., Kewin P., Murphy G., Corrigan C. J., Ying S., Pitman N., Mirchandani A., Rana B., van Rooijen N., Shepherd M., McSharry C., McInnes I. B., Xu D., Liew F. Y. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute airway inflammation. *The Journal of Immunology*, 183: 6469-6477
- Lachheb J., Chelbi H., Ben Dhifallah I., Ammar J., Hamzaoui K., Hamzaoui A. 2008. Association of Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms with Asthma in Tunisian Children. *Gene Regulation and System Biology*, 2: 89-96
- Lee C. G., Link H., Baluk P., Homer R. J., Chapoval S., Bhandari V., Kang M. J., Cohn L., Kim Y. K., McDonald D. M., Elias J. A. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFA) induces remodelling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in lung. *Nature Medicine*, 10: 1095-1103
- Li M., Li C. 2008. Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. *Genetic Epidemiology*, 32, 7: 589-99
- Li X., Wilson J. W. 1997. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156: 229-233
- Liew F. Y., Pitman N. I., McInnes I. B. 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews Immunology*, 10: 103-110
- Loots G. G., Locksley R. M., Blankenspoor C. M., Wang Z. E., Miller W., Rubin E. M., Frazer K. A. 2000. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science*, 288: 136-140
- Moffatt M. F., Kabesch M., Liang L., Dixon A. L., Strachan D., Heath S., Depner M., von Berg A., Bufe A., Rietschel E., Heinemann A., Simma B., Frischer T., Willis-Owen S. A., Wong K. C., Illig T., Vogelberg C., Weiland S. K., von Mutius E., Abecasis G. R., Farrall M., Gut I. G., Lathrop G. M., Cookson W. O. 2007. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*, 448: 470-474
- Muhl H., Pfeilschifter J. 2004. Interleukin-18 bioactivity: a novel target for immunopharmacological anti-inflammatory intervention. *European Journal of Pharmacology*, 500: 63-71
- Nakahata N. 2008. Tromboxane A₂: physiology/patophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, 118: 18-35
- Nakashima K., Hirota T., Obara K., Shimizu M., Doi S., Fujita K., Shirakawa T., Enomoto T., Yoshihara S., Ebisawa M., Matsumoto K., Saito H., Suzuki Y., Nakamura Y., Tamari M. 2006. A functional polymorphism in MMP-9 is associated with

- childhood atopic asthma. Biochemical and Biophysical Research Communications, 344: 300-307
- Ober C., Hoffjan C. 2006. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes and Immunity*, 7: 95-100
- Ober C., Tan Z., Sun Y., Possick J. D., Pan L., Nicolae R., Radford S., Parry R. R., Heinzmann A., Deichmann K. A., Lester L. A., Gern J. E., Lemanske R. F. Jr, Nicolae D. L., Elias J. A., Chupp G. L. 2008. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *The New England Journal of Medicine*, 358, 16:1682-91
- OMIM - Online Mendelian Interference in Man. 2010.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (15. marec 2010)
- Papaioannou A. I., Kostikas K., Kollia P., Gourgoulianis K. I. 2006. Clinical implications for Vascular Endothelial Growth Factor in the lung: friend or foe? *Respiratory Research*, 7: 128
- Préfontaine D., Lajoie-Kadoch S., Foley S., Audusseau S., Olivenstein R., Halayko A. J., Lemière C., Martin J. G., Hamid Q. 2009. Increased expressin of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth misle. *The Journal of Immunology*, 180: 2443-2449
- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2007. Nemčija, QIAGEN: 27-29
- Rogers A. J., Raby B. A., Lasky-Su J. A., Murphy A., Lazarus R., Klanderman B. J., Sylvia J. S., Ziniti J. P., Lange C., Celedón J. C., Silverman E. K., Weiss S. T. 2009. Assessing the reproducibility of asthma candidate gene associations, using genome-wide data. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179, 12: 1084-1090
- Rolin S., Masereel B., Dogné J. M. 2006. Prostanoids as pharmacological targets in COPD and asthma. *European Journal of Pharmacology*, 533, 8: 89-100
- Schedel M., Carr D., Klopp N., Woitsch B., Illig T., Stachel D., Schmid J., Fritzsch C., Weiland S. K., von Mutius E., Kabesch M. 2004. A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114: 1100-1105
- Schedel M., Frei R., Bieli C., Cameron L., Adamski J., Lauener R., Kabesch M. 2009. An IgE-associated polymorphism in STAT6 alters NF-κB binding, STAT6 promoter activity, and mRNA expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124, 3: 583-589

- Sharma S., Murphy A. J., Soto-Quiros M. E., Avila L., Klanderman B. J., Sylvia J. S., Celedón J. C., Raby B. A., Weiss S. T. 2009. Association of VEGF polymorphisms with childhood asthma, lung function and airway responsiveness. European Respiratory Journal, 33, 6: 1287-1294
- Smithgall M. D., Comeau M. R., Yoon B. R., Kaufman D., Armitage R., Smith D. E. 2008. IL-33 amplifies both Th1-and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. International Immunology, 20: 1019-1031
- Stare J. 1998. Relativno tveganje in razmerje obetov. Zdravniški vestnik, 67: 297-299
- Szalai C., Ungvári I., Pelyhe L., Tölgyesi G., Falus A. 2008. Asthma from a pharmacogenomic point of view. British Journal of Pharmacology, 153: 1602-1614
- Tavendale R. 2008. A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 121: 860-863
- Trifilieff A., El-Hasim A., Corteling R., Owen C. E. 2000. Abrogation of lung inflammation in sensitized Stat6-deficient mice is dependent on the allergen inhalation procedure. British Journal of Pharmacology, 130: 1581-1588
- Valasek M. A., Repa J. J. 2005. The power of real-time PCR. Advances In Physiology Education, 29, 3: 151-159
- Vercelli D. 2003. Genetic polymorphism in allergy and asthma. Current Opinion in Immunology, 15, 6: 609-613
- Vercelli D. 2008. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. Nature Reviews Immunology, 8: 169-183
- Vignola A. M., Mirabella F., Costanzo G., Di Giorgi R., Gjomarkaj M., Bellia V., Bonsignore G. 2003. Airway remodeling in asthma. Chest, 123: 417-422
- Weidinger S., Klopp N., Wagenpfeil S., Rümmler L., Schedel M., Kabesch M., Schäfer T., Darsow U., Jakob T., Behrendt H., Wichmann H. E., Ring J., Illig T. 2004. Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. Medical Genetics, 41: 658-663
- Weigu C., Hersey K. 2007. Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 19, 3: 529-541
- Wenzel S. E., Westcott J. Y., Larsen G. L. 1991. Bronchoalveolar lavage fluid mediator levels 5 minutes after allergen challenge in atopic subjects with asthma:

- relationship to the development of late asthmatic responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 87: 540-548
- Wiesch D. G., Meyers D. A., Bleeker E. R. 1999. Genetics of asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104, 5: 895-901
- Wigginton J. E., Cutler D. J., Abecasis G. R. 2005. A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, 76: 887-883
- Wjst M. ORMDL3 – guilt by association? *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 1579-1581
- Xu D., Chan W. L., Leung B. P., Huang F., Wheeler R., Piedrafita D., Robinson J. H., Liew F. Y. 1998. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cell. *The Journal of Experimental Medicine*, 187: 787-794

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Petru Korošcu, ki mi je omogočil izdelavo diplomske naloge in s tem prve korake v svet humane genetike.

Zahvaljujem se mojemu delovnemu mentorju dr. Matiji Rijavcu za usmerjanje pri delu in pozoren pregled diplomskega dela. Zahvaljujem se mu tudi za potrpežljivost in za vse kar me je naučil.

Hvala tudi moji mentorici doc. dr. Tanji Kunej za usmerjanje pri delu in optimističnemu pogledu, ki mi je olajšal delo.

Hvala tudi recenzentki prof. dr. Janji Marc za hiter pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi bratu Andražu Balantiču za računalniško podporo tekom celotnega študija in pa staršem, ki so mi omogočili izobraževanje.

PRILOGA A

Genotipi analiziranih polimorfizmov pri posameznih bolnikih.

	<i>IL18</i>	<i>STAT6</i>	<i>TBXA2R</i>	<i>TBXA2R</i>	<i>ORMDL3</i>	<i>VEGFA</i>	<i>VEGFA</i>	<i>IL33</i>	<i>CHI3L1</i>
ID	rs5744247	rs324011	rs3786989	rs8113232	rs4795405	rs833058	rs2146323	rs7025417	rs4950928
1	GG	CT	GG	GG	TT	CT	CC	TT	CC
2	CG	CC	GG	GG	CT	CC	CC	TT	CG
3	GG	CT	GG	AG	TT	TT	CC	CT	CG
4	GG	TT	CG	AG	CT	TT	CC	TT	CC
5	GG	TT	GG	AG	CC	TT	CC	TT	CC
6	GG	TT	GG	GG	CT	CC	AC	TT	CG
7	GG	CC	GG	GG	CT	CC	CC	TT	CG
8	GG	CT	GG	AG	CC	CT	AC	TT	CC
9	GG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	TT	CG
10	GG	CT	CG	GG	CT	CC	AC	CT	CG
11	GG	CT	GG	AG	TT	CT	AC	TT	CC
12	GG	CT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CG
13	CG	CT	GG	GG	CC	TT	CC	TT	CC
14	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	CT	CG
15	CG	CC	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
16	GG	CT	GG	AG	CC	CT	CC	TT	CG
17	GG	CT	GG	AG	TT	CT	AC	TT	CC
18	GG	TT	GG	GG	CT	TT	CC	CT	CC
19	GG	CT	CG	GG	TT	CC	AC	TT	CC
20	GG	CC	GG	GG	TT	CC	AC	CT	CC
21	GG	TT	GG	AG	CC	CC	AC	CT	CC
22	CG	CT	GG	GG	TT	CC	CC	TT	CC
23	CG	CT	GG	GG	TT	CC	AC	TT	CC
24	GG	CT	CC	AG	CT	CT	CC	TT	CG
25	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	CT	CC
26	CG	CT	CG	AG	CT	CT	CC	TT	CC
27	GG	CC	GG	GG	CT	CC	AA	CC	CC
28	CG	CT	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
29	GG	CT	GG	GG	CT	TT	CC	TT	CG
30	GG	CC	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CG
31	CG	CT	GG	GG	TT	CC	AC	TT	CG
32	GG	TT	CG	GG	CC	CT	AC	CT	CC
33	CG	CT	GG	AG	CT	CT	AC	TT	CG
34	GG	TT	GG	GG	TT	CC	AA	TT	CG
35	CG	CT	GG	GG	TT	CT	CC	TT	CC
36	CG	CC	GG	GG	CT	CC	CC	TT	CG
37	GG	TT	GG	AG	CT	CC	AA	TT	CC

se nadaljuje

nadaljevanje

38	GG	CT	GG	AA	CC	CT	AC	CT	CG
39	CC	CC	GG	GG	TT	CT	AC	TT	CC
40	CG	CC	GG	GG	TT	CT	AC	TT	CG
41	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	CT	CC
42	GG	TT	GG	GG	CT	TT	CC	TT	CC
43	GG	CC	GG	GG	CT	TT	CC	CT	CG
44	GG	CC	CG	AG	CT	TT	CC	CT	CC
45	GG	CT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
46	GG	CC	GG	AG	CT	CC	AC	CC	CG
47	GG	TT	GG	GG	CT	CT	CC	CT	CC
48	CG	CT	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CC
49	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	TT	CC
50	GG	CT	GG	GG	CC	CC	AA	TT	GG
51	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
52	CG	CC	GG	GG	CT	CC	CC	CT	CG
53	GG	TT	GG	GG	TT	CC	AA	CT	CC
54	GG	CT	GG	GG	TT	CT	CC	CT	CG
55	GG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	TT	CC
56	GG	CT	GG	GG	TT	CT	CC	CT	CC
57	GG	CT	GG	GG	CC	CC	AA	TT	CC
58	GG	TT	CG	AG	CT	CC	CC	TT	CC
59	GG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CG
61	CG	CC	GG	GG	CT	CT	CC	TT	CC
62	GG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CC
63	GG	TT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
64	GG	CC	GG	AG	CT	TT	CC	TT	CC
65	GG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	TT	CC
66	CG	CC	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CC
67	GG	TT	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CC
68	GG	CC	GG	GG	CT	CC	AC	TT	GG
69	GG	CC	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
70	GG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	TT	CC
71	GG	CT	GG	GG	CT	CC	CC	TT	CC
72	GG	CC	GG	GG	CC	TT	CC	TT	CC
73	GG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	CT	CC
74	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	CT	CC
75	GG	TT	GG	GG	CT	CT	CC	TT	CC
76	GG	CC	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
77	GG	CT	GG	GG	CC	CC	AC	TT	CC
78	GG	CC	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
79	GG	TT	GG	AG	CC	CT	AC	TT	CC

se nadaljuje

nadaljevanje

80	GG	CT	GG	AG	CC	CT	AC	TT	CC
81	CG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	TT	CC
82	CG	CC	GG	GG	CC	CC	AA	TT	CC
83	GG	CC	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
84	GG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	CT	CC
85	GG	CC	GG	GG	CC	CC	AC	TT	CC
86	CC	CT	CG	AG	CC	TT	CC	TT	CC
87	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	CC	GG
88	GG	CC	GG	GG	CC	CC	AC	CT	CC
89	CG	TT	GG	GG	CC	CT	AC	CT	CC
90	GG	CC	GG	GG	CT	TT	CC	TT	CC
91	CG	TT	GG	GG	CC	CT	AC	CC	CC
92	CC	CT	CG	AG	CT	TT	CC	TT	CC
93	GG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CG
94	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
95	CG	CT	CG	AG	CT	CT	AC	CT	CC
96	GG	CT	GG	GG	TT	CT	AC	CT	GG
97	GG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CG
98	GG	CC	GG	GG	CC	CT	AC	CT	CG
99	CG	CC	GG	GG	CC	CT	AC	CT	CC
100	GG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CC
101	GG	CT	GG	GG	CC	CC	AA	CT	CC
102	GG	CT	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CC
103	GG	CT	GG	AG	TT	CC	CC	TT	CG
104	GG	CT	GG	AG	CT	CT	AC	TT	CG
105	GG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	CC	CG
106	GG	CC	GG	GG	CT	CT	AC	CT	CG
107	GG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	CT	CC
108	CC	CC	GG	GG	TT	TT	CC	TT	CC
109	GG	TT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	GG
110	GG	TT	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CC
111	GG	TT	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CC
112	GG	CT	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CC
113	GG	CT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CG
114	GG	CT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
115	CG	CT	GG	GG	CT	CT	CC	TT	CC
116	GG	CC	GG	GG	CC	TT	CC	TT	CC
117	CG	CC	CG	GG	CT	CT	AC	CT	CC
118	GG	CC	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
119	GG	TT	GG	GG	CT	CT	AC	CT	CG
120	GG	TT	GG	GG	CC	CC	AA	CT	CG

se nadaljuje

nadaljevanje

121	GG	CC	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
122	GG	CT	GG	GG	TT	TT	CC	TT	CG
123	GG	TT	GG	AG	CT	CC	CC	TT	CG
124	GG	CC	GG	GG	CT	CC	AA	CT	CG
125	CG	CC	GG	AG	CC	CT	AC	CT	CC
126	GG	CT	CG	GG	CC	TT	CC	TT	CC
128	GG	CT	GG	GG	TT	CT	AC	CT	CG
129	CC	TT	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CC
130	GG	CC	GG	GG	TT	CC	AA	TT	CC
131	GG	CC	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
132	CC	CC	GG	AG	CC	CT	AC	CT	CC
133	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
134	GG	CT	GG	GG	CC	TT	CC	TT	CC
135	GG	CT	GG	AG	CC	CT	AC	CT	CC
136	CG	CT	GG	AG	CC	CC	AC	CT	CC
137	GG	CT	GG	GG	CC	CC	CC	TT	CG
138	GG	CT	GG	GG	CC	CT	CC	CT	CG
139	GG	CT	GG	GG	TT	CT	AC	TT	CC
140	GG	CT	CG	AG	CT	CT	AC	TT	CG
141	GG	CC	GG	GG	TT	CC	AC	TT	CC
142	GG	CT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
143	GG	CT	GG	GG	CC	TT	CC	CT	CG
144	GG	CC	GG	GG	TT	CC	AC	TT	CC
145	GG	CC	GG	AG	TT	CT	AC	CT	CC
146	GG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	CT	CC
147	GG	CT	GG	GG	CC	TT	CC	TT	CC
148	GG	CT	GG	GG	CC	CC	AA	TT	CC
149	GG	CC	GG	GG	CT	TT	CC	TT	CG
150	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AA	CT	CC
151	GG	CT	GG	GG	TT	CC	AC	TT	CC
152	GG	CT	CG	AG	CT	CC	AA	TT	CC
153	GG	CT	GG	GG	TT	CC	AC	TT	CG
154	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AA	TT	CC
155	CG	TT	GG	GG	CC	CC	CC	TT	CG
156	GG	CC	GG	GG	CC	CT	AC	CT	CC
157	GG	CC	GG	GG	CC	TT	CC	TT	CG
158	GG	CC	GG	GG	TT	CC	AC	TT	CC
159	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AA	CT	CC
160	GG	TT	GG	GG	CC	CC	AC	CT	CC
161	GG	CT	GG	GG	CC	CT	AC	TT	CC
162	GG	TT	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CG

se nadaljuje

nadaljevanje

163	CG	CC	GG	GG	CC	CT	CC	TT	CC
164	CG	CT	GG	AG	CT	CC	AA	TT	CC
165	GG	CC	GG	GG	CT	CT	AC	TT	CC
166	GG	TT	GG	GG	CT	CC	CC	TT	CG
167	GG	CT	GG	GG	CT	CC	AC	TT	CG
168	GG	CT	GG	AG	CC	CT	AC	TT	CG
169	GG	CT	GG	GG	CC	TT	CC	TT	CG

Opomba: Bolnika z identifikacijskimi številkami 60 in 127 nista bila vključena v analizo.