

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mateja ŽAVBI

**GENETSKA IN FARMAKOGENETSKA ANALIZA
IZBRANIH GENOV PRI BOLNIKI Z ASTMO V
SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI DOKTORSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM BIOMEDICINA
ZNANSTVENO PODROČJE GENETIKA

Mateja ŽAVBI

**GENETSKA IN FARMAKOGENETSKA ANALIZA IZBRANIH
GENOV PRI BOLNIKI Z ASTMO V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**GENETIC AND PHARMACOGENETIC ANALYSIS OF
SELECTED GENES IN SLOVENIAN ASTHMA PATIENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študijskega programa Biomedicina s področja genetike na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo Golnik, v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 31. seje Komisije za doktorski študij z dne 19.02. 2012 in 21. seje z dne 13.10. 2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje genetike. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Peter Korošec in za somentorja doc. dr. Matija Rijavec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: izr. prof. dr. Tanja Kunej
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Mitja Košnik
Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Član: prof. dr. Borut Peterlin
Univerzitetni klinični center, Klinični inštitut za medicinsko genetiko

Datum zagovora: 02.06.2016

Podpisna izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mateja Žavbi

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 575.111:616.2:615(497.4)(043.3)=163.6
KG astma/ fenotip astme/ rinitis/ genetika/ polimorfizem posameznega nukleotida/ asociacijska raziskava/ KOPB/ lokus 17q12–17q21.1/ *ORMDL3*/ *RP11-387H17.4*/ haplotip/ farmakogenetika/ *VEGFA*/ odziv na zdravljenje
AV ŽAVBI, Mateja, univ. dipl. biotehnol.
SA KOROŠEC, Peter (mentor)/RIJAVEC, Matija (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicine, področje genetike
LI 2016
IN GENETSKA IN FARMAKOGENETSKA ANALIZA IZBRANIH GENOV PRI BOLNIKI Z ASTMO V SLOVENIJI
TD Doktorska disertacija
OP XI, 103 str., 16 pregl., 5 sl., 198 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Za astmo je značilna družinska obremenjenost. Kljub številnim raziskavam še ne poznamo genov, ki bi z visoko gotovostjo napovedovali njen razvoj. Tudi raznolik odziv na zdravljenje naj bi bil povezan z genetskim ozadjem, zato iščemo farmakogenetske označevalce, s pomočjo katerih bi ga lahko napovedali. V naši raziskavi smo proučevali polimorfizme posameznih nukleotidov (SNP-je) v lokusu 17q12–17q21.1 pri odraslih z astmo, v farmakogenetskem delu pa smo proučevali SNP-je v genu *VEGFA* pri otrocih z astmo. Ugotovili smo, da je rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4*, povezan z astmo pri odraslih, predvsem z astmo brez pridruženega rinitisa. Zanj je značilna manjša reverzibilnost obstrukcije dihalnih poti, ki je sicer značilna za bolnike s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB), zato smo preverili še povezavo rs4795405 s KOPB. Izkazalo se je, da je rs4795405 povezan tudi s KOPB. Na podlagi ugotovljene povezave rs4795405 z astmo smo analizo razširili na večji del lokusa 17q12–17q21.1, tako da smo proučevali 13 SNP-jev na drugi, večji skupini bolnikov. Najpomembnejši rezultat je povezava haplotipov, ki jih sestavljajo rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777, ki se nahajajo v genih *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, z astmo. Štirje haplotipi so bili pogostejši pri bolnikih z astmo, medtem ko so bili štirje pogostejši pri zdravih, in so bili prisotni pri 31 % zdravih v primerjavi s 3 % bolnikov z astmo. Ugotovljena povezava haplotipov nakazuje, da se nekje v tem haplotipnem lokusu nahaja genetska različica ali kombinacija različic, ki lahko pomembno doprinesejo k astmi pri odraslih. Morda imajo pri astmi poleg že znanih genov, kot so *GSDMA*, *ORMDL3* in *GSDMB*, pomembno vlogo tudi geni *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, ki so doslej pri astmi, genetsko in biološko, slabo raziskani. V tem delu raziskave so bili z astmo šibko oz. mejno povezani rs12936231 v *ZPBP2*, rs2305480 in rs7216389 v *GSDMB*, rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4* ter rs7219080 v *GSDMA*, za katere ne moremo potrditi, da doprinesejo k astmi. V drugem delu raziskave nismo ponovili povezave rs4795405 z astmo, ki je bil v prvem delu povezan predvsem z astmo brez rinitisa. V tem delu raziskave podatkov o prisotnosti rinitisa nismo imeli. Povezave s fenotipi astme (atopija, pljučno delovanje, obdobje, ko se astma razvije, kajenje) in 13-imi SNP-ji nismo ugotovili. V farmakogenetskem delu raziskave smo ugotovili, da se otroci z genotipom AA v rs2146323 v *VEGFA* bolje odzivajo na zdravljenje z inhalacijskimi kortikosteroidi (IK) in slabše na zdravljenje z antagonisti receptorjev za levkotriene (LTRA). Otroci z genotipom TT v rs833058 v *VEGFA* se bolje odzivajo na zdravljenje z LTRA, ko jih jemljejo po potrebi. Zaključimo lahko, da je lokus 17q12–17q21.1 povezan z astmo in KOPB pri odraslih slovenskih bolnikih in da je *VEGFA* kandidatni farmakogenetski gen za astmo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 575.111:616.2:615(497.4)(043.3)=163.6
CX asthma/ asthma phenotype/ rhinitis/ genetics/ single nucleotide polymorphism/ association study/ COPD/ locus 17q12–17q21.1/ *ORMDL3*/ *RP11-387H17.4*/ haplotype/ pharmacogenetics/ *VEGFA*/ treatment response
AU ŽAVBI, Mateja, B. Sc. Biotech.
AA KOROŠEC, Peter (supervisor)/RIJAVEC, Matija (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, Field: Genetics
PY 2016
TI GENETIC AND PHARMACOGENETIC ANALYSIS OF SELECTED GENES IN SLOVENIAN ASTHMA PATIENTS
NO XI, 103 p., 16 tab., 5 fig., 198 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Asthma has a strong heritable component. Despite numerous studies, genetic variants, which would predict its development with high certainty, have not yet been identified. Furthermore, genetic variance may also be associated with variable responses to treatment. We have performed an association analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in asthma candidate locus 17q12–17q21.1 in adults and pharmacogenetic analysis of *VEGFA* SNPs in children with asthma. An association between rs4795405, located upstream of *ORMDL3* in *RP11-387H17.4*, and asthma in adults was found. Phenotype analysis revealed strong association of rs4795405 and asthma without rhinitis, for which less reversible airway obstruction was shown previously. Because this is a major characteristic of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), we have further analysed rs4795405 in this group of patients and confirmed association. Due to rs4795405 association found, we have extended the analysis of 17q12–17q21.1 locus, by analysing 13 SNPs in other, larger group of asthma patients. The most important result found was an association of haplotypes composed of rs9916279, rs8066582, rs1042658 and rs2302777, located in *PSMD3*, *CSF3* and *MED24*. Four haplotypes were more frequent in asthma, whereas the remaining four were more frequent in controls, with 31% compared to only 3% in asthma. This finding suggests there is a variant or a combination of variants located in this haplotype block, which could contribute to asthma. With this approach we have identified new genes - *PSMD3*, *CSF3* and *MED24*, that could have a role in asthma in addition to already known genes like *GSDMA*, *ORMDL3* and *GSDMB*. In single SNP analysis only weak association between asthma and rs12936231 in *ZBP2*, rs2305480 and rs7216389 in *GSDMB*, rs4795405 located upstream of *ORMDL3* in *RP11-387H17.4* and rs7219080 in *GSDMA* was found, thus we cannot confirm their contribution to disease development. We have not confirmed association between rs4795405 and asthma found in the first part of the analysis, in which rs4795405 it was primary associated with asthma without rhinitis, whereas this data was not available in the second part. Furthermore, there was no association between 13 analysed SNPs and asthma phenotypes, specifically atopy, lung function, childhood vs. adult asthma and smoking, thus we cannot confirm their contribution to asthma heterogeneity. In pharmacogenetic part of our research we have shown that patients with AA genotype in rs2146323, which is located in *VEGFA*, have better response on inhaled corticosteroids (ICS) and worst response on leukotriene receptor antagonists (LTRA). TT genotype in rs833058, which is located in *VEGFA*, was associated with better treatment response to episodically used LTRA. In conclusion, 17q12–17q21.1 SNPs are associated with asthma and COPD in adult Slovenian patients and *VEGFA* is a candidate gene for asthma treatment response.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KRATICE IN OKRAJŠAVE	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN CILJ RAZISKAVE	2
1.2 HIPOTEZE	5
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 BIOLOGIJA ASTME	5
2.2 RAZDELITEV ASTME	6
2.3 GENETIKA ASTME	7
2.3.1 Polimorfizmi posameznih nukleotidov in haplotipi	7
2.3.2 Pristopi h genetski analizi astme	9
2.3.2.1 Analiza kandidatnih genov	9
2.3.2.2 Analiza genske povezanosti	10
2.3.2.3 Asociacijske študije celotnega genoma	11
2.3.3 Astma in vpliv okolja	13
2.3.4 Astma in interakcije med geni	13
2.3.5 Genetika astme in drugih bolezni	14
2.3.6 Lokus 17q12–17q21.1	14
2.3.6.1 Protein 2, ki se veže na steklasto ovojnico jajčnikovega folikla	20
2.3.6.2 Gasdermin B	20
2.3.6.3 ORMDL-regulator biosinteze sfingolipidov 3	20
2.3.6.4 Gasdermin A	21
2.3.6.5 Spodbujevalni dejavnik rasti (granulocitnih) kolonij 3	21
2.3.6.6 Ne-ATP-azna podenota 3 proteasoma 26S	21
2.3.6.7 Štiriindvajseta podenota posrednika transkripcije	21
2.4 PRIMERJAVA BIOLOGIJE TER GENETIKE ASTME IN KOPB TER ACOS	22
2.5 FARMAKOGENETIKA ASTME	22
2.5.1 Astma in VEGFA	24

3	MATERIAL IN METODE	26
3.1	PREISKOVANCI	26
3.1.1	Povezava SNP-ja rs4795405, ki se nahaja navzgor od <i>ORMDL3</i> v <i>RP11-387H17.4</i> , z astmo pri odraslih in KOPB	26
3.1.2	Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih	26
3.1.3	Povezava SNP-jev v genu <i>VEGFA</i> z odzivom otrok na zdravljenje astme	27
3.2	IZOLACIJA DNA	28
3.3	OBLIKOVANJE TESTOV ZA GENOTIPIZACIJO SNP-JEV	28
3.4	GENOTIPIZACIJA Z ALELNO DIKRIMINACIJO	29
3.5	HARDY-WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE	29
3.6	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	30
3.7	VELIKOST VZORCA	31
3.8	GENETSKI MODEL	31
3.9	BIOINFORMACIJSKA ANALIZA	31
4	REZULTATI	33
4.1	POVEZAVA SNP-JA rs4795405, KI SE NAHAJA NAVZGOR OD <i>ORMDL3</i> V <i>RP11-387H17.4</i> , Z ASTMO PRI ODRASLIH IN KOPB	34
4.1.1	Preiskovanci	34
4.1.2	Asociacijska analiza	35
4.2	POVEZAVA SNP-JEV LOKUSA 17q12–17q21.1 Z ASTMO PRI ODRASLIH	38
4.2.1	Preiskovanci	38
4.2.2	Asociacijska analiza	38
4.2.2.1	Povezava posameznih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih	40
4.2.2.2	Povezava posameznih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 s fenotipi astme pri odraslih	42
4.2.2.3	Povezava haplotipov lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih	43
4.2.2.4	Velikost vzorca in statistična moč	46
4.3	POVEZAVA SNP-JEV V GENU <i>VEGFA</i> Z ODZIVOM OTROK NA ZDRAVLJENJE ASTME	47
4.3.1	Preiskovanci	47
4.3.2	Asociacijska analiza	49
4.4	<i>IN SILICO</i> ANALIZA SNP-JEV POVEZANIH Z ASTMO TER NJIHOVE MOLEKULARNE OKOLICE	52
5	RAZPRAVA	62

5.1	POVEZAVA SNP-JA rs4795405, KI SE NAHAJA NAVZGOR OD <i>ORMDL3</i> V <i>RP11-387H17.4</i> , Z ASTMO PRI ODRASLIH IN KOPB	62
5.1.1	SNP rs4795405 in astma pri odraslih, s ali brez pridruženega rinitisa	62
5.1.2	SNP rs4795405 in KOPB	65
5.1.3	Vloga SNP-ja rs4795405	66
5.2	POVEZAVA SNP-JEV LOKUSA 17q12–17q21.1 Z ASTMO PRI ODRASLIH	67
5.2.1	Povezava posameznih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih	68
5.2.2	Povezava haplotipov lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih	72
5.3	POVEZAVA SNP-JEV V GENU <i>VEGFA</i> Z ODZIVOM OTROK NA ZDRAVLJENJE ASTME	75
5.4	ZAKLJUČNA RAZPRAVA	79
6	SKLEPI	81
7	POVZETEK (SUMMARY)	82
7.1	POVZETEK	82
7.2	SUMMARY	83
8	VIRI	85
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Pregled najpomembnejših genov, ki so bili povezani z astmo s proučevanjem kandidatnih genov.	9
Pregl. 2:	Geni in kromosomski lokusi povezani z astmo odkriti z analizo genske povezanosti ali pozicijskega kloniranja.	11
Pregl. 3:	Pregled najpomembnejših genov, ki so bili povezani z astmo v asociacijskih študijah celotnega genoma.	12
Pregl. 4:	Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo in fenotipi astme.	15
Pregl. 5:	Značilnosti preiskovanih skupin bolnikov in zdravih kontrol.	35
Pregl. 6:	Genotipi in aleli SNP-ja rs4795405 pri bolnikih z astmo (s pridruženim rinitisom in brez pridruženega rinitisa), bolnikov, ki imajo izključno rinitis, bolnikov s KOPB in zdravih kontrolah.	37
Pregl. 7:	Klinične značilnosti bolnikov z astmo.	38
Pregl. 8:	Zamenjava prvotno izbranih SNP-jev in prikaz vrednosti r^2 in D' .	39
Pregl. 9:	Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo.	41
Pregl. 10:	Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo v otroštvu.	42
Pregl. 11:	Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 s kajenjem pri bolnikih z astmo.	42
Pregl. 12:	Povezava haplotipov (rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246, rs4795405) lokusa 17q12–17q21.1 z astmo.	44
Pregl. 13:	Povezava haplotipov (rs9916279, rs8066582, rs1042658, rs2302777) lokusa 17q12–17q21.1 z astmo.	46
Pregl. 14:	Klinične značilnosti bolnikov z astmo.	48
Pregl. 15:	Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1 po šestih in 12 mesecih zdravljenja glede na genotipe SNP-jev v genu <i>VEGFA</i> .	51
Pregl. 16:	Urejenost astme po 12 mesecih zdravljenja glede na genotipe SNP-jev v genu <i>VEGFA</i> .	51

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Kromosomski lokus 17q12–17q21.1 je bil povezan z astmo z analizo genske povezanosti (Dizier in sod., 2000: 1816) (A), z asociacijsko študijo celotnega genoma (Moffatt in sod., 2007: 471) (B) in s sekvencioniranjem celotnega genoma (Campbell in sod., 2014: 3) (C).	17
Sl. 2:	Kromosomski lokus 17q12–17q21.1 s prikazanimi transkripti genov, histonskimi značkami H3K27ac, preobčutljivostnimi mesti za DN-aze ter ohranjenostjo zaporedja DNA.	19
Sl. 3:	Grafični prikaz rezultatov.	34
Sl. 4:	Bloki haplotipov, ki jih sestavljajo analizirani SNP-ji in prikaz vezavnega neravnotežja z vrednostmi r^2 . Vezavno neravnotežje pada z bledenjem sive barve.	43
Sl. 5:	Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1 po šestih in 12-ih mesecih zdravljenja z inhalacijskim kortikosteroidom (A), antagonistom receptorjev za levkotriene – redno (B) in antagonistom receptorjev za levkotriene - po potrebi (C) glede na genotipe v SNP-ju rs2146323 v genu <i>VEGFA</i> .	50

KRATICE IN OKRAJŠAVE

ACOS	sindrom prekrivanja astme in KOPB (ang.: asthma copd overlap syndrome, ACOS)
ACT	ACT-test urejenosti astme (ang.: asthma control test)
BAL	bronhoalveolarni izpirek (ang.: broncho-alveolar lavage)
bp	bazni par
CI	interval zaupanja (ang.: confidence interval)
CRHR1	receptor 1 za sproščanje hormona kortikotropina (ang.: corticotropin releasing hormone receptor 1)
CSF2	spodbujevalni dejavnik rasti granulocitnih in makrofagnih kolonij 2 (ang.: colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage))
CSF3	spodbujevalni dejavnik rasti (granulocitnih) kolonij 3 (ang.: colony stimulating factor 3 (granulocyte))
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang.: deoxyribonucleic acid)
EM-algoritem	algoritem največjega pričakovanja (ang.: expectation maximization algorithm)
ER	endoplazemski retikulum
eQTL	SNP povezan z izražanjem določenega gena (ang.: expression quantitative loci)
FeNO	izdihani dušikov oksid (ang.: fractional exhaled nitric oxide)
FEV1	prisiljena izdihana prostornina zraka v 1 sekundi izdiha (ang.: forced expiratory volume in 1 second)
FVC	prisiljena vitalna kapaciteta (ang.: forced vital capacity)
GATA-3	GATA vezavni protein 3 (ang.: GATA-binding factor 3)
GSDMB	gasdermin B
GWAS	asociacijska študija celotnega genoma (ang.: genome-wide association study)
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnotežje (ang.: Hardy-Weinberg equilibrium)
IgE	imunoglobulin razreda E
IK	inhalacijski kortikosteroid (ang.: inhaled corticosteroid, ICS)
IL	interlevkin
IQR	interkvartilni razmik (ang.: interquartile range)
KOPB	kronična obstruktivna pljučna bolezen (ang.: chronic obstructive pulmonary disease, COPD)
LD	vezavno neravnotežje (ang.: linkage disequilibrium)
lincRNA	intergenska dolga nekodirajoča RNA (ang.: long intergenic noncoding RNA)
LTRA	antagonist receptorjev za levkotriene (ang.: leukotriene receptor antagonist)
MAF	frekvenca redkejšega alela (ang.: minor allele frequency)
miRNA	mikro RNA (ang.: microRNA)

MED24	štiriindvajseta podenota posrednika transkripcije (ang.: mediator complex subunit 24)
NF1	jedrni dejavnik 1 (ang.: nuclear factor 1)
OR	razmerje obojnih (ang.: odds ratio)
ORMDL3	ORMDL-regulator biosinteze sfingolipidov 3 (ang.: ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3)
POL2	RNA-polimerza II
PSMD3	ne-ATP-azna podenota 3 proteasoma 26S (ang.: proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3)
RORA	retinoidu sorodni receptor alfa (ang.: retinoid-related orphan receptor alpha)
scRNA	majhna citoplazemska RNA (ang.: small cytoplasmic RNA)
snoRNA	majhna jedra RNA (ang.: small nuclear RNA)
SERCA	sarkoendoplazemska črpalka Ca^{2+} (ang.: sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (ang.: single nucleotide polymorphism)
TF	transkripcijski dejavnik (ang.: transcription factor)
Th17	diferencirane celice pomagalk tipa 17 (ang.: T helper 17 cells)
Th2	diferencirane celice pomagalk tipa 2 (ang.: T helper 2 cells)
TI	indeks Tiffaneu
TLR4	Toll-u podobni receptorji 4 (ang.: Toll like receptor 4)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa (ang.: tumor necrosis factor alpha)
TSLP	stromalni limfopoetin priželjca (ang.: thymic stromal lymphopoietin)
VC	vitalna kapaciteta pljuč (ang.: vital capacity)
VEGFA	žilni endotelijski rastni dejavnik A (ang.: vascular endothelial growth factor A)
ZPBP2	protein 2, ki se veže na steklasto ovojnico jajčnikovega folikla (ang.: zona pellucida binding protein 2)

1 UVOD

Astma je heterogena in kompleksna bolezen dihal, za katero je značilno kronično vnetje in preodzivnost dihalnih poti. Glavni simptomi so piskanje v pljučih, kašelj in epizode dušenja. Spada med najpogostejše kronične bolezni, saj naj bi bilo za astmo obolelih več kot 300 milijonov ljudi. V zadnjih desetletjih je prevalenca astme strmo narastla, kar pripisujemo predvsem spremenjenim dejavnikom okolja, zahodnemu načinu življenja in urbanizaciji. Vzrok za hiter porast astme naj bi bila povečana atopijska senzibilizacija, saj je podoben porast opazen tudi pri alergijskih boleznih, kot sta rinitis in ekcem. Ocenjena prevalenca astme se med populacijami razlikuje. Najvišjo prevalenco astme beležijo v Avstraliji, kjer je bila ocenjena na 21 %, v Evropi je bila najvišja prevalenca ocenjena na Švedskem, kjer je 20 % in v Angliji, kjer je 18 %. V Avstriji je bistveno nižja in znaša 7 %, podobna je tudi v Italiji, kjer je 6 % (To in sod., 2012). V Sloveniji je bila prevalenca astme po eni izmed raziskav med odraslimi ocenjena na 16 % (Šuškovič in sod., 2011), drugi podatki kažejo, da je prevalenca v Sloveniji 9 % (To in sod., 2012), zato predstavlja velik zdravstveni problem. Velike razlike v prevalenci astme so lahko posledica različnih dejavnikov okolja in različne nagnjenosti posameznikov oziroma populacij k razvoju te bolezni zaradi različnih genetskih ozadij. Z raziskavami enojajčnih in dvojajčnih dvojčkov v enakem in različnem okolju so dokazali, da okolje sicer doprinese k razvoju astme, vendar je v večji meri, približno 62 %, nagnjenost odvisna od genetskih dejavnikov (Thomsen in sod., 2010). Kljub relativno visoki heritabilnosti in velikemu številu raziskav genetskega ozadja astme, klinično pomembni geni, ki bi v veliki meri doprinesli k razvoju astme ali genski polimorfizmi na podlagi katerih bi z visoko verjetnostjo napovedali razvoj astme še vedno niso znani. Astma je namreč kompleksna bolezen na katero naj bi vplivalo večje število genov z relativno majhnimi, a vendar statistično značilnimi doprinosi. Eden izmed najbolj znanih kandidatnih kromosomskih lokusov, ki je bil z astmo povezan pri proučevanju številnih populacij je lokus 17q12–17q21.1 (Bouzigon in sod., 2008; Kavalarić in sod., 2012; Moffatt in sod., 2007). Omenjeni lokus je bil večinoma povezan z astmo pri otrocih (Kavalarić in sod., 2012; Moffatt in sod., 2007), medtem ko njegova povezava z astmo pri odraslih ni jasna (Halapi in sod., 2010; Karunas in sod., 2011). Da bi se bolezen lahko razvila, naj bi bil potreben seštevek številnih rizičnih variant v kombinaciji z okoljskim sprožilcem (Meyers, 2010). Poleg tega vedno bolj postaja jasno, da astma ni enotna bolezen, saj obstaja več endotipov astme, ki predstavljajo skupek fenotipov. Fenotipi so torej podskupine endotipov in so odsev genetske strukture posameznika in vplivov okolja. Slednjemu pripisujejo tudi relativno neuspešnost genetskih raziskav pri odkrivanju vzročnih genov oziroma genetskih različic, ki vplivajo na razvoj astme (Lötvall in sod., 2011). Predvsem na genetskem področju se astma največkrat še vedno obravnava kot enotna bolezen. V nekaterih raziskavah so proučevali standardne fenotipe astme, kot so atopijska in ne-atopijska astma, opredelitev astme glede na to kdaj se pojavi, bodisi v otroštvu ali šele v odrasli dobi, prisotnost ali odsotnost rinitisa, in druge fenotipe, kar pomembno doprinese k rezultatom raziskav. Ravno proučevanje genetskih označevalcev povezanih

z astmo je pomembno doprineslo k razumevanju obstoja več različnih fenotipov astme (Henderson, 2014). V naši pretekli raziskavi smo odkrili, da je eden izmed genetskih označevalcev, ki se nahaja na lokusu 17q12–17q21.1, rs4795405, povezan predvsem z astmo pri otrocih, katere ne spremlja rinitis, ki je sicer bolezen, ki je pogosto pridružena astmi (Kavalarič in sod., 2012). Za to obliko astme naj bi bila značilna manj reverzibilna obstrukcija dihalnih poti (Jang in sod., 2010), ki je ena izmed glavnih značilnosti kronične obstruktivne pljučne bolezni (KOPB), pri kateri je genetsko ozadje slabo raziskano. Čeprav sta astma in KOPB večinoma obravnavani kot dve različni bolezni se je izkazalo, da imajo mnogi bolniki simptome obeh bolezni, kar imenujemo sindrom prekrivanja astme in KOPB (ACOS) (Gibson in McDonald, 2015), kar nakazuje na deljeno genetsko ozadje teh dveh bolezni.

Za zdravljenje astme se večinoma uporabljajo trije tipi zdravljenj, in sicer agonisti beta adrenergičnih receptorjev v obliki inhalacije (albuterol, salmeterol), kortikosteroidi v obliki inhalacije ali sistemskega zdravljenja (flutikazon propionat, beklometazon, prednizon) ter inhibitorji ali antagonist receptorjev cisteinil levkotrienske poti (montelukast, pranlukast). Tudi odziv na zdravljenje astme je izjemno raznolik, kar je lahko povezano z različnimi vzroki, kot so teža bolezni, endotip bolezni, spremljajoče bolezni in interakcije med zdravili. Hkrati se lahko bolniki zelo dobro odzivajo na eno vrsto zdravil, na drugo pa je odziv zelo slab. Kljub vsem opisanim dejavnikom, naj bi bilo približno 70 % variabilnosti pri odzivu na zdravljenje genetsko pogojene (Drazen in sod., 2000; Szalai in sod., 2008). Z raziskavami farmakogenetike astme so odkrili nekaj genov, ki doprinesejo k raznolikosti v odzivu na zdravljenje, na primer *ALOX5*, *TBX21* in *VEGFA* (Lima in sod., 2009; Lopert in sod., 2013; Sharma in sod., 2009). Farmakogenetske raziskave astme omogočajo vpogled v možne tarče terapij, različne fenotipe astme in tudi odkrivajo proteine, ki bi lahko bili ustrezne tarče za zdravljenje astme. V prvi vrsti pa z njimi želimo odkriti označevalce na podlagi katerih bi lahko napovedali odziv posameznika na zdravljenje.

1.1 NAMEN IN CILJ RAZISKAVE

Namen naše raziskave je bil ovrednotiti povezavo polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP) kromosomskega lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Želeli smo ovrednotiti tudi povezavo SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 s posameznimi fenotipi astme, saj se domneva, da imajo različni fenotipi astme različna genetska ozadja. Kot prvi smo želeli ovrednotiti ali je eden izmed SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1, rs4795405, povezan tudi s KOPB.

V prvem delu raziskave smo proučevali povezavo med astmo pri odraslih slovenskih bolnikih in SNP-jem rs4795405, ki se nahaja na kromosomskem lokusu 17q12–17q21.1, navzgor od protein-kodirajočega gena *ORMDL3*, v genu, ki kodira intergensko dolgo nekodirajočo RNA (lincRNA) *RP11-387H17.4*. Polimorfizem rs4795405 je bil za analizo izbran na podlagi prve raziskave GWAS (Moffatt in sod., 2007), kjer se je

izkazal kot eden izmed SNP-jev močnejše povezanih z astmo pri otrocih. V naši raziskavi smo želeli preveriti ali je povezan tudi z astmo pri odraslih ter potrditi povezavo rs4795405 s fenotipom astme brez rinitisa, ki smo jo ugotovili v eni izmed naših raziskav pri otrocih z astmo (Kavalar in sod., 2012). Načrtno smo zbrali primerljivo veliki skupini bolnikov z astmo s pridruženim rinitisom in brez pridruženega rinitisa, saj v splošni populaciji bolnikov z astmo prevladujejo bolniki, ki imajo pridružen rinitis. Ker naj bi bila za astmo brez rinitisa značilna manj reverzibilna obstrukcija, ki je sicer značilna za bolnike s KOPB, smo kot prvi želeli preveriti tudi povezavo rs4795405 s KOPB.

Na podlagi ugotovitev v prvem delu raziskave smo naše proučevanje razširili na večji del lokusa 17q12–17q21.1, pri čemer smo analizirali 13 izbranih SNP-jev na drugi, večji skupini bolnikov in povezavo teh z različnimi fenotipi astme. Z analizo povezave lokusa 17q12–17q21.1 z astmo bi ocenili genetski doprinos tega lokusa k astmi pri odrasli populaciji slovenskih bolnikov. Z analizo povezave SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z različnimi fenotipi astme bi ocenili doprinos teh SNP-jev k heterogenosti astme. Za genotipizacijo smo izbrali SNP-je: rs12936231, ki se nahaja v genu *ZPBP2*, rs2305480 in rs7216389, ki se nahajata v genu *GSDMB*, rs3744246 ter rs4795405, ki se nahajata navzgor od gena *ORMDL3* v genu *RP11-387H17.4*, rs8079416, ki se nahaja navzgor od gena *LRRC3C* v genu *RP11-387H17.4*, rs3893044, ki se nahaja navzdol od gena *LRRC3C*, rs7219080 in rs8069202, ki se nahajata v genu *GSDMA*, rs8066582 in rs9916279, ki se nahajata v genu *PSMD3*, rs1042658, ki se nahaja v genu *CSF3* in rs2302777, ki se nahaja v genu *MED24*.

V tretjem, farmakogenetskem delu raziskave, smo želeli potrditi povezavo SNP-jev v genu *VEGFA* z odzivom otrok na zdravljenje astme z inhalacijskimi kortikosteroidi (IK) in ovrednotiti povezavo SNP-jev v genu *VEGFA* z odzivom na zdravljenje z antagonisti receptorjev za levkotriene (LTRA). S tem bi pokazali, da je *VEGFA* lahko farmakogenetski označevalec za napovedovanje odziva na zdravljenje astme, kar bi predstavljalo pomembno izhodišče za nadaljnjo analizo tega gena tako pri zdravljenju astme kot njegovo vlogo pri patogenezi astme. Za farmakogenetski del smo izbrali SNP-ja v genu *VEGFA* na podlagi raziskave (Sharma in sod., 2009), v kateri so pokazali, da je rs2146323 izmed več analiziranih SNP-jev gena *VEGFA* povezan z odzivom na zdravljenje astme z IK. Poleg tega smo v analizo vključili še rs833058, ki je bil v isti raziskavi povezan z bronhialno preodzivnostjo. Znano je, da je *VEGFA* ena izmed posrednih tarč različnih terapij, ki se uporabljajo za zdravljenje astme (Asai in sod., 2003; Kanazawa in sod., 2007) in je zato zanimiv kandidatni gen za farmakogenetske analize astme. Ker je za genetske asociacijske raziskave značilno, da za večjo moč potrebujejo več ponovitvenih raziskav na različnih vzorcih, smo želeli odkritje farmakogenetske povezave iz leta 2009 preveriti še na vzorcu slovenskih otrok z astmo.

1.2 HIPOTEZE

Glede na zastavljeno problematiko ter izsledke predhodnih raziskav, smo predpostavili sledeče hipoteze:

Hipoteza 1: Polimorfizem rs4795405, ki se nahaja navzgor od gena *ORMDL3* v genu *RP11-387H17.4*, je povezan z astmo in kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB) pri odraslih.

Cilj 1.1: Določiti povezavo med rs4795405 in astmo pri odraslih.

Cilj 1.2: Določiti povezavo med rs4795405 in fenotipom astme brez rinitisa.

Cilj 1.3: Določiti povezavo med rs4795405 in KOPB.

Hipoteza 2: Lokus 17q12–17q21.1 je povezan z astmo pri odraslih.

Cilj 2.1: Določiti povezavo med posameznimi SNP-ji rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246, rs4795405, rs8079416, rs3893044, rs7219080, rs8069202, rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777, ki se nahajajo v območju genov *ZBPB2*, *GSDMB*, *ORMDL3*, *RP11-387H17.4*, *LRRC3C*, *GSDMA*, *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, in astmo pri odraslih.

Cilj 2.2: Določiti povezavo med posameznimi SNP-ji in različnimi fenotipi astme (atopija, pljučno delovanje, obdobje v katerem se astma pojavi, vpliv kajenja).

Cilj 2.3: Določiti povezavo med haplotipi in astmo.

Hipoteza 3: Izbrana SNP-ja v genu *VEGFA* sta farmakogenetska označevalca pri astmi.

Cilj 3.1: Določiti povezavo med rs2146323 in rs833058 ter odgovorom na zdravljenje otrok z astmo, ki so zdravljeni z inhalacijskimi kortikosteroidi ali z antagonisti receptorjev za levkotriene.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOLOGIJA ASTME

Astma je kronična bolezen, za katero je značilno vnetje in preodzivnost dihalnih poti na hladen zrak, telesno vadbo, največkrat pa na alergene iz okolja, kot so hišne pršice, živalska dlaka, pelodi in spore gliv (Lambrecht in Hammad, 2012). Prekomeren odgovor imunskega sistema pri astmi je lahko posledica nepravilnega delovanja epitelijske prepreke. Epitelij je namreč prva obramba pred dejavniki okolja. Strukturno predstavlja fizično prepreko in hkrati izloča protimikrobne učinkovine, ki poleg neposredne obrambe aktivirajo tudi lastne imunske celice. Za prepoznavanje inhalacijskih alergenov so ključnega pomena Toll-u podobni receptorji 4 (TLR4), ki se nahajajo na površini epitelijskih celic (Lambrecht in Hammad, 2012). Pri odzivu na dejavnike okolja, kot so različni antigeni, dihalne epitelijske celice preko receptorjev TLR4 aktivirajo mnoge imunske celice, da izločajo citokine in kemokine, kot so interleukini (IL). Med najpomembnejše sodijo IL-6, IL-8, IL-25, IL-33, stromalni limfopoetin priželjca (TSLP), eotaksini in spodbujevalni dejavnik rasti granulocitnih in makrofagnih kolonij 2 (CSF2). TSLP povzroči vdor dendritičnih celic, ki predstavijo antigene celicam T in spominskim celicam T (Bartemes in Kita, 2012). IL-25 in IL-33 sprožita nastajanje IL-13 in IL-5 v prirojenih limfoidnih celicah, katerih zorenje uravnava transkripcijska dejavnika GATA vezavni protein 3 (GATA-3) in retinoidu sorodni receptor alfa (RORA) (Walker in McKenzie, 2013). Izločanje različnih citokinov sproži aktivacijo dendritičnih celic, bazofilcev, mastocitov, eozinofilcev, diferenciranih celic pomagalk tipa 2 (Th2) in celic ubijalk, kar povzroči preoblikovanje dihalnih poti, fibrozo in deljenje gladkih mišičnih celic. Epitelijski citokini kot so IL-25, IL-33, TSLP ter produkti imunskega odziva Th2 v pozitivni zanki spodbujajo nastajanje mukusa in matriksnih proteinov. IL-25 in IL-33 spodbujata izločanje proteina imenovanega žilni endotelijski rastni dejavnik A (VEGFA) iz mastocitov in žilnih endotelijskih celic, kateri spodbuja angiogenezo, otekanje oziroma edeme, vnetje tipa Th2, sub-epitelijsko fibrozo in aktivacijo dendritičnih celic. To vodi v preodzivnost dihal in okrepi preobčutljivost na dihalne antigene (Bartemes in Kita, 2012; Lee C.G. in sod., 2004). Epitelijske celice torej s proizvajanjem citokinov neposredno vplivajo na integriteto epitelijske in hkrati posredno z aktivacijo imunskih celic sprožijo vnetje tipa Th2. V stene dihalnih poti se infiltrirajo mastociti, eozinofilci in CD4+ T-celice (celice Th2), celo pri bolnikih z ne-atopijsko obliko astme. Pri nekaterih bolnikih prihaja do infiltracije nevtrofilcev, kar verjetno uravnava podvrsta celic T-pomagalk, za katere je značilno izločanje citokina IL-17A (Th17) (Bartemes in Kita, 2012).

Druga hipoteza, ki pojasnjuje dogajanje v dihalih bolnikov z astmo predvideva, da je preodzivnost dihalnih poti posledica nenormalnega stanja kalcija (Ca^{2+}) v celicah dihalnih gladkih mišic. Kalcij je namreč ključen pri krčenju in sprostitvi dihalnih gladkih mišic. Na celičnih kulturah podgan s preodzivnostjo dihal so izmerili povišane stopnje Ca^{2+} (Tao in sod., 1999). Hkrati mnogi znani sprožilci astme, kot so levkotrieni,

ozon, dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) in aktivacija vnetnih celic izzovejo preodzivnost tudi z njegovo mobilizacijo. Meritev Ca^{2+} v celicah je zahtevna, saj ločimo globlji citosolni Ca^{2+} in citosolni sub-plazmalemski Ca^{2+} . Prvi je pomemben pri krčenju gladkih mišic, drugi uravnava membransko napetost. Bolniki z astmo naj bi imeli višje stopnje globljega citosolnega Ca^{2+} in tako večjo odzivnost na sprožilce, kot so citokini in vnetni posredniki (Parameswaran in sod., 2002). Povišane stopnje Ca^{2+} v citosolu se uravnavajo s privzemanjem Ca^{2+} v sarkoplazemski retikulum s sarkoendoplazemsko črpalko Ca^{2+} (SERCA). Dokazano je bilo, da je izražanje SERC-e v dihalnih gladkih mišicah bolnikov z astmo zmanjšano, posledično pa je zmanjšan tudi privzem Ca^{2+} (Mahn in sod., 2009).

Pri klinični manifestaciji astme so torej pomembne tako epiteljske celice, ki so prva obramba pri dejavnikih okolja in omogočajo pričetek vnetja ter proizvajajo sluz oziroma mukus kot tudi dihalne gladke mišične celice, ki s krčenjem prispevajo k obstrukciji oziroma zoženju dihalnih poti, kar vodi k oteženemu dihanju.

2.2 RAZDELITEV ASTME

Astma ni enotna bolezen, zato v zadnjih letih poskušajo določiti oziroma definirati podskupine, fenotipi in endotipi astme. Fenotipi astme so atopijska in ne-atopijska astma, opredelitev astme glede na to kdaj se pojavi, bodisi v otroštvu ali šele v odrasli dobi, teža obstrukcije, sopojava rinitisa in drugo (Lötvall in sod., 2011). Ker endotipi astme še niso enotno določeni, astmo največkrat delimo fenotipsko na atopijsko in ne-atopijsko. Atopijsko oziroma alergijsko astmo običajno definiramo na podlagi pozitivnih kožnih testov ali na podlagi prisotnosti specifičnih protiteles IgE v serumu bolnikov. Največkrat se ta tip astme pojavi že v otroštvu. Za te bolnike je značilna preobčutljivost na inhalacijske alergene. Pri njih prihaja do vnetnega odziva tipa Th2 (Pearce in sod., 1999). Druga najpogostejša delitev astme je glede na obdobje, ko se astma pojavi, v otroštvu ali odrasli dobi. Mnogokrat so za astmo s pričetkom v odrasli dobi značilna ponavljajoča se težka poslabšanja. Atopija je pri teh bolnikih redkejša, pljučno delovanje je največkrat slabše kot pri bolnikih z atopijsko astmo, pogosto je prisotna eozinofilija (de Nijs in sod., 2013).

Astmo pogosto spremljajo pridružene bolezni, kot je rinitis. Rinitis je bolezen zgornjih dihalnih poti in se običajno pojavi pred ali z razvojem astme. Ocenjujejo, da je prisoten pri 78 % bolnikov (Corren, 2013). Ena od hipotez predpostavlja, da sta rinitis in astma ena bolezen, saj gre za patologijo v skupni dihalni poti, a kljub temu obstaja nekaj razlik med astmo z in brez spremljajočega rinitisa. Bolniki z astmo brez rinitisa imajo običajno višjo stopnjo obstrukcije dihalnih poti, slabše pljučno delovanje, manj bronhialnih eozinofilcev ter težjo obliko astme (Dixon in sod., 2008; Jang in sod., 2010; Navarro in sod., 2008). Astmo lahko delimo tudi na podlagi krvnih parametrov. Krvna eozinofilija je značilna za težke astme s pojavom v odrasli dobi. Izdihani dušikov oksid (FeNO) je označevalec, s katerim lahko dobro ocenimo bronhialno in krvno eozinofilijo

(Corren, 2013). Pri astmi opredeljujemo še bronhialno preodzivnost na podlagi metaholinskega testa in delovanje pljuč z merjenjem različnih parametrov pljučnega delovanja, kot so prisiljena izdihana prostornina zraka v 1 sekundi izdiha (FEV1), % predvidene normalne vrednosti FEV1; prilagojen za spol, starost in telesne parametre, vitalna kapaciteta pljuč (VC), % predvidene normalne vrednosti VC; prilagojen za spol, starost in telesne parametre ter razmerje FEV1/FVC, kar imenujemo indeks Tiffaneu (TI), pri čemer je FVC prisiljena vitalna kapaciteta.

Genetske raziskave astme so doprinesle k razumevanju obstoja različnih fenotipov astme in razkrile pomen vključevanja fenotipov v genetske raziskave. Določeni geni so bili povezani samo z določeno obliko astme, kar nakazuje, da imajo različne oblike astme lahko različno genetsko ozadje. To nakazuje, da različnim fenotipom astme verjetno botrujejo različne biološke poti. Primer je gen *MMP9*, ki je bil povezan izključno z ne-atopijsko obliko astme pri otrocih (Pinto in sod., 2010).

2.3 GENETIKA ASTME

Astma je bolezen za katero je značilna družinska obremenjenost. Heritabilnost, ki predstavlja razmerje med doprinosom dednosti in skupnimi doprinosi okolja in dednosti, je bila z nedavnimi raziskavami ocenjena na približno 62 % (Thomsen in sod., 2010), kar predstavlja visoko vrednost glede na naše poznavanje genetike astme. Kajti, kljub mnogim raziskavam genetskega ozadja astme še nismo odkrili ključnih, klinično pomembnih genov, s katerimi bi z visoko gotovostjo napovedali njen razvoj. Glavni razlog naj bi bila velika heterogenost astme (Lötvall in sod., 2011). Eden od razlogov je tudi kompleksnost bolezni, saj naj bi k razvoju astme prispevali številni geni z majhnimi učinki. Po podatkih baze DisGenNET (DisGenNET ..., 2015) je bilo do decembra 2015 objavljenih 5185 raziskav, v katerih so proučevali povezavo različnih genov z astmo. Mnogo manj povezav genov z astmo je bilo uspešno ponovljenih v neodvisnih populacijah in redkim genetskim variantam je mogoče pripisati funkcionalno vlogo pri astmi (Barnes, 2011). A vendar odkrite povezave genov z astmo kažejo na možno vlogo teh genov pri razvoju astme in vodijo k boljšemu razumevanju bolezenskega ozadja astme in hkrati odkrivanju novih tarčnih bioloških poti za zdravljenje astme.

2.3.1 Polimorfizmi posameznih nukleotidov in haplotipi

Dva naključno izbrana človeška genoma imata 99,9 % identičnega zaporedja deoksiribonukleinske kisline (DNA). Preostali 0,1 % predstavljajo variacije. Najpogostejše variacije so SNP-ji, ki se pojavljajo približno na 1000 baznih parov (bp) zaporedja DNA. Zanje je značilna več kot ena nukleotidna baza, kar pomeni da se pri nekaterih posameznikih pojavlja alternativna oblika nukleotidne baze na določenem genetskem lokusu, tako imenovan alel. Primer je zamenjava citozina s timinom. Tako so na tem mestu možni genotipi CC, CT in TT. SNP-ji so relativno pogosti, stabilni in ne mutirajo pogosto, kar je ena izmed glavnih značilnosti mikrosatelitnih označevalcev.

Razporejeni so po celotnem genomu, tako v promotorjih, kodirajočem zaporedju, intronih, kot ne-kodirajočem delu genoma. Polimorfizmi posameznih nukleotiov so povezani z raznolikostjo populacij, ljudi, nagnjenostjo k določenim boleznim, odzivom na zdravljenje in drugimi lastnostmi. Polimorfizmi lahko spremenijo regulatorne motive za vezavo transkripcijskih dejavnikov (TF-jev), s čimer vplivajo na aktivnost promotorjev, prepisovanje genov, vplivajo lahko na razporejanje nukleosoma, stabilnost transkriptov, zaporedje DNA, ki vpliva na aminokislinsko sestavo proteina, povzročijo lahko nastanek stop kodona in drugo (Shastri, 2002), s čimer doprinesejo k spremenjenemu delovanju bioloških poti.

Ker SNP-ji predstavljajo glavni doprinos k raznolikosti med ljudmi in populacijami jih mnogokrat uporabljamo pri raziskovanju genetske nagnjenosti k pogostim, kompleksnim boleznim, kot so astma, sladkorna bolezen, kronične črevesne bolezni in druge. Z genetskimi asociacijskimi študijami primerjamo porazdelitev genotipov SNP-jev bodisi med bolniki in zdravimi kontrolami bodisi med različnimi oblikami bolezni. Odkrita povezava določenega SNP-ja z boleznijo je lahko posledica proučevanega SNP-ja ali pa vzrok za povezavo med SNP-jem in boleznijo ni proučevan SNP, temveč SNP, ki je z njim v vezavnem neravnotežju (LD). Polimorfizmi, ki se nahajajo v relativni bližini se namreč lahko dedujejo skupaj, kar imenujemo LD, zato je proučevan alel SNP-ja lahko povezan z boleznijo kot posledica skupnega dedovanja z dejansko vzročnim. V splošnem velja, da so bližnji SNP-ji v močnejšem LD-ju, kot daljni, vendar fizična razdalja ni merilo, saj lahko med dvema SNP-jema, ki ju ločuje le 20 bp, ni LD-ja. Medtem, ko je lahko med dvema SNP-jema ločenima z 200000 bp LD visok (Silverman, 2007).

Alele SNP-jev, ki se dedujejo skupaj imenujemo haplotipi in se v zadnjih letih poleg posameznih SNP-jev mnogokrat uporabljajo za proučevanje povezave z določeno boleznijo, saj se mutacija, ki povzroči neko bolezen pojavi v nekem haplotipnem bloku. Oseba, ki bo prenesla mutacijo na potomce, bo prenesla tudi strukturo haplotipa. Če opazimo povečane pogostnosti neke haplotipne strukture pri več obolelih bi to lahko nakazovalo lokalizacijo vzročnega gena oziroma SNP-ja (Silverman, 2007). Pri monogenih boleznih, kot je cistična fibroza, so haplotipi bolj informativni označevalci v primerjavi s posameznimi SNP-ji. Haplotipi namreč bolj učinkovito predstavljajo vzorce LD genomskega območja. Kadar neko bolezen povzroča več genov, kar je značilno za kompleksne bolezni, bomo vzročne mutacije, kljub haplotipom težje zaznali (Silverman, 2007). Genetske variante, ki sestavljajo haplotip lahko vplivajo na določen fenotip, ko se pojavljajo skupaj. Sočasen pojav dveh genetskih variant, ki obe spremenita zaporedje aminokislin in posledično vplivata na delovanje proteina, lahko bistveno drugače vpliva na protein kot pojav le ene izmed njih. Proučevanje haplotipov nam omogoča identifikacijo teh na podlagi kombinacije bližnjih SNP-jev. Primer je gen *ADRB2*. Odziv na zdravljenje ni bil povezan s posameznimi SNP-ji tega gena v nasprotju s haplotipi. Razlog naj bi bil v cis-efektihi znotraj haplotipov (Drysedale in sod., 2000).

2.3.2 pristopi h genetski analizi astme

2.3.2.1 Analiza kandidatnih genov

V večini genetskih raziskav astme v zadnjem desetletju so proučevali SNP-je v genih, ki so udeleženi v bioloških poteh, ki vplivajo na patofiziologijo astme ali pa so bili izbrani na podlagi izsledkov predhodnih raziskav, kjer so proučevali večje dele genoma. Ta način izbora genov za raziskave imenujemo analiza kandidatnih genov. To vrsto raziskav največkrat uporabljamo zaradi enostavnosti koncepta, v primeru proučevanja majhnega števila preiskovancev, omejenih sredstev in za izvedbo ponovitvenih genetskih raziskav (Ober in Yao, 2011). Pri astmi so bili v največji meri proučevani biološko pomembni geni, ki kodirajo citokine, proteine udeležene pri signaliziranju celic T, proteine epidermalne prepreke, proteine udeležene v pljučno delovanje in druge. Med najbolj proučevane sodijo geni vpleteni v odziv Th2, kot so *IL4*, *IL4RA*, *STAT6*, *GATA3*, *IL13*, *IFNG* in drugi (Preglednica 1). Večina ponovitvenih raziskav ni pokazala ponovljivih povezav med geni, SNP-ji in astmo, kar predstavlja največjo oviro pri proučevanju genetike astme. Kljub temu najdene povezave med SNP-ji določenih genov in astmo nakazujejo na vlogo teh genov v patobiologiji astme, kar pripomore k izhodišču za proučevanje proteinov, ki jih ti geni kodirajo in k odkrivanju novih tarč, ki bi jih lahko uporabili za zdravljenje te kompleksne bolezni.

Preglednica 1: Pregled najpomembnejših genov, ki so bili povezani z astmo s proučevanjem kandidatnih genov.

Table 1: Summary of genes that were found to be associated with asthma with candidate gene analysis approach.

Gen	Lokus	Biološka vloga	Vir
<i>GSTM1</i>	1p13.3	Zmanjšanje oksidativnega stresa	March in sod., 2013
<i>FLG</i>	1q21.3	Integriteta in delovanje epiteljske prepreke	March in sod., 2013
<i>IL10</i>	1q31–q32	Citokin, imunski odziv	March in sod., 2013
<i>CTLA4</i>	2q33	Zaviranje odziva celic T	March in sod., 2013
<i>COL29A1</i>	3q21.3	Tvorba kolagena	Holloway in sod., 2010
<i>TLR2</i>	4q32	Receptor za prepoznavo patogenov	Holloway in sod., 2010
<i>IL13</i>	5q31	Odziv Th2	March in sod., 2013
<i>IL4</i>	5q31.1	Diferenciacija celic Th2	March in sod., 2013
<i>CD14</i>	5q31.1	Prepoznavanje mikrobov	March in sod., 2013
<i>IL5</i>	5q31.1	Odziv Th2	Ober in Hoffjan, 2006
<i>CD14</i>	5q31.3	Imunski odziv na lipopolisaharide	Holloway in sod., 2010
<i>ADRB2</i>	5q31–q32	Sproščanje gladkih mišic	March in sod., 2013
<i>SPINK5</i>	5q32	Inhibitor epitelne proteaze	March in sod., 2013
<i>HAVCR1</i>	5q33.2	Odziv celic T	March in sod., 2013
<i>LTC4S</i>	5q35	Posrednik vnetja	March in sod., 2013

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1. Pregled najpomembnejših genov, ki so bili povezani z astmo s proučevanjem kandidatnih genov.

Gen	Lokus	Biološka vloga	Vir
<i>HLA-DRB1</i>	6p21	MHC II, predstavljanje antigenov	March in sod., 2013
<i>HLA-DQB1</i>	6p21	MHC II, predstavljanje antigenov	March in sod., 2013
<i>HLA-DPB1</i>	6p21	MHC II, predstavljanje antigenov	March in sod., 2013
<i>LTA</i>	6p21.3	Posrednik vnetja	March in sod., 2013
<i>TNF</i>	6p21.3	Posrednik vnetja	March in sod., 2013
<i>VEGFA</i>	6q21.1	Angiogeneza, prepustnost žil, spodbuja proliferacijo in rast endotelijskih celic	Sharma in sod., 2009
<i>GPRA</i>	7p14.3	Izražanje metaloproteaz	March in sod., 2013
<i>CCL26</i>	7q11.23	Kemoatraktant za eozinofilce, bazofilce	Ober in Hoffjan, 2006
<i>NAT2</i>	8p22	Razstrupljanje	March in sod., 2013
<i>TLR4</i>	9q33.1	Receptor za prepoznavo patogenov	Holloway in sod., 2010
<i>CC16</i>	11q12.3–q13.1	Imunoregulacija	March in sod., 2013
<i>FCER1B</i>	11q13	Receptor za IgE	March in sod., 2013
<i>GSTP1</i>	11q13	Zmanjševanje oksidativnega stresa	March in sod., 2013
<i>IL18</i>	11q22.2–q22.3	Vnetje	March in sod., 2013
<i>STAT6</i>	12q13	Signaliziranje IL-4 in IL-13	March in sod., 2013
<i>IRAKM</i>	12q13.13	Uravnavanje signaliziranja TLR	Holloway in sod., 2010
<i>NOS1</i>	12q24.2–q24.31	Celična komunikacija	March in sod., 2013
<i>CMA1</i>	14q11.2	Serinska proteaza	March in sod., 2013
<i>IL4RA</i>	16p12.1	Odziv Th2	Holloway in sod., 2010
<i>IL4R</i>	16p12.1–p12.2	Alfa veriga receptorjev za IL-4 in IL-13	March in sod., 2013
<i>CCL5</i>	17q11.2–q12	Kemoatraktant za celice T, eozinofilce, bazofilce	March in sod., 2013
<i>CCL11</i>	17q21.1–q21.2	Kemoatraktant za eozinofilce	March in sod., 2013
<i>STAT3</i>	17q21.2	Aktivacija kaskade JAK-STAT	Ober in Hoffjan, 2006
<i>ACE</i>	17q23.3	Uravnavanje vnetja	March in sod., 2013
<i>TBXA2R</i>	19p13.3	Agregacija trombocitov	March in sod., 2013
<i>TGFB1</i>	19q13.1	Celična rast, proliferacija, diferenciacija	March in sod., 2013

2.3.2.2 Analiza genske povezanosti

Z raziskavami, kjer so uporabili pristop proučevanja družin z analizo genske povezanosti na celotnem genomu, brez predhodne hipoteze o kandidatnih genih, so odkrili kandidatne lokuse z bistveno boljšo ponovljivostjo kot z analizo genov, ki so bili izbrani na podlagi biološke vloge pri astmi. Med najbolj znane sodi citokinski lokus na kromosomu 5q, ki zajema gene *IL13*, *IL4*, *IL9*, *CD14*, gen *STAT6* na 12q ter nove kandidatne gene kot so *DPP10*, *HLA-G*, *ADAM33* in druge (March in sod., 2013) (Preglednica 2).

Preglednica 2: Geni in kromosomski lokusi povezani z astmo odkriti z analizo genske povezanosti ali pozicijskega kloniranja.

Table 2: Asthma associated genes discovered through linkage and positional cloning studies.

Gen	Lokus	Biološka vloga	Vir
<i>CSF3R, IL12RB2</i> ^a	1p35–p31	Aktivacija granulocitov, odziv Th1	Dizier in sod., 2000
<i>DPP10</i>	2q14	Reže terminalne dipeptide citokinov	Allen in sod., 2003
<i>IL4, IL13, IL9</i>	5q31–q32	Citokinski klaster, odziv Th2	Ober in sod., 2000
<i>FCER1B</i> ^a	11q12–q13	Alergijski odziv	Dizier in sod., 2000
<i>STAT6, IFNG, LTA4H</i> ^a	12q13–q24	Odziv Th2, Th1, metabolizem levkotienov	Dizier in sod., 2000
<i>IRAK3</i>	12q14	Uravnava signalizacijo receptorjev TLR	Balaci in sod., 2007
<i>PHF11</i>	13q14	Aktivacija in viabilnost celic T	Zhang in sod., 2003
<i>STAT5, CCL5, CSF3</i> ^a	17q11–q21	Transkripcijski dejavnik, kemokin za eozinofilce in bazofilce, aktivacija granulocitov	Dizier in sod., 2000
<i>CCR7</i>	19q13	Aktivacija limfocitov B in T	Dizier in sod., 2000
<i>ADAM33</i>	20p13	Celične interakcije	Van Eerdewegh in sod., 2002

^aNavedeni so geni, ki so bili predlagani kot najbolj verjetni kandidatni geni za astmo (Dizier in sod., 2000). ^aSusceptibility genes for asthma (Dizier et al., 2000).

2.3.2.3 Asociacijske študije celotnega genoma

Tretji pristop k analizi genetike astme je omogočila tehnologija mikročipov in sicer, asociacijske študije celotnega genoma (GWAS). S tem pristopom so odkrili enega najbolj znanih in najbolj proučevanih kandidatnih lokusov za astmo, katerega vloga pri astmi še danes ni povsem znana. To je lokus 17q12–17q21.1, kjer se poleg drugih, nahaja eden izmed najbolj znanih genov povezanih z astmo, ORMDL-regulator biosinteze sfingolipidov 3 (*ORMDL3*) (Moffatt in sod., 2007). Poleg prve GWAS, je bilo do sedaj izvedenih preko 30 drugih (Preglednica 3). Mnoge so poleg novih kandidatnih genov, kot so *PDE4D*, *IL1RL1*, *SMAD3*, *IL33*, *HLADQ*, znova potrdile lokus 17q21 kot enega izmed lokusov najmočneje povezanih z astmo (Moffatt in sod., 2010; Torgerson in sod., 2011; Sleiman in sod., 2010).

Preglednica 3: Pregled najpomembnejših genov, ki so bili povezani z astmo v asociacijskih študijah celotnega genoma.

Table 3: Asthma associated genes discovered with genome wide association studies.

Gen	Lokus	Biološka vloga	Vir
<i>DENND1B</i>	1q31	Spomin celic T	Sleiman in sod., 2010
<i>IL1RL1</i>	2q11	Receptor za IL-33, pritegne vnetne celice	Gudbjartsson in sod., 2009
<i>PDE4D</i>	5q12	Krčenje dihalnih gladkih mišic, vnetje	Himes in sod., 2009
<i>TSLP/WDR36</i>	5q22	Aktivacija dendritičnih celic, imunski odziv, odziv Th2	Hirota in sod., 2011
<i>RAD50/IL13</i>	5q31	DNA/citokin Th2	Li in sod., 2010
<i>HLA-DQ</i>	6p21	T-celični odziv	Moffatt in sod., 2010
<i>CDHR3</i>	7q22	Celični kontakti	Bønnelykke in sod., 2014
<i>IL33</i>	9p24	Aktivacija vnetnih celic	Bønnelykke in sod., 2014
<i>SMAD3</i>	15q22	Fibroze	Moffatt in sod., 2010
<i>GSDMB/ORMDL3</i>	17q12–17q21.1	Tvorba tumorjev, uravnavanje znotraj celičnega Ca^{2+}	Moffatt in sod., 2007
<i>IL2RB</i>	22q12	Vezava IL-2 in IL-15	Moffatt in sod., 2010

Slaba ponovljivost rezultatov genetskih raziskav astme, ki naj bi bila deloma tudi posledica različnih fenotipov oziroma endotipov astme, je vodila tudi v proučevanje povezave posameznih fenotipov astme in genetskih označevalcev na celotnem genomu. Tako so odkrili povezavo gena *STAT6* s koncentracijo celokupnih IgE in *IL1RL1* z odstotkom eozinofilcev v krvi (March in sod., 2013), kar potrjuje pomen proučevanja fenotipov astme poleg proučevanja astme kot enotne skupine.

GWAS so prinesle tudi vpogled v različna genetska ozadja med različnimi rasami in populacijami. Z raziskavami na različnih populacijah so odkrili povezavo astme z različnimi geni ali z enakimi geni, vendar različnimi SNP-ji. Tako je v izhodni populaciji najmočnejšo povezavo z astmo pokazal drug SNP, kot v ponovljeni raziskavi na drugi populaciji preiskovancev. Primer je gen *DENND1B* - pri proučevanju evropske populacije je bilo 20 SNP-jev povezanih z astmo. Ko je bil ta gen proučevan na afro-ameriški populaciji so bili ti SNP-ji z astmo povezani v manjši meri, hkrati pa so bili drugi SNP-ji tega gena močno povezani z astmo (Meyers, 2010). Zato je pomembno, da so asociacijske raziskave izvedene na dotični populaciji z namenom ocenitve tveganja za razvoj bolezni. V prihodnosti bomo z uporabo tehnologije določanja zaporedja DNA naslednje generacije lažje zaznali redke variante, ki bi lahko vplivale na razvoj astme. Domnevajo, da naj bi kopičenje redkih variant, ki so specifične za posamezne

populacije in jih z uporabo GWAS ne moremo zaznati, lahko privedle do pogostih kroničnih bolezni, kot je astma.

2.3.3 Astma in vpliv okolja

Astma je kompleksna bolezen na katero poleg genetskega ozadja vplivajo tudi dejavniki okolja. Slednji lahko sprožijo astmo pri posameznikih, ki so genetsko nagnjeni k njenemu razvoju. Pričakujemo, da bomo z raziskovanjem interakcij med genetskimi dejavniki in okoljem lažje razumeli kompleksne mehanizme te bolezni. Glavni okoljski dejavniki, ki naj bi pomembno doprinesli k astmi so: tobačni dim, onesnaženost zraka, izpostavljenost respiratornim virusom, endotoksinom in alergenom (Mukherjee in Zhang, 2011). Pri asociacijskih raziskavah genetike astme je pomembno ovrednotenje vplivov okolja v interakciji z rizičnimi SNP-ji v kandidatnih genih. Primeri raziskav, kjer se je izkazalo, da dejavniki okolja vplivajo na povezavo SNP-jev v kandidatnih genih z astmo so številni. Tako je bil kromosomski lokus 17q21 v eni izmed raziskav močno povezan samo z astmo pri otrocih, ki so bili izpostavljeni tobačnemu dimu (Bouzigon in sod., 2008). V drugi raziskavi so imeli nosilci rizičnih genotipov SNP-jev lokusa 17q21 večjo možnost, da razvijejo astmo kot posledico zgodnjih respiratornih okužb (Smit in sod., 2010). Izkazalo se je tudi, da so osebe z rizičnim genotipom v nekaterih SNP-jih gena, ki kodira IL-9, razvile težjo astmo če so bile izpostavljene hišni pršici (Sordillo in sod., 2015). Ker ne obstajajo enotne definicije, ki bi opredeljevale dejavnike okolja, se ti med raziskavami razlikujejo, kar dodatno otežuje ponovljivost izidov raziskav in proučevanje te kompleksne bolezni s poligenim ozadjem. Kljub zahtevnemu ocenjevanju dejavnikov okolja, jih je potrebno vključevati v genetske analize, saj predpostavljamo, da okoljski dejavniki sprožijo razvoj astme pri genetsko nagnjenih posameznikih.

2.3.4 Astma in interakcije med geni

Z raziskavami genetike astme so odkrili statistično značilno povezavo številnih genov z astmo, vendar je doprinos posameznih SNP-jev k razvoju bolezni majhen. Na razvoj astme naj bi namreč vplivalo veliko število genov z majhnimi učinki, zato so verjetno pomembni sinergistični in aditivni učinki posameznih variant (Meyers, 2010). Zaradi domnevne poligenске narave astme so pri proučevanju astme ključne interakcije med geni, imenovane epistaze. V eni izmed raziskav so ugotovili, da je tveganje za astmo kar petkrat večje, če ima oseba hkrati rizična genotipa v genih *IL4RA* in *IL13*, kot če ima v obeh genih hkrati ne-rizična genotipa (Howard in sod., 2002). Zaradi velikega števila kandidatnih genov za astmo je možno število interakcij med geni zelo veliko. V razvoju so računalniške in statistične metode, ki bodo omogočile ovrednotenje genskih interakcij na nivoju genoma in šele te bodo verjetno močno pripomogle k razumevanju genetskega ozadja astme.

2.3.5 Genetika astme in drugih bolezni

Geni, ki so bili opisani kot pomembni pri razvoju astme so bili mnogokrat povezani tudi z drugimi, podobnimi boleznimi. Podatki genomskih in genetskih raziskav kažejo, da imajo imunske bolezni kot so astma, Crohnova bolezen (Barrett in sod., 2008) in primarna biliarna ciroza (Hirschfield in sod., 2009) skupne kandidatne gene, kot so na primer geni lokusa 17q12–17q21.1. Bolezen najbolj podobna astmi z vidika prizadetega tkiva je KOPB. Izkazalo se je, da je v skupini kroničnih obstruktivnih pljučnih bolezni, kar 20 % bolnikov, ki sodijo v skupino bolnikov pri katerih prihaja do prekrivanja astme in KOPB, kar imenujemo ACOS (Gibson in McDonald, 2015), kar nakazuje na deljeno genetsko ozadje pri nekaterih bolnikih. Z GWAS niso odkrili skupnih rizičnih lokusov, medtem ko je bilo s proučevanjem kandidatnih genov odkritih kar nekaj skupnih povezav. Primer je gen *ADAM33*, ki je bil pri astmi povezan s pljučnim delovanjem in vplivom kajenja (Jongepier in sod., 2004), ki največkrat sproži KOPB. V drugi raziskavi je bil *ADAM33* povezan tudi s KOPB (Sadeghnejad in sod., 2009).

2.3.6 Lokus 17q12–17q21.1

Prva GWAS pri bolnikih z astmo je bila izvedena leta 2007 (Moffatt in sod., 2007). Glavno odkritje je bila povezava kromosomskega lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri otrocih. Lokus se razprostira med 35.0 in 35.5 Mb na dolgi ročici kromosoma 17 in vsebuje vsaj 15 genov. Mnoge raziskave so šele po tem odkritju vzele ta lokus pod drobnogled, čeprav je bil ta lokus že leta 2000 z analizo genske povezanosti močno povezan z astmo (Dizier in sod., 2000). Takrat so kot kandidatne gene, ki naj bi bili povezani z astmo omenjali *STAT5*, *CSF3*, *IMC1*, *RANTES* in *CCR7*, kateri se z nadaljnjimi raziskavami niso izkazali kot glavni kandidatni geni tega lokusa, ki bi doprinesli k razvoju astme. Geni, ki so se z GWAS izkazali, kot pomembni geni za astmo in ležijo na lokusu 17q12–17q21.1, na podlagi njihovega biološkega delovanja verjetno nikoli ne bi bili izbrani za analizo. Njihova biološka vloga pri astmi kljub osmim letom proučevanja in mnogim povezavam z astmo še danes ni dobro znana. Kot glavni kandidatni geni za astmo, katerih SNP-ji so bili povezani tudi z genskim izražanjem (Moffatt in sod., 2007) so *ORMDL3*, gasdermin A in gasdermin B (*GSDMA* in *GSDMB*), in protein 2, ki se veže na steklasto ovojnico jajčnikovega folikla (*ZPBP2*). Polimorfizmi lokusa 17q12–17q21.1 so bili povezani tudi z izražanjem drugih genov kot je štiriindvajseta podenota posrednika transkripcije (*MED24*) (Ono in sod., 2014). Čeprav je znanje o biološki vlogi genov lokusa 17q12–17q21.1 pri astmi še vedno omejeno, so bili v mnogih genetskih raziskavah povezani s tveganjem za razvoj astme, tako v GWAS kot v raziskavah kandidatnih genov (Preglednica 4).

Preglednica 4: Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo in fenotipi astme.

Table 4: Associations between asthma/asthma phenotypes and 17q12–17q21.1 SNPs.

Protein-kodirajoči gen	SNP	Položaj SNP-ja	Rizični alel	Fenotip astme	Proučevana populacija	Velikost vzorca; št. bolnikov z astmo, zdravi	Vrsta genetske raziskave	Vir
IKZF3	rs9303277 (T>C)	intron	C		odrasli, Kitajska	688, 634	kandidatni geni	Fang in sod., 2011
			C	astma pri otrocih	otroci, Velika Britanija	994, 1243	GWAS	Moffatt in sod., 2007
ZPBP2	rs8069176 (A>G)	navzdol od <i>GSDMB</i>	G	FeNO	meta analiza	10365, 16109	GWAS	Van der Valk in sod., 2014
	rs4795400 (T>C)	intron	C	astma pri otrocih	francosko-kanadske družine	651, 890	kandidatni geni	Bouzigon in sod., 2008
			T	astma pri otrocih	odrasli in otroci, Rusija	358, 369	GWAS	Karunas in sod., 2011
	rs8069176 (A>G)	navzdol od <i>GSDMB</i>	G	astma pri otrocih	francosko-kanadske družine	651, 890	kandidatni geni	Bouzigon in sod., 2008
	rs11557476 (G>T)	ekson, S>I	G	astma pri otrocih	otroci, Velika Britanija	994, 1243	GWAS	Moffatt in sod., 2007
	rs12936231 (G>C)	intron	C	kajenje	družine, Velika Britanija	831, 187	kandidatni geni	Marinho in sod., 2012
	rs1054609 (C>A)	3' neprevedeno območje	A		družine, Velika Britanija	831, 187	kandidatni geni	Marinho in sod., 2012
GSDMB	rs7216389 (T>C)	intron	T	atopijska astma	otroci, Koreja	775, 451	kandidatni geni	Kang in sod., 2012
			T		odrasli, Kitajska	696, 637	kandidatni geni	Fang in sod., 2011
			T	število poslabšanj	otroci, Velika Britanija	1279, 1541	kandidatni geni	Tavendale in sod., 2008
			T	astma pri otrocih	otroci, Velika Britanija	994, 1243	GWAS	Moffatt in sod., 2007
			T	atopijska astma	otroci, Koreja	786, 522	kandidatni geni	Yu in sod., 2011
			T	astma pri otrocih, teža astme	Islandija, Avstralija, Nizozemska, Nemčija	1648, 30898 647, 564 221, 1564 307, 560	kandidatni geni	Halapi in sod., 2010
			T	astma pri otrocih, teža astme	otroci in odrasli, Velika Britanija	226, 1429	kandidatni geni	Binia in sod., 2011
	rs2305480 (T>C)	ekson, P>S	T	piskanje v pljučih	otroci, Velika Britanija	3595, 3450	kandidatni geni	Granell in sod., 2012
	rs2305479 (A>G)	ekson, G>R	G		francosko-kanadske družine	253, 1022	kandidatni geni	Madore in sod., 2008
	rs2290400 (A>G)	intron	A	astma pri otrocih	otroci, Velika Britanija	994, 1243	GWAS	Moffatt in sod., 2007
ORMDL3	rs4795405 (T>C)	5' od <i>ORMDL3</i>	C	astma pri otrocih	francosko-kanadske družine	651, 890	kandidatni geni	Bouzigon in sod., 2008
	rs4794820 (A>G)	5' od <i>ORMDL3</i>	G	težka astma	odrasli, Velika Britanija	933, 3346	GWAS	Wan in sod., 2012

se nadaljuje

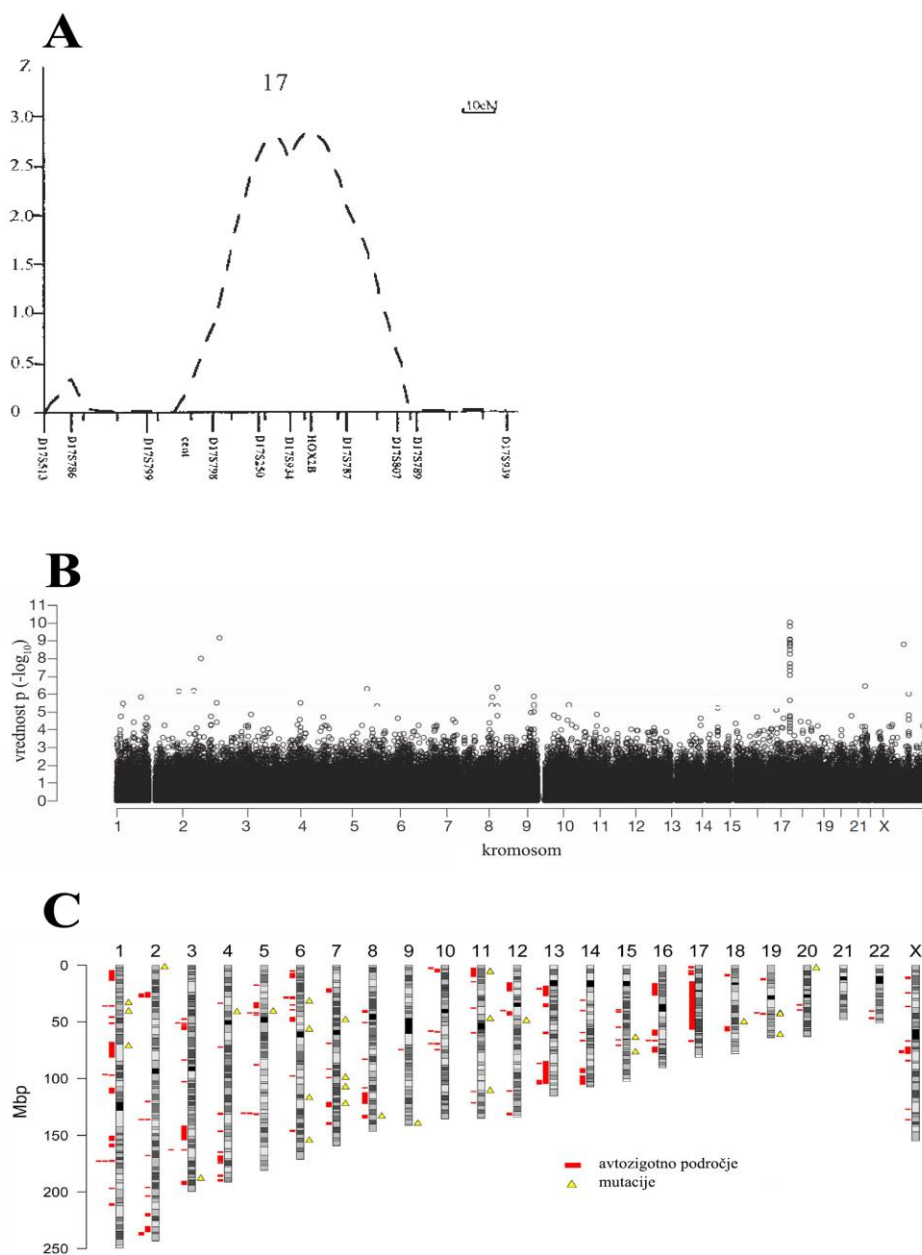
Nadaljevanje preglednice 4. Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo in fenotipi astme.

Gen	SNP	Položaj SNP-ja	Rizični alel	Fenotip astme	Proučevana populacija	Velikost vzorca; št. bolnikov z astmo, zdravi	Vrsta genetske raziskave	Vir
GSDMA	rs3894194 (A>G)	ekson, R>Q	A	astma pri otrocih	otroci, Velika Britanija	994, 1243	GWAS	Moffatt in sod., 2007
			A		družine, Velika Britanija	831, 187	kandidatni geni	Marinho in sod., 2012
	rs3902025 (T>G)	5' neprevedeno območje	T		družine, Velika Britanija	831, 187	kandidatni geni	Marinho in sod., 2012
	rs7212938 (G>T)	ekson, V>L	G	atopijska astma	otroci, Koreja	786, 522	kandidatni geni	Yu in sod., 2011
			G		družine, Velika Britanija	831, 187	kandidatni geni	Marinho in sod., 2012
	rs3859192 (T>C)	intron	T		družine, Velika Britanija	831, 187	kandidatni geni	Marinho in sod., 2012

Z meta analizo, v katero so zajeli 10365 bolnikov z astmo in 16110 zdravih kontrol, so potrdili povezavo lokusa 17q12–17q21.1 z astmo, vendar le z astmo, ki se pojavi v otroštvu. Pri analizi povezave lokusa 17q12–17q21.1 pri etično raznolikih populacijah, evropski, afro-ameriški in latinski populaciji so potrdili povezanost tega lokusa z astmo, a se rizični SNP-ji med etničnimi skupinami razlikujejo (Torgerson in sod., 2011), kar lahko pripišemo različni haplotipni strukturi populacij.

Lokus 17q12–17q21.1 je bil v nekaterih raziskavah povezan s posameznimi fenotipi astme. Izkazalo se je, da je močnejše povezan z astmo, ki se pojavi v zgodnjem otroštvu (Bouzigon in sod., 2008; Tavendale in sod., 2008) in z astmo pri kateri so bili bolniki izpostavljeni cigaretnemu dimu (Bouzigon in sod., 2008). Polimorfizmi, ki se nahajajo na lokusu 17q12–17q21.1 so bili povezani tudi z astmo pri odraslih (Fang in sod., 2011; Ferreira in sod., 2011; Hrdlickova in Holla, 2011), vendar so si nekateri podatki nasprotujoči (Binia in sod., 2011). Lokus 17q12–17q21.1 je bil povezan tudi s težko obliko astme (Halapi in sod., 2010) in po nekaterih raziskavah z atopijsko astmo (Yu in sod., 2011) (Preglednica 4). Povezave s zmanjšanim pljučnim delovanjem niso našli (Spycher in sod., 2012).

V eni izmed novejših raziskav, kjer so z metodo določanja zaporedja DNA naslednje generacije določili zaporedje celotnega genoma inbridiranih družin z astmo so ugotovili, da je na 17. kromosomu pri bolnikih z astmo veliko avtozigotno področje, ki je bilo odsotno pri zdravih sorodnikih (Campbell in sod., 2014). Avtozigotnost pomeni dve enaki genski kopiji skupnega izvora in bi lahko še dodatno potrjevala pomen lokusa 17q12–17q21.1 pri astmi. Domnevamo, da naj bi imele osebe z dvema enakima kopijama relativno pogostega alela večjo možnost za razvoj neke bolezni, kot če je prisotna le ena sama (Wang in sod., 2009). Na sliki 1 je prikazano kako so z različnimi načini proučevanja genetike astme zaznali vpletenost lokusa 17q12–17q21.1 pri astmi.



Slika 1: Kromosomski lokus 17q12–17q21.1 je bil povezan z astmo z analizo genske povezanosti (Dizier in sod., 2000: 1816) (A), z asociacijsko študijo celotnega genoma (Moffatt in sod., 2007: 471) (B) in s sekvencioniranjem celotnega genoma (Campbell in sod., 2014: 3) (C).

Figure 1: 17q12–17q21 chromosomal locus was associated with asthma with linkage analysis (Dizier et al., 2000: 1816) (A), genome wide association study (Moffatt et al., 2007: 471) (B) and whole genome sequencing (Campbell et al., 2014: 3) (C).

Čeprav je bilo izvedenih že veliko raziskav, še vedno ne vemo, kateri gen v področju 17q12–17q21.1 je dejansko odgovoren oz. doprinese največ k razvoju astme. Eden izmed poizkusov za določitev odgovornega SNP-ja je določitev SNP-jev, ki največ doprinesejo k spremenjenem izražanju genov tega področja (Halapi in sod., 2010). V izvorni raziskavi je bil z astmo najmočnejše povezan rs7216389, ki je bil povezan tudi z izražanjem genov *ORMDL3* in *GSDMB* v levkocitih periferne krvi. Ugotovili so, da je spremenjeno izražanje genov tega področja posledica različnega stanja kromatina zaradi različnih alelnih variant SNP-jev, kar pomeni, da naj bi bilo za nastanek bolezni odgovornih več SNP-jev (Verlaan in sod., 2009). Eden izmed SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1, rs4795397, alelno specifično vpliva na aktivnost promotorja gena *ZPBP2* ter razporejanje nukleosoma, kar vpliva na izražanje genov. Domnevajo, da so spremembe v izražanju genov lokusa 17q21 posledica številni regulatornih polimorfizmov in epigenetskih dejavnikov, kot je metilacija v tem cis-regulatornem haplotipnem območju (Berlivet in sod., 2012).

Iz slike 2, ki prikazuje podatke pridobljene s pomočjo genomskega brskalnika UCSC (Kent in sod., 2002), o genih lokusa 17q12–17q21.1 je razvidno, da so nekateri deli genov visoko medvrstno ohranjeni. Posledično bi SNP-ji, ki se nahajajo v tem področju lahko pomembno doprinesli k razvoju bolezni. Številna so mesta za vezavo histonov H3K27ac, ki se pogosto nahajajo v bližini regulatornih mest, ki uravnavajo izražanje genov. Histoni H3K27ac so prisotni ob aktivnih ojačevalcih prepisovanja genov (Creyghton in sod., 2010). Tu se nahajajo tudi preobčutljivostna mesta za delovanje DN-az, za katere je značilna izguba kondenzirane strukture kromatina, zaradi česar je DNA izpostavljena za vezavo TF-jev in drugih proteinov, ki so pomembni za prepisovanje genov. Ta mesta so torej povezana s transkripcijsko aktivnostjo. V tem območju so prisotna številna vezavna mesta za TF-je. Vsa zgoraj omenjena mesta na DNA so torej pomembna za aktivno prepisovanje genov. Sodeč po podatkih iz zbirke UCSC (Kent in sod., 2002), so ta najbolj strnjena v genih *ORMDL3*, spodbujevalnem dejavniku rasti (granulocitnih) kolonij 3 (*CSF3*), *MED24* in ne-ATP-azni podenoti 3 proteasoma 26s (*PSMD3*), kar kaže da imajo ti geni pomembno vlogo.

Na lokusu 17q12–17q21.1 se nahaja več genov. Glavni kandidatni geni, ki so bili v preteklih raziskavah povezani z astmo so *ZBP2*, *GSDMB*, *ORMDL3* in *GSDMA*. Poleg teh se tu nahajajo še *PSMD3*, *CSF3*, *MED24* in drugi geni. V nadaljevanju so predstavljene njihove biološke vloge.

2.3.6.1 Protein 2, ki se veže na steklasto ovojnico jajčnikovega folikla

ZBP2 je udeležen v spermatogenezi in oploditvi (Lin in sod., 2008) in je visoko izražen v testisih (Su in sod., 2004). Njegova biološka vloga pri astmi ni znana.

2.3.6.2 Gasdermin B

GSDMB je izražen v epitelijskih celicah kože in v gastrointestinalnem traktu in je verjetno vpleten v tvorbo tumorjev. *GSDMB* je izražen tudi v celicah T in v dihalnem epiteliju (Komiyama in sod., 2010; Su in sod., 2004). Njegova biološka vloga pri astmi ni znana.

2.3.6.3 ORMDL-regulator biosinteze sfingolipidov 3

Visoko ohranjen gen *ORMDL3* naj bi bil udeležen pri uravnavanju citosolnega Ca^{2+} . *ORMDL3* inhibira Ca^{2+} črpalko SERC-o, ki prenaša Ca^{2+} iz citosola v lumen endoplazemskega retikuluma (ER), kar povzroča sproščanje mišic. Neučinkovit privzem Ca^{2+} v ER lahko vodi do odziva na ne-zvite proteine, kar sproži vnetni odziv (Cantero-Recasens in sod., 2010) ali do krčenja dihalnih gladkih mišic. Z uravnavanjem Ca^{2+} naj bi *ORMDL3* vplival tudi na aktivacijo limfocitov T.

Proteini ORM imajo pomembno vlogo tudi v homeostazi sfingolipidov, ki so pomembna sestavina celičnih membran. Mutacije ali spremembe v fosforilaciji proteinov ORM povzročijo neuravnotežene koncentracije Ca^{2+} ter posledično motnje v sfingolipidnem metabolizmu (Breslow in sod., 2010). Proteini ORM naj bi preko inhibiranja encima serinske palmitoil-CoA transferaze negativno uravnavali sfingolipidno sintezo, kar je bilo povezano z nastankom bronhialne preodzivnosti (Worgall in sod., 2013).

Študije na transgenih miših s povečanim izražanjem *ORMDL3* kažejo na možno biološko vlogo pri astmi, saj so imele transgene miši povečano preoblikovanje in vnetje dihalnih poti (Miller in sod., 2014). V nasprotju z zgoraj navedenim raziskavami, Hsu in Turvey (2013) nista našla povezave med izražanjem *ORMDL3* in odzivom na ne-zvite proteine ali vnetnim odzivom, zato predlagata, da so morda drugi geni lokusa 17q12–17q21.1 odgovorni za ponovljive genetske povezave z astmo. Gen *ORMDL3* je izražen v mnogih tkivih, tudi v pljučih, v večji meri pa v maščobnem tkivu in jetrih (Su in sod., 2004).

Polimorfizmi v genu *ORMDL3* so bili poleg astme, povezani še z drugimi imunskimi boleznimi kot je kronična vnetna črevesna bolezen, kar kaže na vpletenost *ORMDL3* v delovanje imunskega sistema (Barrett in sod., 2008). Pljuča in prebavila so si podobna v svoji mukozni sestavi in srečevanju s potencialnimi antigeni in alergeni, kar zahteva usklajenost imunskega sistema (Neurath in sod., 2002). Spremenjeno izražanje gena *ORMDL3*, kot posledica prisotnosti različnih SNP-jev, bi lahko torej vodilo v motnje imunskega sistema in posledično do kroničnih bolezni.

2.3.6.4 Gasdermin A

Vloga gena *GSDMA* pri astmi ni znana, znano je le, da je pri gastrointestinalnem raku vpleten v apoptozo gastričnega epitelija (Saeki in sod., 2009). Gen *GSDMA* je izražen v dihalnem sistemu, tako v bronhijih kot pljučnem tkivu, ter v koži (Su in sod., 2004).

2.3.6.5 Spodbujevalni dejavnik rasti (granulocitnih) kolonij 3

V območju 17q12–17q21.1 se nahaja tudi gen *CSF3*, ki kodira zapis za protein CSF3, ki je bolje poznan pod starejšim imenom G-CSF. Le-ta spodbuja kostni mozeg k proizvodnji granulocitov, pomemben je za razširjanje in zorenje nevtrofilcev, povečuje njihovo učinkovitost in skrajšuje razpolovno dobo (Shochat in sod., 2007). Domneva se, da CSF3 spodbuja vnetni odziv Th2 (Pan in sod., 1995).

Po predvidevanjih druge hipoteze, CSF3 preprečuje infiltracijo eozinofilcev v pljučna tkiva in vpliva na pljučne citokine in kemokine, znižuje koncentracije interleukinov in eotaksina v bronhoalveolarnemu izpirku (BAL), s čimer preprečuje nastanek alergijskega odziva in vnetja (Queto in sod., 2011). Gen *CSF3* je izražen v pljučih (Su in sod., 2004).

2.3.6.6 Ne-ATP-azna podenota 3 proteasoma 26S

PSMD3 kodira ne-ATP-azno podenoto regulatornega pokrovčka 19S, ki je del multikatalitičnega proteinaznega kompleksa proteasoma 26S. Proteasom 26S je glavna proteaza odgovorna za razgradnjo regulatornih in okvarjenih proteinov v celicah. Proteasomalna razgradnja vpliva na mnogo celičnih procesov, kot je uravnavanje celičnega cikla, transkripcijo, popravljanje DNA, apoptozo in predstavljanje antigenov (Naujokat in Hoffmann, 2002). *PSMD3* je izražen v večini tkiv (Su in sod., 2004). Njegova vloga pri astmi ni znana.

2.3.6.7 Štiriindvajseta podenota posrednika transkripcije

MED24 kodira eno izmed 31-ih podenot transkripcijskega koaktivatorja, imenovanega posrednik transkripcije, za katerega se domneva, da naj bi bil udeležen pri izražanju večine genov. *MED24* je izražen v mnogih tkivih, a v najvišji meri v pljučih (Su in sod.,

2004). Geni *GSDMA*, *MED24* in *PSMD3* so bili povezani s številom belih krvničk oziroma levkocitov (Crosslin in sod., 2012).

2.4 PRIMERJAVA BIOLOGIJE TER GENETIKE ASTME IN KOPB TER ACOS

Kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) je kronično obolenje dihal. Za bolezen je značilna kratka sapa, kroničen kašelj ter povečano nastajanje sluzi in izpljunkov. Podobno kot astma, KOPB uvrščamo med kompleksne bolezni, na katere vplivajo genetski in okoljski dejavniki. V primerjavi z astmo, pri kateri je obstrukcija dihal večinoma reverzibilna, je pri KOPB reverzibilnost obstrukcije minimalna oziroma je obstrukcija fiksna. Pri KOPB so prizadete male dihalne poti, medtem ko so pri astmi prizadete velike dihalne poti, razen pri bolnikih s težko astmo, kjer pride tudi do prizadetosti malih dihalnih poti (Jeffery, 2004). Obstajajo različne teorije o izvoru astme in KOPB. Po predvidevanjih britanske hipoteze gre za dve različni bolezni, ki se razvijeta po različnih mehanizmi. Nasprotno, je po holandski hipotezi to ena bolezen z različnim časovnim nastankom, sprožilci in epigenetskimi vplivi na enako genetsko ozadje (Zeki in sod., 2011). Skladno s tem, ima 13–43 % bolnikov s KOPB pred nastankom te bolezni astmo (Soriano in sod., 2005). Čeprav je večina bolnikov s KOPB kadilcev, le 20–50 % kadilcev razvije KOPB, kar nakazuje na pomen genetskega ozadja oz. nagnjenosti h KOPB (Meyers in sod., 2004). Ne nazadnje, obstaja veliko število bolnikov, ki razvijejo KOPB a niso nikoli kadili (Chilvers in Lomas, 2010). Na deljeno genetsko ozadje med astmo in KOPB nakazuje tudi obsoj ACOS-a, za katerega je značilno prekrivanje simptomov astme in KOPB. Gre za novo prepoznano obliko bolezni, zato njeni mehanizmi še niso znani. ACOS se običajno pojavi po 40. letu starosti, vendar imajo bolniki mnogokrat simptome že v otroštvu, težave z dihanjem so prisotne ves čas, a z različno težo, obstrukcija je pri teh bolnikih delno reverzibilna, pogosto je v družinski anamnezi astma. Za ACOS je značilna fenotipska pestrost, zato domnevajo, da jo bomo lažje prepoznali tudi s pomočjo genetskih označevalcev (Asthma ..., 2015).

Glavni kandidatni geni za KOPB so geni, ki so bili povezani s pljučnim delovanjem, kot so na primer *ADAM33*, *ADRB2*, *CSF3*, *GSTM1* in *TGFB1*. Nekateri izmed redkih genov, ki so bili povezani z astmo in KOPB so *IL13*, *ADRB2*, *GSTM1* in *TNF*. Z GWAS niso identificirali še nobenega skupnega gena, pri čemer sta bili pri KOPB izvedeni le dve raziskavi GWAS (Postma in sod., 2011). Genetika KOPB je slabo raziskana, zlasti v primerjavi in povezavi z genetiko astme.

2.5 FARMAKOGENETIKA ASTME

Astma povzroča kompleksna interakcija med genetskimi dejavniki in okoljem, zato je zanj značilno, da se izraža s spektrom bioloških in kliničnih značilnosti. Za zdravljenje astme se uporabljajo tri glavne skupine zdravil: beta agonisti (albuterol, salmeterol,

fenoterol), kortikosteroidi (flutikazon propionat, beklometazon, prednizon) in inhibitorji cisteinil levkotrienske poti (montelukast, zafirlukast, zileuton).

Kljub temu, da so se vsa našeta zdravila v kliničnih študijah izkazala kot zelo učinkovita, se bolniki na zdravljenje z vsemi tremi skupinami zdravil odzivajo zelo različno. Domnevamo, da naj bi bilo 60–80 % variabilnosti v odgovoru na zdravljenje genetsko pogojene. Poleg raziskav povezave med nastankom bolezni in SNP-ji, se le-ti uporabljajo tudi pri iskanju povezave med genetskim ozadjem posameznika in odgovorom na zdravljenje astme, kar uvrščamo na področje farmakogenetike. V prihodnosti bi bili SNP-ji lahko uporabljeni za predvidevanje odziva posameznika na določeno zdravilo, s čimer bi izboljšali učinkovitost in varnost zdravljenja (Silverman in sod., 2001). Dosedanje raziskave farmakogenetike astme večinoma temeljijo na pristopu proučevanja kandidatnih genov.

Beta agonisti, se vežejo na beta adrenergične receptorje, ki se nahajajo na vnetnih pljučnih celicah ter gladkih celicah dihalnih poti. Delujejo tako, da zmanjšujejo znotrajcelični Ca^{2+} in fosforilirajo kontraktilne proteine, kar vodi v sprostitvev gladkih mišic (Silverman in sod., 2001). Ena izmed najbolj proučevanih farmakogenetskih tarč pri astmi je gen *ADRB2*, ki je bil povezan z odzivom na beta agoniste (Wechsler in sod., 2006).

Druga skupina zdravil deluje na levkotriene, ki jih sproščajo eozinofilci, mastociti in alveolarni makrofagi in spodbujajo obstrukcijo dihalnih poti, migracijo eozinofilcev in delitev celic gladkih mišic (Barnes, 2006). So močni bronhokonstriktorji, kemotaktični dejavniki, povečujejo izločanje bronhialne sluzi, prepustnost ožilja, pospešujejo delitev celic gladkih mišic ter aktivirajo vnetne celice. Glavni encimi, ki sodelujejo pri sintezi levkotrienov so 5-lipooksigenaza, ki jo kodira gen *ALOX5*, levkotrien sintaza C4, ki jo kodira gen *LTC4* in epoksid hidrolaza, ki jo kodira gen *LTA4*. Uporaba inhibitorjev ali antagonistov cisteinilnih levkotrienov izboljšuje stanje astme. Izkazalo se je, da kortikosteroidi *in vivo* ne zavirajo sinteze levkotrienov. Kortikosteroidi in antilevkotrieni sinergistično zmanjšujejo vnetje pri bolnikih z astmo. Proučevanih je bilo več genov, ki kodirajo proteine v levkotrienski poti, kot so *LCS4* in *ALOX5*. Odkrili so povezave z odzivom na zdravljenje z antagonisti levkotrienov (Lima in sod., 2009).

Tretja in najpogostejše uporabljena skupina zdravil za astmo so kortikosteroidi. Kortikosteroidi se vežejo na znotraj celični receptor. Kompleks receptor-ligand potuje v jedro, kjer uravnava izražanje genov. Zavira izražanje pro-vnetnih proteinov (citokinov, kemokinov in adhezijskih molekul) in poveča izražanje proti-vnetnih proteinov (Umland in sod., 2002). Inhibicija jedrnega dejavnika kapa B, kot enega najpomembnejših proteinov inhibiranih s kortikosteroidi, povzroči inhibicijo različnih citokinov, ki imajo glavno vlogo v patofiziologiji alergijskega vnetja, vazodilataciji in povečani žilni prepustnosti (Alangari, 2010). Kljub splošno znani učinkovitosti, se je izkazalo, da pri več kot 30 % bolnikov z astmo kortikosteroidi nimajo pomembnejšega

učinka in da pri 20 % pride celo do poslabšanja pljučnega delovanja po nekaj tedenski uporabi inhalacijskih kortikosteroidov (IK). Razlika v odzivu na zdravljenje z IK je ponovljiva, zato domnevamo, da zanjo obstaja genetska podlaga (Morrow, 2007).

V farmakogenetskih raziskavah so našli povezavo nekaterih SNP-jev v genu *CRHR1* z odzivom bolnikov z astmo na zdravljenje z IK. Domnevajo, da ima receptor 1 za sproščanje hormona kortikotropina (*CRHR1*) pomembno vlogo pri uravnavanju endogene sinteze steroidnih hormonov. Bolniki s to okvaro bi se torej bolje odzivali na zdravljenje z eksogenimi kortikosteroidi. Pokazali so, da je rs242941 v *CRHR1* povezan z odzivnostjo bolnikov z astmo na zdravljenje s kortikosteroidi (Tantisira in sod., 2004).

2.5.1 Astma in *VEGFA*

Domneva se, da astma ni le bolezen dihal, temveč naj bi bila tudi bolezen ožilja. Tako za lahko, kot težko obliko astme je namreč značilno povečano delovanje bronhialnega žilnega sistema, ki se kaže v povečanem številu, velikosti in gostoti krvnih žil ter žilni prepustnosti in nabreklosti celic zaradi plazme (Harkness in sod., 2014). Izkazalo se je, da je stopnja ožiljenosti v sorazmerju s težo astme (Salvato, 2001). Neovaskularizacija je eden izmed glavnih dejavnikov preoblikovanja dihalnih poti pri astmi. Povečan dotok krvi v dihalna tkiva naj bi omogočal kroničen dotok vnetnih dejavnikov, povečano celično rast in delitev ter debeljenje sten dihalnih poti (Harkness in sod., 2014). Nekateri avtorji predvidevajo, da se pri astmatični epizodi pred izbruhom celičnega vnetja pojavi povečana prepustnost ožilja (Khor in sod., 2009).

Ena izmed tarč delovanja zdravil za astmo je žilna prepustnost. Glavni regulator preoblikovanja mikro-ožilja in žilne prepustnosti pri astmi je *VEGFA*. Transgene miške s prekomerno izraženim genom *VEGFA* v dihalnem epiteliju razvijejo vnetje Th2 podobno astmi ter preodzivnost in preoblikovanje dihalnih poti (Lee in sod., 2004). Za astmo so značilne povečane koncentracije *VEGFA*, ki so negativno povezane s pljučnim delovanjem (Asai in sod., 2003).

Eden izmed pozitivnih učinkov kortikosteroidov naj bi bilo tudi anti-angiogeno delovanje. Izkazalo se je, da po zdravljenju astme s kortikosteroidi pride do zmanjšanja *VEGFA* v izmečku (Asai in sod., 2003) in v biopsijah dihalnih poti (Feltis in sod., 2007) bolnikov z astmo. Podobno so dokazali s celičnimi kulturami, kjer so kortikosteroidi vplivali na zmanjšanje izražanja mRNA gena *VEGFA* in izločanja *VEGFA* iz pljučnih epiteljskih celic (Bandi in Kompella, 2004).

Podobno kot za kortikosteroide, velja tudi za antagonist receptorjev za levkotriene (*LTRA*). Tudi ti so učinkoviti pri zmanjševanju povečanega sluzničnega dotoka krvi pri bolnikih z astmo (Mendes in sod., 2001). Na mišjih modelih z astmo so ugotovili, da *LTRA* vplivajo na zmanjšano izražanje *VEGFA* v pljučih in posledično zmanjšanje žilne prepustnosti (Lee K.S. in sod., 2004). Tudi pri bolnikih z astmo zdravljenih z

LTRA je prišlo do zmanjšanja VEGFA v induciranem izmečku (Kanazawa in sod., 2007).

Gen *VEGFA*, je zato eden izmed bioloških kandidatnih genov, ki bi bil lahko povezan z odzivom na zdravljenje pri astmi.

Farmakogenetsko vlogo gena *VEGFA* so proučevali z analizo povezave med označevalnimi SNP-ji in odzivom na zdravljenje astme pri otrocih z astmo (Sharma in sod., 2009). Po 4 letih zdravljenja z IK so imeli otroci, ki so bili nosilci vsaj ene kopije alela A v rs2146323 izboljšano pljučno delovanje v primerjavi z ostalimi, pri katerih do izboljšanja ni prišlo. Povezave med rs833058 in odzivom na zdravljenje v tej raziskavi niso našli, bil pa je povezan z dihalno preodzivnostjo v dveh neodvisnih populacijah (Sharma in sod., 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

3.1.1 Povezava SNP-ja rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4*, z astmo pri odraslih in KOPB

V prvem delu raziskave smo proučevali povezavo SNP-ja rs4795405 z astmo in KOPB pri odraslih bolnikih v Sloveniji. Polimorfizem rs4795405 se nahaja navzgor od protein-kodirajočega gena *ORMDL3*, v genu, ki kodira lincRNA *RP11-387H17.4*. Zaradi njegove povezave z izražanjem gena *ORMDL3* je pogosto imenovan kar polimorfizem *ORMDL3*. V raziskavo smo vključili 493 preiskovancev. Proučevali smo populacijo bolnikov z astmo, ki so bili zbrani v več različnih pulmoloških ambulantah v Sloveniji. Del bolnikov je bil zbran na Univerzitetni kliniki Golnik, drugi del pa je bil zbran v zasebnih pulmoloških ambulantah, zato je bil v raziskavi zastopan pester nabor bolnikov iz različnih delov Slovenije. V tem delu raziskave smo želeli poleg ovrednotenja povezave astme pri odraslih z rs4795405 preveriti tudi povezavo tega SNP-ja z astmo, ki jo spremlja pogosta pridružena bolezen rinitis v primerjavi z astmo pri kateri rinitis ni prisoten. V raziskavo smo vključili 131 bolnikov z astmo, pri čemer je imelo 59 bolnikov pridružen rinitis, 72 bolnikov pa je imelo izključno astmo, brez rinitisa. Ker je delež bolnikov z astmo brez rinitisa bistveno manjši kot delež bolnikov z rinitisom, smo v raziskavo načrtno vključili približno enako število preiskovancev obeh skupin. V kontrolno skupino smo vključili 170 odraslih zdravih ljudi. Pri primerjavi pojavnosti posameznih genotipov in alelov polimorfizma rs4795405 pri astmi z ali brez pridruženega rinitisa smo vključili še kontrolno skupino 59 bolnikov, ki so imeli izključno rinitis, brez astme. Ker naj bi bila po nekaterih podatkih za astmo brez rinitisa značilna manj reverzibilna obstrukcija dihalnih poti, ki je ena izmed glavnih značilnosti bolnikov s KOPB, smo želeli preveriti še povezavo SNP-ja rs4795405 s KOPB. V skupino bolnikov s KOPB smo vključili 133 bolnikov, ki so bili zbrani v Univerzitetni kliniki Golnik. Pri teh bolnikih smo imeli tudi podatke o pljučnem delovanju in sicer, % predvidene normalne vrednosti FEV1 in % predvidene normalne vrednosti FVC.

Diagnoza astme je bila postavljena v skladu s smernicami GINA (Global ..., 2006), diagnoza rinitisa v skladu s smernicami ARIA (Bousquet in sod., 2008) in diagnoza KOPB v skladu s smernicami GOLD (Global ..., 2007). Pri preiskovancih vključenih v kontrolno skupino sta bila izvzeta astma ali KOPB. Kri za izolacijo DNA je bila pri preiskovancih odvzeta v epruveto z dodatkom EDTA.

3.1.2 Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih

V drugem delu raziskave smo želeli preveriti povezavo večih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo na drugi, večji skupini odraslih bolnikov. Vključili smo SNP-je rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246, rs4795405, rs8079416, rs3893044,

rs7219080, rs8069202, rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777, ki se nahajajo v območju genov *ZBP2*, *GSDMB*, *ORMDL3*, *RP11-387H17.4*, *LRRC3C*, *GSDMA*, *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*. V analizo smo vključili 418 bolnikov z astmo. Diagnoza astme je bila postavljena na podlagi smernic GINA (Global ..., 2006). Diagnoza astme je bila potrjena na podlagi pozitivnega metaholinskega testa ali izboljšanja pljučnega delovanja po aplikaciji bronhodilatatorja. Ta del raziskave je bil opravljen retrospektivno. Podatki o bolnikih so bili zbrani iz bolniških arhivov, zato niso bili popolni za vse bolnike. Opredelili smo atopijski status bolnikov, na podlagi pozitivnih kožnih testov za standardno evropsko serijo, ki vključuje naslednje alergene: lešnik (*Corylus avellana*), jelšo (*Alnus incana*), brezo (*Betula alba*), platano (*Platanus vulgaris*), cipreso (*Cupressus sempervirens*), mešanico trav (*Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Festuca pratensis*, *Helictotrichon pratense*), olivo (*Olea europaea*), artemizijo (*Artemisia vulgaris*), ambrozijo (*Ambrosia artemisiifolia*), plesni (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*), parietario (*Parietaria officinalis*), mačko, psa, hišno pršico *Dermatophagoides pteronyssinus*, pršico *Dermatophagoides farinae* in ščurka (*Blattella germanica*) ali na podlagi prisotnosti specifičnih protiteles IgE, ki so bili določeni v primeru suma na specifično preobčutljivost pri bolniku. Pri večini bolnikov so bile opravljene meritve pljučnega delovanja, % predvidene normalne vrednosti FEV1 in % predvidene normalne vrednosti VC ter FEV1/FVC. Nekateri bolniki z astmo so imeli tudi podatke o prisotnosti astme v otroštvu in kajenju.

V kontrolno skupino smo vključili 288 preiskovancev pri katerih je bila izključena astma in druge alergijske bolezni. Pri preiskovancih je bila kri za izolacijo DNA odvzeta v epruveto z dodatkom EDTA ali je bil odvzet bris ustne sluznice.

3.1.3 Povezava SNP-jev v genu *VEGFA* z odzivom otrok na zdravljenje astme

V farmakogenetski del raziskave, v kateri smo proučevali SNP-ja rs2146323 in rs833058, ki se nahajata v genu *VEGFA*, smo vključili 131 slovenskih otrok z astmo. Vsem smo izmerili pljučno delovanje, opravili so bronhoprovokacijski test z metaholinom, ki je bil merilo za diagnozo astme in merjenje izdihanega frakcijskega dušikovega oksida v izdihanem zraku. Ta del raziskave je bil zasnovan prospektivno, pri čemer smo spremljali odziv na zdravljenje astme. Del otrok je bil zdravljen z inhalacijskim kortikosteroidom (IK) flutikazon propionatom, drugi del pa z antagonistom receptorjev za levkotriene (LTRA) montelukastom.

V skupino otrok zdravljenih z IK je bilo vključenih 40 otrok. Otroci mlajši od 7 let so prejeli 250 µg IK na dan, otroci starejši od 7 let pa 400 µg IK na dan. V skupino otrok, ki so redno prejeli LTRA je bilo vključenih 47 otrok. Otroci mlajši od 12 let so prejeli 5 mg LTRA na dan, starejši so prejeli 10 mg LTRA na dan. V tretjo skupino otrok, ki so prejeli LTRA le po potrebi oziroma ob nastanku simptomov

astme je bilo vključenih 44 otrok. Terapijo so prejeli zvečer, najmanj 7 dni oziroma do prenehanja simptomov astme in maksimalno 20 dni.

Da bi lahko ocenili izboljšanje pljučnega delovanja smo določili % predvidene normalne vrednosti FEV1 in razmerje FEV1/FVC. Prvo merjenje pljučnega delovanja je potekalo pred uvedbo zdravljenja oziroma, ko so bili bolniki vsaj en mesec brez terapije. Drugo in tretje merjenje pljučnega delovanja smo izvedli po šestih in 12 mesecih zdravljenja. Poleg merjenja pljučnega delovanja so otroci s pomočjo staršev izpolnili tudi vprašalnik, test ACT, na podlagi katerega smo ovrednotili urejenost astme ob prejetju terapije. Če so bile točke testa ACT vsaj enkrat v 12 mesecih pod 20 je bila astma neurejena, v nasprotju je bila astma dobro urejena, če so bile točke testa ACT ves čas nad 20. Pri preiskovancih je bila kri za izolacijo DNA odvzeta v epruveto z dodatkom EDTA.

3.2 IZOLACIJA DNA

DNA smo izolirali iz vzorca krvi, ki je bila odvzeta v epruveto z dodatkom EDTA ali pa iz brisa ustne sluznice s kompletom reagentov QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca.

3.3 OBLIKOVANJE TESTOV ZA GENOTIPIZACIJO SNP-jev

Testi, ki omogočajo genotipizacijo z metodo alelna diskriminacije, po postopku proizvajalca Applied Biosystems (Foster City, CA), so za veliko število SNP-jev že pripravljeni v obliki pre-designed SNP Genotyping Assay-jev. Za nekatere izmed SNP-jev, ki smo jih želeli analizirati v drugem delu naše raziskave pred-pripravljeni testi še niso bili na voljo, zato smo jih oblikovali po sledečem protokolu.

1. Iz zbirke dbSNP smo pridobili zaporedje DNA, ki obdaja SNP, ki smo ga želeli analizirati in sicer vsaj 300 bp na vsako stran (Sherry in sod., 2001).
2. V tem zaporedju smo v zbirki dbSNP Blast poiskali morebitne SNP-je, ki bi lahko motili naleganje sond ali začetnih oligonukleotidov (Sherry in sod., 2001).
3. Sonde in začetni oligonukleotidi ne smejo nalegati na ponovljiva zaporedja, zato smo le-ta izključili (RepeatMasker, 2012; Smit in Hubley, 2008–2015).
4. Vsa mesta zaporedja, ki so bila neustrezna za naleganje sond ali začetnih oligonukleotidov, na podlagi zgornjih kriterijev smo spremenili v črko N. Primer je prikazan spodaj.
5. Preostala mesta so bila primerna za oblikovanje sond in začetnih oligonukleotidov in ta so uporabili pri Applied Biosystems za oblikovanje testa.

Primer pripravljenega zaporedja DNA z izključenimi SNP-ji in ponovljivim delom zaporedja za oblikovanje testa za alelna diskriminacijo pri Applied Biosystems je prikazan spodaj.

skupine. V primeru, da prihaja do odstopanja pri skupini bolnikov, je odstopanje lahko posledica močne povezave SNP-ja z boleznijo (Li in Li, 2008).

3.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Pri primerjavi kvantitativnih podatkov, kot so % predvidene normalne vrednosti FEV1, % predvidene normalne vrednosti VC, FEV1/FVC, točk ACT in drugih smo najprej ovrednotili njihovo razporejenost z uporabo D'Agostino & Pearson-ovega testa. V primeru, da so bili podatki razporejeni normalno smo uporabili parametrične statistične teste. Za primerjavo podatkov za različne genotipe smo uporabili neparni t-test, kadar pa smo želeli primerjati parne podatke (pred in po uvedbi zdravljenja) smo uporabili parni t-test. Pri primerjavi več kot dveh skupin kvantitativnih podatkov smo uporabili Kruskal-Wallis-ov test. V primeru, da podatki niso bili razporejeni normalno smo uporabili neparametrične statistične teste. Za primerjavo podatkov za različne genotipe smo uporabili Mann-Whitney-jev test, kadar pa smo primerjali parne podatke smo uporabili Wilcoxon-ov test. Izračunali smo vrednosti p.

Za primerjavo opisnih podatkov, kot so astma-zdrav, kajenje-nekajenje, rinitis-brez rinitisa in podobnih smo primerjavo med različnimi genotipi SNP-jev izvedli na podlagi 2×2 kontingenčnih tabel, pri čemer smo v primeru majhnih skupin uporabili Fisher-jev natančni test, v primeru večjih skupin pa test hi-kvadrat. Izračunali smo vrednost p in razmerja obetov (OR) in 95 % intervale zaupanja (CI).

Za statistično značilno smo upoštevali vrednost $p < 0,05$. V primeru analize večjega števila SNP-jev smo izvedli Bonferroni-jev popravek vrednosti p, ki je še sprejeta kot statistično značilna. V drugem delu analize, kjer smo analizirali povezavo 13-ih SNP-jev z različnimi izidi smo izvedli popravek $0,05/13$ in tako je bila kot statistično značilna vrednost upoštevana vrednost $p < 0,004$. Za mejno statistično značilno povezavo smo upoštevali $p < 0,05$.

Statistične analize smo delno izvedli s programom GraphPad PRISM (verzija 5, San Diego, CA).

V drugem delu naše genetske analize zastopanost spola ni bila primerljiva med skupino bolnikov z astmo in kontrolno skupino, zato smo v tem primeru izvedli statistično analizo, ki z logistično regresijo upošteva in izenači neenakovrednosti pri primerjavi dveh skupin. Poleg spola smo uvedli še popravek za starost, saj je bil starostni interval relativno širok. Na podlagi logistične regresije smo izračunali popravljeno vrednost p. Popravke smo izvedli s programom SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL) in spletnim orodjem SNPStats (Solé in sod., 2006). S pomočjo slednjega smo izvedli tudi analizo haplotipov, saj slednji omogoča izračun posameznih haplotipov na podlagi algoritma največjega pričakovanja (EM-algoritem), kadar faza le-teh ni znana, kot je bilo v našem primeru, kjer smo proučevali nesorodne posameznike. SNPStats omogoča uvedbo

kovariate in tako smo tudi analizo povezave haplotipov s tveganjem za razvoj astme popravili za spol in starost.

3.7 VELIKOST VZORCA

Analizo potrebne velikosti vzorca za genetsko asociacijsko študijo smo izvedli s pomočjo spletnega orodja Genetic power Calculator (Purcell in sod., 2003). Predpostavili smo, da je prevalenca astme 9 %, dovoljena napaka α 5 % in frekvenca rizičnega alela 0,51, kot je bila ugotovljena v naši raziskavi. Potrebno velikost vzorca oziroma statistično moč smo izračunali za različne genetske modele in različne OR-je.

3.8 GENETSKI MODEL

Analizo povezave posameznega SNP-ja z izidom smo izvedli z različnimi genetskimi modeli. Pri dominantnem genetskem modelu smo primerjali homozigote z višjo frekvenco pri astmi kot pri kontrolah v kombinaciji s heterozigoti z drugim homozigotom. Pri recesivnem genetskem modelu smo primerjali homozigota z višjo frekvenco pri astmi kot pri kontrolah z ostalima dvema genotipoma. Pri drugem delu raziskave smo uporabili tudi aditivni genetski model, kjer smo primerjali genotip AA z utežjo 2 v kombinaciji z genotipom Aa z utežjo 1 z genotipom aa.

3.9 BIOINFORMACIJSKA ANALIZA

Za bioinformacijsko analizo SNP-jev smo uporabili različna orodja. Proučevanje funkcionalne vloge SNP-jev, ki so bili povezani oz. mejno povezani z astmo v naši raziskavi je zahtevno, saj se večinoma nahajajo v intergenskih in intronskih območjih. Vloga specifičnega zaporedja DNA je v teh območjih slabo opredeljena. Domnevamo, da imajo ti SNP-ji lahko regulatorno vlogo. Ključen pri raziskovanju teh variant je projekt ENCODE (Encode ..., 2012). Ta je prinesel informacije o odprtih kromatinskih strukturah, za katere so značilna preobčutljivostna mesta za DN-aze I. V teh področjih se nahajajo regulatorna območja, kot so promotorji in ojačevalci prepisovanja. V drugi vrsti je projekt prinesel podatke o vezavi različno modificiranih histonov, kot sta H3K4me1 in H3K4me3, ki se pogosto nahajata v bližini ojačevalcev prepisovanja in promotorjev in podatke o vezavi histona H3K27ac, ki je pogosto prisoten v bližini ojačevalcev prepisovanja. Poleg same strukture kromatina na izražanje genov vpliva tudi vezava različnih proteinov, med katerimi so najpomembnejši različni TF-ji. Iz zbirke UCSC (Kent in sod., 2002) smo pridobili podatke o vezavnih mestih za dejavnik CTCF, ki je TF in lahko deluje kot inzulator ter podatke o vezavi drugih TF-jev. Polimorfizmi lahko spremenijo mesta za vezavo TF-jev, pri čemer se spremeni afiniteta vezave TF-ja ali pa se tvori novo mesto za TF. Sam SNP lahko povzroči spremembo zaporedja, ki več ne omogoča vezave TF-ja. Podatke o tem lahko pridobimo iz zbirke HaploReg v4 (Ward in Kellis, 2012) in Jaspar (Mathelier in sod., 2016). Da bi zajeli še podatke o SNP-jih, ki bi bili lahko povezani z astmo na podlagi LD-ja z analiziranimi,

smo z orodjem SNAP (Johnson in sod., 2008) v analizo vključili še SNP-je z $r^2 > 0,8$ v razdalji 500 kbp iz podatkov Projekta 1000 genomov. Za SNP-je, ki se nahajajo v eksonih smo izvedli še analizo z zbirko PolyPhen (Adzhubei in sod., 2010) in SNPeffect (de Baets in sod., 2011). SNP-je, ki so bili v naši raziskavi povezani oz. mejno povezani z astmo ter njihovo molekularno okolico v območju 500 bp smo analizirali *in silico* s pomočjo zbirke UCSC (Kent in sod., 2002), s katero smo ugotavljali prisotnost otokov CpG, vezavnih mest za mikro RNA (miRNA), majhnih jedrnih RNA (snoRNA), majhnih citoplazemskih RNA (scRNA), TF-je, RNA-polimeraz II (POL2), prisotnost preobčutljivostnih mest za DN-aze I, ojačevalcev prepisovanja, vezavo nukleosoma in drugih elementov, ki bi lahko doprinesli k spremenjenemu izražanju genov. Molekularno okolico z astmo povezanih SNP-jev ter SNP-jev v LD-ju s proučevanimi smo analizirali tudi s pomočjo podatkov iz zbirke Ensembl (Yates in sod., 2016), pri čemer smo uporabili orodje Variant effect predictor. V zbirki HaploReg v4 (Ward in Kellis, 2012) smo preverili ali določen SNP vpliva na regulatorne motive glede na informacije pridobljene iz zbirke eksperimentalnih podatkov ENCODE. Preverjali smo ali SNP vpliva na vezavo ojačevalcev prepisovanja glede na informacije pridobljene iz eksperimentov na 90 različnih celičnih tipih in ali je določen SNP povezan z izražanjem določenega gena (eQTL). Z orodjem RegulomeDB (Boyle in sod., 2012) smo dodatno preverili morebitno prisotnost regulatornih mest, kjer se nahaja proučevan SNP.

4 REZULTATI

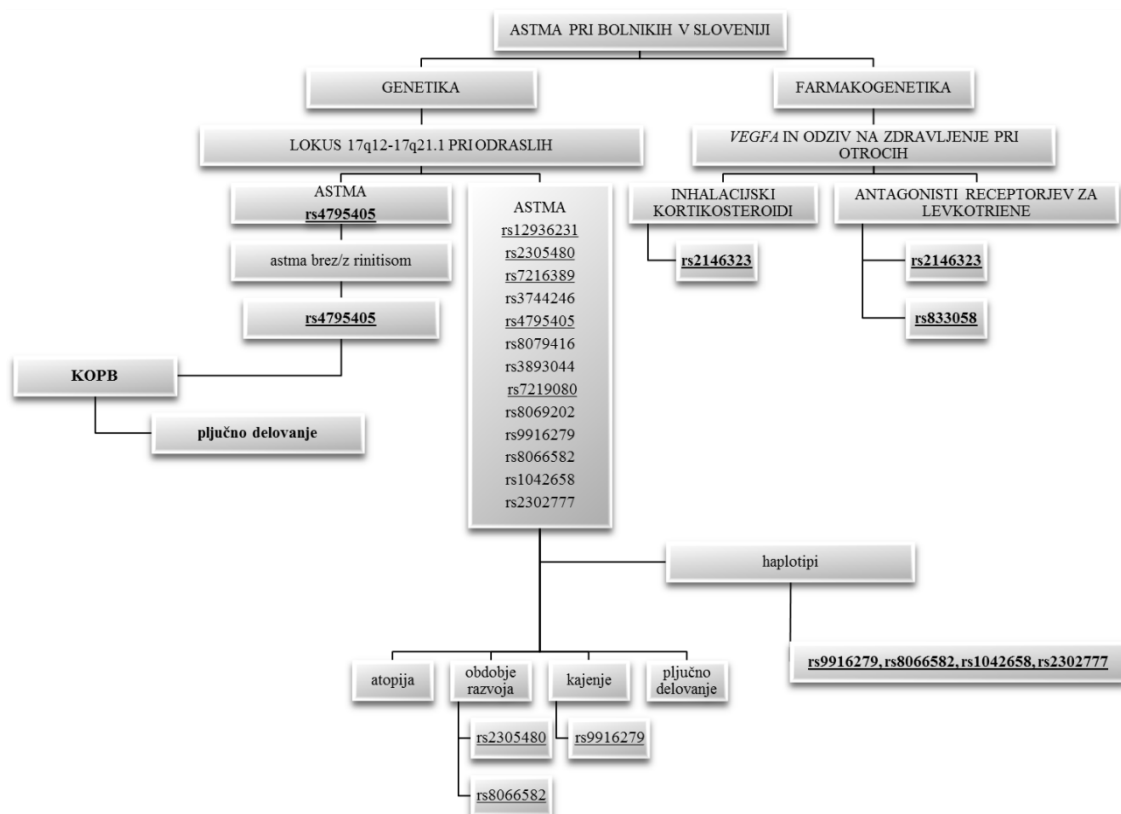
Naše raziskovalno delo je bilo sestavljeno iz treh delov.

V prvem delu raziskave smo ugotavljali ali je SNP rs4795405 povezan z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Preverjali smo tudi ali je ta SNP povezan s specifičnim fenotipom astme, astmo brez pridruženega rinitisa, kot je bilo pokazano v eni izmed naših preteklih raziskav pri otrocih (Kavalar in sod., 2012). V tem delu smo kot prvi ugotavljali ali je SNP rs4795405 povezan tudi s KOPB in pljučnim delovanjem pri bolnikih s KOPB. S tem smo raziskovali ali je rs4795405, ki je bil že v nekaj predhodnih raziskavah povezan z astmo povezan tudi s KOPB.

Ker smo v prvem delu raziskave odkrili povezavo enega SNP-ja, rs4795405, z astmo, smo raziskavo razširili na večji del lokusa 17q12–17q21.1. Na drugi, večji skupini bolnikov smo proučevali povezavo 13-ih SNP-jev z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Hkrati smo z analizo različnih fenotipov astme ugotavljali ali obstaja povezava 13-ih SNP-jev z atopijo pri bolnikih z astmo, pljučnim delovanjem, obdobjem v katerem se astma razvije in kajenjem pri bolnikih z astmo. Poleg proučevanja povezave posameznih SNP-jev smo proučevali tudi povezavo med haplotipi, ki jih tvorijo izbrani SNP-ji in astmo pri odraslih slovenskih bolnikih.

V tretjem delu raziskave smo proučevali farmakogenetsko povezavo dveh SNP-jev, rs2146323 in rs833058, ki se nahajata v genu *VEGFA* z odzivom otrok na zdravljenje z IK in LTRA po šestih in 12 mesecih zdravljenja. Kot kriterij za oceno odziva na zdravljenje smo uporabili spremembi % predvidene normalne vrednosti FEV1 in FEV1/FVC ter urejenost astme po 12 mesecih zdravljenja.

Grafični prikaz rezultatov je predstavljen na sliki 3



Slika 3: Grafični prikaz rezultatov.

Statistično značilne povezave so prikazane krepko in podčrtano. Mejne povezave so prikazane podčrtano.

Figure 3: Graphical summary of the results.

Statistically significant results are shown in bold and are underlined. Marginal associations are shown only underlined.

4.1 POVEZAVA SNP-JA rs4795405, KI SE NAHAJA NAVZGOR OD *ORMDL3* V *RP11-387H17.4*, Z ASTMO PRI ODRASLIH IN KOPB

4.1.1 Preiskovanci

V raziskavo je bilo vključenih 131 odraslih bolnikov z astmo, ki so bili v povprečju stari 50 let, od tega je bilo 43 % moških in 11 % kadilcev. Od 131 odraslih bolnikov z astmo jih je imelo 72 astmo brez pridruženega rinitisa in ti so bili v povprečju stari 51 let, od tega je bilo 43 % moških in 14 % kadilcev. V skupini bolnikov z astmo, ki so imeli pridružen rinitis je bilo 59 bolnikov, ki so bili v povprečju stari 49 let, od tega je bilo 43 % moških in 7 % kadilcev. V kontrolno skupino bolnikov, ki so imeli izključno rinitis je bilo vključenih 59 bolnikov, ki so bili v povprečju stari 48 let, od tega je bilo 48 % moških in 17 % kadilcev. V skupino bolnikov s KOPB je bilo vključenih 133 preiskovancev, ki so bili nekoliko starejši v primerjavi z drugimi skupinami preiskovancev in so imeli v povprečju 64 let, od tega je bil tudi % moških višji kot pri drugih skupinah in sicer 77 %. Vsi vključeni bolniki s KOPB so bili sedanji ali bivši

kadilci. V skupino zdravih kontrol je bilo vključenih 170 preiskovancev, ki so bili v povprečju stari 48 let, od tega je bilo 45 % moških (Preglednica 5).

Preglednica 5: Značilnosti preiskovanih skupin bolnikov in zdravih kontrol.

Table 5: Characteristics of patients and healthy controls.

	Astma	Astma brez rinitisa	Astma z rinitisom	Rinitis	KOPB	Kontrole
Št. preiskovancev, n	131	72	59	59	133	170
Starost, povprečje±SD	50±15	51±15	49±16	48±14	64±8	48±13
Moški, (%)	43	43	43	48	77	45
Kajenje, (%)	11	14	7	17	40 ^a	ni podatka
ITM, povprečje±SD	29±5	29±5	28±5	27±4	27±5	ni podatka

^aPreostalih 60 % bolnikov s KOPB je bilo bivših kadilcev.

KOPB = kronična obstruktivna pljučna bolezen, SD = standardni odklon, ITM = indeks telesne mase

^aThe remaining 60% of COPD patients were former smokers.

KOPB = chronic obstructive lung disease, SD = standard deviation, ITM = body mass index

4.1.2 Asociacijska analiza

Uspešnost določanja genotipov je bila 100 %. Genotipi preiskovancev so bili razporejeni v skladu s HWE. Ugotovili smo, da je rs4795405 statistično značilno povezan z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Frekvenca alela C pri bolnikih z astmo je bila 59 % v primerjavi s kontrolami pri katerih je bila 49 %, kar je statistično značilno različno ($p = 0,017$, OR = 1,50, 95 % CI = 1,08–2,08) (Preglednica 6). Tudi genotip CC je bil pogostejši pri bolnikih z astmo kot pri zdravih kontrolah, a razlika ni bila statistično značilna.

V nadaljnji analizi, kjer smo bolnike z astmo razdelili glede na prisotnost rinitisa, se je izkazalo, da je alel C statistično značilno pogostejši pri skupini bolnikov, ki imajo astmo brez pridruženega rinitisa, saj se je pri njih pojavil v 65 % v primerjavi z bolniki z astmo z rinitisom pri katerih je bila frekvenca alela C 52 % ($p = 0,032$, OR = 1,76, 95 % CI = 1,07–2,89). Izkazalo se je, da je frekvenca alela C pri bolnikih z astmo s pridruženim rinitisom podobna frekvenci pri zdravih kontrolah, kjer je bila 49 % in je zato statistično značilno različna v primerjavi z bolniki z astmo, ki nimajo pridruženega rinitisa ($p = 0,001$, OR = 1,95, 95 % CI = 1,30–2,92) in se hkrati statistično značilno ne razlikuje med bolniki z astmo s pridruženim rinitisom in zdravimi kontrolami (Preglednica 6). Razlike med bolniki z astmo glede na pridružen rinitis so bile še večje ko smo uporabili recesivni genetski model. Rizični genotip CC je bil statistično značilno pogostejši pri bolnikih z astmo brez rinitisa, pri katerih se je pojavil v 44 % v primerjavi z bolniki z astmo z rinitisom, kjer se je pojavil le v 24 % ($p = 0,017$, OR = 2,57, 95 % CI = 1,20–5,49) in v primerjavi z zdravimi kontrolami, kjer se je pojavil v podobnem odstotku kot pri bolnikih z astmo z rinitisom, in sicer v 26 % ($p = 0,006$, OR = 2,29, 95 % CI = 1,29–4,08). Ko smo primerjali frekvence genotipov med bolniki z astmo brez

rinitisa ali z astmo s pridruženim rinitisom in skupino bolnikov, ki imajo izključno rinitis razlik ni bilo (Preglednica 6).

Nadaljnje smo izvedli še asociacijsko analizo med SNP-jem rs4795405 in KOPB. Izkazalo se je, da je tudi KOPB, podobno kot astma, povezan s tem SNP-jem. Alel C je bil statistično značilno pogostejši pri bolnikih s KOPB, pri katerih se je pojavil v 63 % v primerjavi z zdravimi kontrolami, pri katerih se je pojavil v 49 % ($p = 0,001$, $OR = 1,75$, 95 % $CI = 1,26-2,42$). Podobno se je izkazalo tudi za recesivni genetski model, saj smo ugotovili, da je genotip CC s 37 % pogostejši pri bolnikih s KOPB kot pri zdravih kontrolah, pri katerih se je pojavil v 26 % ($p = 0,045$, $OR = 1,67$, 95 % $CI = 1,02-2,37$). Odkrili smo, da je frekvenca alela C statistično značilno različna med bolniki s KOPB, pri katerih se je pojavil v 63 % in bolniki z astmo, ki imajo pridružen rinitis, pri katerih se je pojavil v 52 % ($p = 0,044$, $OR = 1,58$, 95 % $CI = 1,02-2,44$). Nasprotno smo odkrili pri primerjavi frekvenc alelov in genotipov SNP-ja rs4795405 med bolniki s KOPB in bolniki z astmo, ki nimajo pridruženega rinitisa, saj je bila razporeditev pri teh dveh skupinah podobna (Preglednica 6).

Za skupino bolnikov s KOPB smo imeli na voljo tudi klinične podatke o njihovem pljučnem delovanju, zato smo želeli preveriti ali je SNP rs4795405, ki je povezan s KOPB povezan tudi z % predvidene normalne vrednosti FEV1 in % predvidene normalne vrednosti FVC pri bolnikih s KOPB. Izkazalo se je, da je genotip CC, ki je sicer rizičen za KOPB, povezan z boljšim pljučnim delovanjem, saj je bil % predvidene normalne vrednosti FEV1 51 % in % predvidene normalne vrednosti FVC 83% pri bolnikih s KOPB in genotipom CC v primerjavi z 42 % ($p = 0,016$) in 73 % ($p = 0,051$) pri bolnikih s KOPB, ki imajo genotip CT in TT. Te vrste analize pri bolnikih z astmo nismo izvedli zaradi pomanjkanja kliničnih podatkov.

Preglednica 6: Genotipi in aleli SNP-ja rs4795405 pri bolnikih z astmo (s pridruženim rinitisom in brez pridruženega rinitisa), bolnikih, ki imajo izključno rinitis, bolnikih s KOPB in zdravih kontrolah.

Table 6: Genotypes and alleles of rs4795405 in asthma patients (with and without rhinitis), only rhinitis, COPD patients and healthy controls.

rs4795405	Genotip n, (%)		TT	Statistično značilne povezave		Allel n, (%)	Statistično značilne povezave	
	CC	CT		CC vs. CT + TT		C	T	C vs. T
Astma	46 (35)	63 (48)	22 (17)	ni povezave		155 (59)	107 (41)	vs. zdrave kontrole p = 0,017
Astma brez rinitisa	32 (44)	30 (42)	10 (14)	vs. zdrave kontrole	p = 0,006	94 (65)	50 (35)	vs. zdrave kontrole p = 0,001
				vs. astma z rinitisom	p = 0,017			vs. astma z rinitisom p = 0,032
Astma z rinitisom	14 (24)	33 (56)	12 (20)	vs. astma brez rinitisa	p = 0,017	61 (52)	57 (48)	vs. astma brez rinitisa p = 0,032
								vs. KOPB p = 0,044
Zdrave kontrole	44 (26)	79 (46)	47 (27)	vs. astma brez rinitisa	p = 0,006	167 (49)	173 (51)	vs. astma p = 0,017
				vs. KOPB	p = 0,045			vs. astma brez rinitisa p = 0,001
Rinitis	19 (32)	27 (46)	13 (22)	ni povezave		65 (55)	53 (45)	vs. KOPB p = 0,001
								ni povezave
KOPB	49 (37)	69 (52)	15 (11)	vs. zdrave kontrole	p = 0,045	167 (63)	99 (37)	vs. zdrave kontrole p = 0,001
								vs. astma z rinitisom p = 0,044

KOPB = kronična obstruktivna pljučna bolezen, KOPB = chronic obstructive lung disease

4.2 POVEZAVA SNP-JEV LOKUSA 17q12–17q21.1 Z ASTMO PRI ODRASLIH

4.2.1 Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 418 odraslih slovenskih bolnikov z astmo, pri katerih je bila mediana 45 let, od tega je bilo 38 % moških. 59 % bolnikov je imelo atopijsko astmo in pri 17 % se je astma pojavila že v otroštvu. Srednja vrednost % predvidene normalne vrednosti VC je bila 100 % in % predvidene normalne vrednosti FEV1 86 %. Slaba tretjina (30 %) bolnikov z astmo je bilo bivših ali sedanjih kadilcev. V kontrolno skupino je bilo vključenih 288 preiskovancev, pri katerih je bila mediana 44 let, od tega je bilo 54 % moških. Pri kontrolni skupini preiskovancev je bila izključena atopija ali astma v otroštvu (Preglednica 7). Skupini sta se po starosti statistično značilno razlikovali.

Preglednica 7: Klinične značilnosti bolnikov z astmo.

Table 7: Clinical characteristics of asthma patients.

Značilnost	Astma	Manjkajoči podatki	Kontrole
Število preiskovancev, n	418		288
Moški, n (%)	160 (38)	0	155 (54)
Starost, mediana (IQR)	45 (25)	0	44 (29)
Atopija, n (%)	239 (59)	14	0 (0)
% predvidene normalne vrednosti VC, mediana (IQR)	100 (20)	13	ni podatkov
% predvidene normalne vrednosti FEV1, mediana (IQR)	86 (20)	6	ni podatkov
Astma v otroštvu, n (%)	66 (17)	30	0 (0)
Kajenje, n (%)	113 (30)	44	ni podatkov
Eozinofilci %, mediana (IQR)	3,0 (3,8)	284	ni podatkov
Nevtrofilci %, mediana (IQR)	60,9 (12,8)	284	ni podatkov
Limfociti %, mediana (IQR)	26,6 (11,9)	284	ni podatkov
Monociti %, mediana (IQR)	8,1 (3,1)	284	ni podatkov
Bazofilci %, mediana (IQR)	0,4 (0,3)	284	ni podatkov

IQR = interkvartilni razmik, VC = vitalna kapaciteta, FEV1 = prisiljena izdihana prostornina zraka v 1 sekundi izdiha

IQR = interquartile range, VC = vital capacity, FEV1 = forced expiratory volume in 1 second

4.2.2 Asociacijska analiza

V drugem delu raziskave smo želeli analizirati povezavo večih SNP-jev in s tem tudi večjega dela kromosomskega lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Označevalne SNP-je smo izbrali s pomočjo podatkov v zbirki HapMap (The International..., 2007) in orodja Haploview (Barrett in sod., 2005). Pri tem smo nekaj SNP-jev prisilno dodali v izbor, saj so se v preteklih raziskavah izkazali kot najmočnejši

kandidatni SNP-ji, in sicer rs9303277, rs2305480, rs7216389 in rs4795405 (Bouzigon in sod., 2008; Halapi in sod., 2010; Moffatt in sod., 2007), povezani s tveganjem za razvoj astme. Kot omejitev za izbiro označevalnih SNP-jev smo določili, da naj bodo to SNP-ji z minimalno alelna pogostnostjo 10 % v populaciji CEU (podatki temeljijo na genetski analizi oseb z evropskimi koreninami) in naj bo $r^2 > 0,8$ za SNP-je, ki jih označujejo (visok LD). Označevalni SNP-ji, ki smo jih s to analizo določili kot kandidatne za analizo in genotipizacijo so bili rs9303277, rs2305480, rs7216389, rs4795405, rs8079416, rs3894194, rs709592, rs12309, rs4795402, rs1007654, rs8080546, rs4065321 in rs3893044. Iz raziskave smo izvzeli 7 manj informativnih označevalnih SNP-jev, ki niso bili v LD-ju z drugimi SNP-ji. Na ta način bi s 13 SNP-ji zaradi LD-ja uspešno pokrili 53 SNP-jev. S temi 13 SNP-ji bi uspešno pokrili velik interval, saj pokrijejo 250 kbp veliko področje (35170k–35430k) na kromosomu 17q. V drugi stopnji analize, kjer smo vse prvotne kandidatne SNP-je preverili v NCBI-jevi zbirki podatkov dbSNP (Sherry in sod., 2001) se je izkazalo, da so nekateri izmed njih tri- ali štiri-alelni, kar je za SNP-je sicer relativno redko. Za nekatere izmed prvotno izbranih SNP-jev nismo uspeli uspešno oblikovati testov za genotipizacijo z alelna diskriminacijo, saj se nekateri pojavljajo v visoko polimorfnih območjih DNA ali pa jih obdajajo številna ponovljiva zaporedja, ki onemogočajo oblikovanje ustreznih zanesljivih testov za alelna diskriminacijo. Zaradi težavnosti nadaljnje analize in višjih stroškov, ki bi jih prineslo določanje več alelnih SNP-jev ali SNP-jev, ki se nahajajo v problematičnih območjih, smo te zamenjali za običajne bialelne s pomočjo orodja SNAP (Johnson in sod., 2008), ki omogoča iskanje SNP-jev, ki so med seboj v popolnem LD-ju. V preglednici 8 smo navedli zamenjave prvotno izbranih SNP-jev, in kriterija r^2 in D' za populacijo CEU, ki opisujeta vezavno neravnotežje med dvema SNP-jema. Če je r^2 enak ena, razlik v alelnih frekvencah dveh SNP-jev ne bo, če je r^2 enak 0,8 in je frekvenca alela enaka 0,5, potem bo med dvema SNP-jema maksimalna razlika v frekvenci 6 % (Wray, 2005). D' pokaže kolikšna je verjetnost da se dva SNP-ja dedujeta skupaj. Če je D' enak 1, potem se dva SNP-ja vedno dedujeta skupaj. Če sta r^2 in D' približno 1 sta dva SNP-ja enakovredna označevalca.

Preglednica 8: Zamenjava prvotno izbranih SNP-jev in prikaz vrednosti r^2 in D' .

Table 8: Substitutions of initially chosen SNPs with r^2 and D' values.

Prvotno izbran SNP	Zamenjan SNP	Razdalja v bp	r^2	D'
rs8080546	rs9916279	812	1	1
rs4065321	rs8066582	3381	1	1
rs3894194	rs8069202	207	1	1
rs4795402	rs3744246	1035	0,89	1
rs1007654	rs7219080	3162	1	1
rs709592	rs1042658	1651	1	1
rs12309	rs2302777	4030	1	1
rs9303277	rs12936231	52651	1	1

V končni fazi smo za genotipizacijo izbrali SNP-je: rs12936231, ki se nahaja v genu *ZPBP2*, rs2305480 in rs7216389, ki se nahajata v genu *GSDMB*, rs3744246 ter rs4795405, ki se nahajata navzgor od gena *ORMDL3* v genu *RP11-387H17.4*, rs8079416, ki se nahaja navzgor od gena *LRRC3C* v genu *RP11-387H17.4*, rs3893044, ki se nahaja navzdol od gena *LRRC3C*, rs7219080 in rs8069202, ki se nahajata v genu *GSDMA*, rs8066582 in rs9916279, ki se nahajata v genu *PSMD3*, rs1042658, ki se nahaja v genu *CSF3* in rs2302777, ki se nahaja v genu *MED24*. Uspešnost določanja genotipov je bila 100 % in vsi so bili v HWE.

4.2.2.1 Povezava posameznih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih

V prvem koraku smo analizirali povezavo posameznih SNP-jev z astmo, pri čemer so bile vse analize prilagojene za spol in starost. Po popravku vrednosti p , ki je bila upoštevana kot statistično značilna ($p < 0,004$) noben izmed 13-ih SNP-jev ni bil statistično značilno povezan z astmo. Pet SNP-jev je bilo šibko, mejno statistično značilno povezanih z astmo, ob upoštevanju vrednosti p brez Bonferroni-jevega popravka. To so rs12936231 v *ZPBP2*, rs2305480 in rs7216389 v *GSDMB*, rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4* in rs7219080 v *GSDMA* (Preglednica 9).

Preglednica 9: Povezava SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo.
Table 9: Association of 17q12–17q21.1 polymorphisms with asthma risk.

dbSNP	Gen	Alel 1/2	Asthma, genotip n (%)			Kontrola, genotip n (%)			Prilagojena vrednost p ^a , OR (95% CI) ^b		
			MAF	1/1	1/2	2/2	MAF	1/1		1/2	2/2
rs12936231	ZBP2	C/G	0,46	118 (28)	212 (51)	88 (21)	0,48	69 (24)	140 (49)	79 (27)	0,019, 1,54 (1,07–2,19) ^D 0,015, 1,31 (1,05–1,63) ^A
rs2305480	GSDMB	A/G	0,42	72 (17)	205 (49)	141 (34)	0,47	65 (23)	141 (49)	82 (28)	0,036, 1,11 (1,00–1,22) ^D 0,016, 1,31 (1,05–1,63) ^A
rs7216389	GSDMB	C/T	0,46	90 (22)	206 (49)	122 (29)	0,48	80 (28)	137 (48)	71 (25)	0,024, 1,12 (1,01–1,21) ^D 0,016, 1,30 (1,05–1,61) ^A
rs3744246	5' od ORMDL3, v RP11-387HI7.4	C/T	0,17	294 (70)	109 (26)	15 (4)	0,16	205 (71)	74 (26)	9 (3)	NS
rs4795405	5' od ORMDL3, v RP11-387HI7.4	C/T	0,41	144 (34)	204 (49)	70 (17)	0,46	86 (30)	137 (48)	65 (23)	0,028, 1,54 (1,05–2,26) ^D 0,022, 1,29 (1,04–1,60) ^A
rs8079416	5' od LRR3C, v RP11-387HI7.4	C/T	0,45	81 (19)	216 (52)	121 (29)	0,43	51 (18)	143 (50)	94 (33)	NS
rs3893044	3' od LRR3C	C/T	0,44	131 (31)	206 (49)	81 (19)	0,46	78 (27)	156 (54)	53 (18)	NS
rs7219080	GSDMA	A/C	0,35	57 (14)	181 (43)	180 (43)	0,41	42 (15)	151 (52)	95 (33)	0,004, 1,60 (1,17–2,21) ^R 0,018, 1,31 (1,05–1,64) ^A
rs8069202	GSDMA	A/G	0,46	89 (21)	209 (50)	120 (29)	0,43	52 (18)	144 (50)	92 (32)	NS
rs8066582	PSMD3	C/T	0,43	131 (31)	212 (51)	75 (18)	0,43	94 (33)	141 (49)	53 (18)	NS
rs9916279	PSMD3	C/T	0,16	12 (3)	108 (26)	298 (71)	0,14	6 (2)	70 (24)	212 (74)	NS
rs1042658	CSF3	C/T	0,35	173 (41)	194 (46)	51 (12)	0,32	134 (47)	121 (42)	33 (11)	NS
rs2302777	MED24	A/G	0,42	145 (35)	197 (47)	76 (18)	0,43	94 (33)	143 (50)	51 (18)	NS

MAF = frekvenca redkejšega alela, NS = ni povezave. ^aVrednost p prilagojena za spol in starost z logistično regresijo. ^bD - dominantni genetski model, R - recesivni genetski model, A - aditivni genetski model
MAF = minor allele frequency, NS = non-significant. ^aSex and age adjusted p value. ^bD – dominant genetic model, R – recessive genetic model, A – additive genetic model

4.2.2.2 Povezava posameznih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 s fenotipi astme pri odraslih

V drugem delu naše raziskave smo proučevali povezavo 13-ih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 s specifičnimi fenotipi astme in sicer, astmo, ki se razvije že v otroštvu, atopijsko astmo, pljučnim delovanjem in okoljskim dejavnikom, kajenjem, pri bolnikih z astmo. Noben izmed 13-ih analiziranih SNP-jev ni bil statistično značilno povezan s fenotipi astme. Dva izmed proučevanih SNP-jev sta bila šibko oz. mejno povezana z razvojem astme v otroštvu (Preglednica 10). En SNP je bil šibko oz. mejno povezan s kajenjem pri bolnikih z astmo (Preglednica 11).

Preglednica 10: Povezava med SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1 in astmo v otroštvu.

Table 10: Associations between 17q12–17q21.1 SNPs and childhood asthma onset.

		Astma, ki se razvije v otroštvu,				Astma, ki se razvije v odrasli dobi,			
		genotip n (%)				genotip n (%)			
Alel									Prilagojena vrednost p ^a ,
dbSNP	Gen	1/2	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	OR (95% CI) ^b
rs2305480	<i>GSDMB</i>	A/G	8 (12)	28 (42)	30 (45)	59 (18)	161 (50)	102 (32)	0,045, 1,80 (1,05–3,08) ^R 0,022, 1,63 (1,06–2,50) ^A
rs8066582	<i>PSMD3</i>	C/T	20 (30)	27 (41)	19 (29)	101 (31)	168 (52)	52 (16)	0,024, 2,05 (1,12–3,88) ^R

^aVrednost p prilagojena za spol in starost z logistično regresijo.

^bR - recesivni genetski model, A - aditivni genetski model

^aP value adjusted for sex and age.

^bR - recessive genetic model, A - additive genetic model

Preglednica 11: Povezava med SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1 in kajenjem pri bolnikih z astmo.

Table 11: Association between 17q12–17q21.1 SNP and smoking in asthma patients.

		Astatiki kadilci				Astatiki nekadilci,				
		genotip n (%)				genotip n (%)				
		Alel								Prilagojena vrednost p ^a ,
dbSNP	Gen	1/2	1/1	1/2	2/2	1/1	1/2	2/2	OR (95% CI) ^b	
rs9916279	PSMD3	C/T	6 (5)	38 (34)	68 (61)	6 (2)	58 (22)	198 (76)	0,005, 1,98 (1,23–3,20) ^D	
									0,004, 1,82 (1,21–2,73) ^A	

^aVrednost p prilagojena za spol in starost z logistično regresijo.

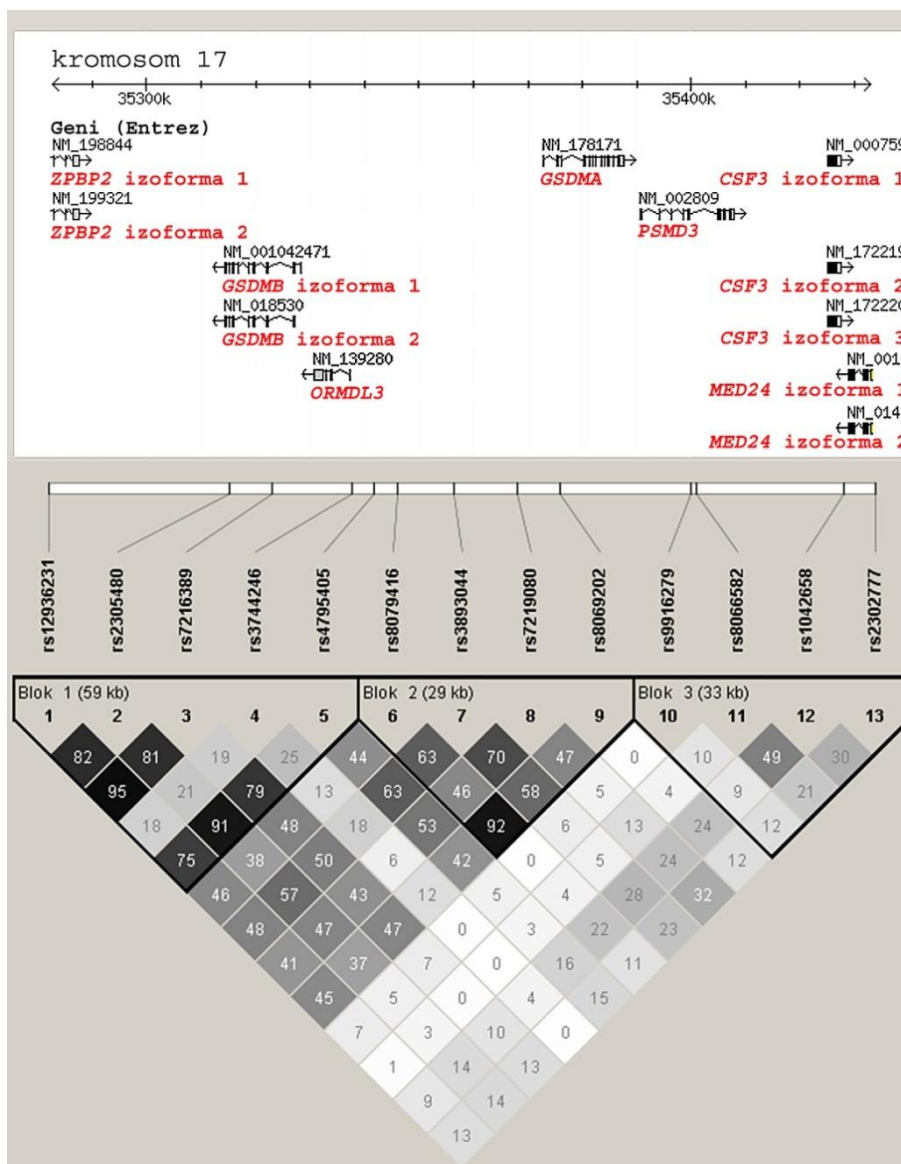
^bD - dominantni genetski model, A - aditivni genetski model

^aP value adjusted for sex and age.

^bD - dominant genetic model, A - additive genetic model

4.2.2.3 Povezava haplotipov lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih

Poleg analize povezave posameznih SNP-jev smo analizirali tudi povezavo haplotipov z astmo pri odraslih. Trinajst proučevanih SNP-jev tvori tri haplotipne bloke, ki smo jih identificirali s pomočjo programa Haploview (Slika 4). Tudi pri delu analize je bila izvedena logistična regresija, ki omogoča prilagoditev za spol in starost.



Slika 4: Bloki haplotipov, ki jih sestavljajo analizirani SNP-ji in prikaz vezavnega neravnotežja z vrednostmi r^2 . Vezavno neravnotežje pada z bledenjem sive barve.

Figure 4: Haplotype blocks and pairwise linkage disequilibrium (LD) expressed as r^2 between the investigated 17q12–17q21.1 SNPs. Shading represents magnitude of the pairwise r^2 , which decreases with lighter color.

Prvi haplotipni blok je sestavljen iz SNP-jev rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246 in rs4795405. Nahaja se v območju genov *ZBP2*, *GSDMB*, *ORMDL3* in *RP11-387H17.4*, ter se razteza preko 59 kbp zaporedja. Sestavljen je iz štirih SNP-jev, ki so pri analizi posameznih SNP-jev nakazovali povezavo z astmo in rs3744246, ki pri analizi posameznih SNP-jev ni bil niti mejno povezan z astmo. Haplotipe s frekvenco < 1 % pri obeh skupinah smo izključili iz analize. Povezave haplotipov, ki jih sestavljajo navedeni SNP-ji, z astmo ni bilo (Preglednica 12).

Preglednica 12: Povezava haplotipov (rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246, rs4795405) lokusa 17q12–17q21.1 z astmo.

Table 12: Association of 17q12–17q21.1 haplotypes (rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246, rs4795405) with asthma.

rs12936231	rs2305480	rs7216389	rs3744246	rs4795405	Astma n (%)	Kontrole n (%)	OR (95% CI)	Prilagojena vrednost p ^a
C	G	T	C	C	212 (50,7)	152 (52,6)	1	---
G	A	C	C	T	112 (26,8)	70 (24,3)	1,42 (1,10–1,83)	NS ^b
G	A	C	T	T	65 (15,6)	45 (15,7)	1,19 (0,87–1,63)	NS
G	G	C	C	C	17 (4,1)	11 (4,0)	1,29 (0,73–2,26)	NS
G	A	C	C	C	5 (1,3)	4 (1,6)	0,65 (0,22–1,87)	NS

^a Vrednost p prilagojena za spol in starost z logistično regresijo.

^b NS - ni statistično značilnih razlik

^c Krepko so prikazani aleli, ki so bili pri analizi posameznih SNP-jev mejno povezani z astmo.

Haplotipi s frekvenco < 1 % v obeh skupinah so bili izključeni iz analize (sedem bolnikov z astmo in šest kontrol).

^aP value adjusted for sex and age.

^bNS - non-significant

^c Alleles that were marginally associated with asthma in single SNP analysis are shown in bold.

Rare haplotypes with frequency < 1% in both groups were excluded from the analysis (seven patients in asthma group and six patients in control group).

Drugi haplotipni blok, ki se razteza preko 29 kbp zaporedja DNA in je sestavljen iz SNP-jev rs8079416, rs3893044, rs7219080 in rs8069202, ki se nahajajo v območju genov *LRRC3C* in *GSDMA*, ni bil povezan z astmo pri odraslih (podatki niso prikazani).

Tretji blok haplotipov je sestavljen iz štirih SNP-jev rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777. Nahaja se v območju genov *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*. Haplotipi tretjega bloka, ki zajema 33 kbp dolgo zaporedje, so bili močno povezani z astmo pri odraslih, kljub temu, da povezave s posamezni SNP-ji tega haplotipnega bloka z astmo pri odraslih nismo našli (Preglednica 13).

Haplotipni blok 3 sestavlja osem haplotipov s frekvenco večjo od 1 % pri obeh skupinah. Haplotipe s frekvenco < 1 % pri obeh skupinah smo izključili iz analize. V nadaljevanju so rezultati povezave haplotipov z astmo pri odraslih predstavljeni v zaporedju SNP-jev, ki je v skladu z njihovim položajem na zaporedju DNA in sicer rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777. Haplotip z največjo frekvenco TCCG je bil pogostejši pri odraslih bolnikih z astmo v primerjavi s kontrolno skupino, saj se je pri bolnikih z astmo pojavil v 40,1 % v primerjavi z zdravimi, pri katerih se je pojavil v 27,6 %. Štirje haplotipi z največjo frekvenco - TCCG, TTTA, CCCA in TTCA so bili pogostejši pri skupini bolnikov z astmo. Štirje najredkejši haplotipi TTCG, TCCA, TCTA in TTTG so se pogostejše pojavili v skupini kontrol v primerjavi z bolniki z astmo. Opazili smo tudi zanimiv vzorec pojavljanja haplotipov, ki jasno ločuje med bolniki z astmo in kontrolami in sicer, je imelo le 3 % bolnikov z astmo haplotipe TTCG, TCCA, TCTA in TTTG v primerjavi s skoraj tretjino (31 %) kontrol.

Vse primerjave zastopanosti haplotipov v skupini bolnikov z astmo in skupini kontrol smo izvedli glede na pojavnost haplotipa z največjo frekvenco - TCCG. Trije haplotipi so bili statistično značilno povezani z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Haplotip TTCG je imelo le 0,6 % bolnikov z astmo v primerjavi z 12,2 % kontrol ($p < 0,0001$, OR = 12,32, 95 % CI = 4,39–34,58). Podobno je imelo haplotip TCCA le 0,3 % bolnikov z astmo v primerjavi z 9,5 % kontrol ($p = 0,0001$, OR = 11,58, 95 % CI = 3,43–39,12). Haplotip TCTA je imelo le 0,6 % bolnikov z astmo v primerjavi s 7,1 % kontrol ($p = 0,0001$, OR = 8,15, 95 % CI = 2,87–23,15) (Preglednica 13).

Preglednica 13: Povezava haplotipov (rs9916279, rs8066582, rs1042658, rs2302777) lokusa 17q12–17q21.1 z astmo.

Table 13: Association of 17q12–17q21.1 haplotypes (rs9916279, rs8066582, rs1042658, rs2302777) with asthma.

rs9916279	rs8066582	rs1042658	rs2302777	Astma n (%)	Kontrole n (%)	OR (95% CI)	Prilagojena vrednost p ^a
T	C	C	G	167 (40,1)	79 (27,6)	1,00	—
T	T	T	A	141 (33,8)	65 (22,7)	0,92 (0,68–1,24)	NS ^b
C	C	C	A	66 (15,7)	38 (13,0)	0,88 (0,61–1,27)	NS
T	T	C	A	33 (7,8)	12 (4,1)	0,66 (0,38 – 1,16)	NS
T	T	C	G	2 (0,6)	35 (12,2)	12,32 (4,39–34,58)	<0,0001
T	C	C	A	1 (0,3)	27 (9,5)	11,58 (3,43–39,12)	0,0001
T	C	T	A	3 (0,6)	20 (7,1)	8,15 (2,87–23,15)	0,0001
T	T	T	G	4 (1,0)	8 (2,7)	1,98 (0,89–4,40)	NS

^a Vrednost p prilagojena za spol in starost z logistično regresijo.

^b NS - ni statistično značilnih razlik

Haplotipi s frekvenco < 1 % v obeh skupinah so bili izključeni iz analize (en bolnik z astmo in tri kontrole).

^aP value adjusted for sex and age.

^bNS - non-significant

Rare haplotypes with frequency < 1% in both groups were excluded from the analysis (one patient in asthma group and three patients in control group).

4.2.2.4 Velikost vzorca in statistična moč

Statistično moč smo izračunali z orodjem Genetic Power Calculator. Izkazalo se je, da ob analizi vzorca z vključenimi 418 bolniki in 288 kontrolami lahko dosežemo 97 % moč ob 51 % frekvenci rizičnega alela, kakršna je bila najnižja frekvenca rizičnega alela v naši raziskavi (z večanjem frekvence raste tudi moč) ob uporabi dominantnega genetskega modela, če je OR 2,0 in prevalenca bolezni 9 %. Če OR pade na 1,5, pade tudi statistična moč na 65 %. Z 418 vključenimi bolniki smo z 80 % statistično močjo lahko zaznali OR 1,6. Pri OR-ju 1,1 je statistična moč le še 9 %. Z našo velikostjo vzorca in OR-jem 1,5 je bil statistična moč ob uporabi recesivnega genetskega modela skromna, in sicer le 12 %.

4.3 POVEZAVA SNP-JEV V GENU *VEGFA* Z ODZIVOM OTROK NA ZDRAVLJENJE ASTME

4.3.1 Preiskovanci

V farmakogenetski del raziskave astme smo vključili 131 otrok z astmo, ki so bili v povprečju stari 12 let, od tega je bilo 56 % fantov. Otroci z astmo so bili zdravljeni na tri načine. V tem delu raziskave smo proučevali izboljšanje pljučnega delovanja in urejenost astme pri otrocih z astmo, ki so bili 12 mesecev zdravljeni, bodisi z IK, bodisi redno ali po potrebi z LTRA. Skupine se pred uvedbo zdravljenja niso razlikovale glede na pljučno delovanje. Otroci, ki so bili v skupini zdravljenih z IK so imeli večjo preodzivnost dihalnih poti glede na metaholinski test, nekaj manjšo so imeli otroci, ki so bili redno zdravljeni z LTRA in najmanjšo otroci, ki so bili zdravljeni z LTRA po potrebi. Skupina otrok, ki je bila zdravljena z IK je imela največji izdihan FeNO v primerjavi s skupinama otrok, ki so bili zdravljeni z LTRA.

V prvi skupini je bilo 40 otrok z astmo zdravljenih z IK flutikazon propionatom, ki so bili v povprečju stari 12 let, od tega je bilo 50 % fantov. Pred zdravljenjem so imeli % predvidene normalne vrednosti FEV1 97 %, po 6 mesecih zdravljenja so imeli izboljšanje % predvidene normalne vrednosti FEV1 za 3 % in po 12 mesecih so imeli izboljšanje % predvidene normalne vrednosti FEV1 za 5 % glede na izhodnega. Otroci, ki so bili zdravljeni z IK so imeli pred zdravljenjem razmerje FEV1/FVC 88 %, po 6 mesecih zdravljenja ni bilo opaziti izboljšanja s povprečnim povečanjem FEV1/FVC za 2 %, po 12 mesecih zdravljenja ni bilo sprememb v FEV1/FVC glede na izhodnega. Večina otrok, ki so bili zdravljeni z IK, 70 %, je imela po 12 mesecih urejeno astmo (Preglednica 14).

V drugi skupini je bilo 47 otrok z astmo redno zdravljenih z LTRA montelukastom, ki so bili v povprečju stari 11 let, od tega je bilo 53 % fantov. Pred zdravljenjem so imeli % predvidene normalne vrednosti FEV1 97 %, po 6 oz. 12 mesecih zdravljenja ni bilo izboljšanja v % predvidene normalne vrednosti FEV1 glede na izhodnega. Otroci, ki so bili redno zdravljeni z LTRA so imeli pred zdravljenjem razmerje FEV1/FVC 89%, po 6 mesecih oz. 12 mesecih zdravljenja ni bilo opaziti izboljšanja. Večina otrok, ki so bili redno zdravljeni z LTRA, 85 %, je imela po 12 mesecih urejeno astmo (Preglednica 14).

V tretji skupini je bilo 44 otrok z astmo zdravljenih z LTRA montelukastom po potrebi oziroma ob nastanku simptomov astme, ki so bili v povprečju stari 12 let, od tega je bilo 66 % fantov. Pred zdravljenjem so imeli % predvidene normalne vrednosti FEV1 97 %, po 6 oz. 12 mesecih zdravljenja ni bilo izboljšanja v % predvidene normalne vrednosti FEV1 glede na izhodnega. Otroci, ki so bili zdravljeni z LTRA po potrebi so imeli pred zdravljenjem razmerje FEV1/FVC 90 %, po 6 oz. 12 mesecih zdravljenja ni bilo opaziti izboljšanja glede na izhodnega. Večina otrok, ki so bili zdravljeni z LTRA po potrebi, 82 % je imelo po 12 mesecih urejeno astmo (Preglednica 14).

Po 12 mesecih zdravljenja se je pljučno delovanje izboljšalo le pri otrocih z astmo, ki so prejeli IK, saj so imeli le ti statistično značilno izboljšanje % predvidene normalne vrednosti FEV1 ($p = 0,0002$). Bolniki, ki so prejeli LTRA redno niso kazali statistično značilnega izboljšanja pljučnega delovanja ($p = 0,376$), podobno se je izkazalo tudi pri bolnikih, ki so prejeli LTRA po potrebi ($p = 0,290$). Urejenost astme po 12 mesecih zdravljenja se med tremi načini zdravljenja ni razlikovala ($p = 0,203$) (Preglednica 14).

Preglednica 14: Klinične značilnosti bolnikov z astmo.

Table 14: Clinical details of patients with asthma.

Značilnost	Vsi bolniki	IK	LTRA, redno	LTRA, po potrebi	Vrednost p^b
Število preiskovancev, n	131	40	47	44	
Starost, povprečje $\pm$ SD	12 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3	
Moški, n (%)	74 (56)	20 (50)	25 (53)	29 (66)	
PC20 (mg/ml), mediana (IQR)	0,26 (0,73)	0,14 (0,21)	0,26 (0,62)	0,83 (1,11)	< 0,0001
FeNO (ppb), mediana (IQR)	34 (11)	51 (62)	35 (37)	27 (28)	0,005
% predvidene normalne vrednosti FEV1 pred zdravljenjem, mediana (IQR)	97 (14)	97 (16)	97 (15)	97 (14)	0,612
Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1 po 6 mesecih zdravljenja, mediana (IQR)	1 (10)	3 (11)	0 (11)	-1 (12)	0,459
Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1 po 12 mesecih zdravljenja, mediana (IQR) ^a	3 (12)	5 (9)*	0 (15)**	1 (14)***	0,212
FEV1/FVC pred zdravljenjem, mediana (IQR)	89 (8)	88 (9)	89 (5)	90 (9)	0,173
Sprememba FEV1/FVC po 6 mesecih zdravljenja, mediana (IQR)	1 (6)	2 (8)	1 (6)	0 (5)	0,235
Sprememba FEV1/FVC po 6 mesecih zdravljenja, mediana (IQR)	1 (7)	0 (10)	1 (8)	0 (7)	0,832
Urejena astma, n (%)	104 (79)	28 (70)	39 (85)	37 (82)	0,203

PC20 = prejeta doza metaholina, pri kateri se FEV1 zniža za 20 % izhodne vrednosti, IQR = interkvartilni razmik, FeNO = izdihan dušikov oksid, SD = standardni odklon, FEV1 = prisiljena izdihana prostornina zraka v 1 sekundi izdiha, FVC = prisiljena vitalna kapaciteta, IK = inhalacijski kortikosteroid, LTRA = antagonist receptorjev za levkotriene

Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1 po 12 mesecih zdravljenja glede na vrednost pred uvedbo zdravljenja je bila statistično primerjana z Wilcoxon-ovim testom ($p = 0,0002$, ** $p = 0,376$, *** $p = 0,290$).

PC20 = concentration of methacholine causing a 20% fall in FEV1, IQR = interquartile range, FeNO = fractional exhaled nitric oxide, SD = standard deviation, FEV1 = forced expiratory volume in 1 second, FVC = forced vital capacity, IK = inhaled corticosteroid, LTRA = leukotriene receptor antagonist

Change from baseline in %predicted FEV1 after 12 months of treatment for each therapy was statistically compared with paired Wilcoxon test ($p = 0.0002$, ** $p = 0.376$, *** $p = 0.290$).

4.3.2 Asociacijska analiza

V farmakogenetskem delu raziskave astme smo analizirali izboljšanje pljučnega delovanja in urejenost astme glede na genotipe SNP-jev rs2146323 in rs833058 v genu *VEGFA* po zdravljenju z IK ali LTRA, redno in po potrebi. Izkazalo se je, da je odziv otrok na zdravljenje povezan s proučevanima SNP-jema pri uporabi obeh preiskovanih terapij. Uspešnost določanja genotipov je bila 100 %. Genotipi preiskovancev so bili razporejeni v skladu s HWE.

Pri asociacijski analizi povezave odziva na zdravljenje z IK se je izkazalo, da je odziv povezan z genotipom rs2146323 v genu *VEGFA*. Ko smo primerjali dinamiko pljučnega delovanja z merjenjem sprememb v % predvidene normalne vrednosti FEV1 po šestih in 12 mesecih zdravljenja z IK se je izkazalo, da se bolniki z genotipom AA v rs2146323 bolj odzivajo na zdravljenje kot bolniki z genotipom AC in CC.

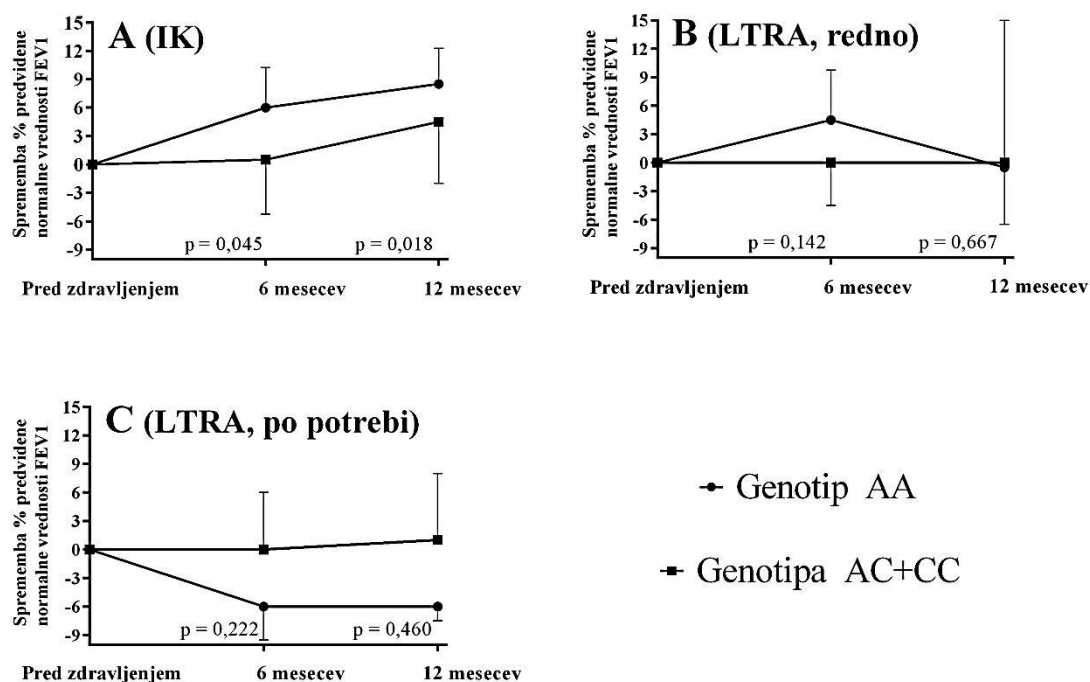
Po šestih mesecih zdravljenja so imeli bolniki z genotipom AA 6 % izboljšanje % predvidene normalne vrednosti FEV1 v primerjavi z bolniki z genotipom AC in CC, ki so imeli le 1 % izboljšanje % predvidene normalne vrednosti FEV1, kar je statistično značilno različno ($p = 0,045$). Po 12 mesecih zdravljenja se je ta razlika še povečala, saj so imeli bolniki z genotipom AA 9 % izboljšanje % predvidene normalne vrednosti FEV1 v primerjavi s 5 % pri bolnikih z genotipom AC in CC ($p = 0,018$) (Preglednica 15, Slika 5). Polimorfizem rs2146323 je bil torej povezan z izboljšanjem pljučnega delovanja pri zdravljenju z IK.

Nasprotno, povezave rs2146323 z izboljšanjem pljučnega delovanja pri bolnikih, ki so bili zdravljeni z LTRA nismo našli. Odkrili smo povezavo med SNP-jem rs2146323 in urejenostjo astme pri bolnikih, ki so prejeli LTRA. Več kot polovica (60 %) bolnikov z genotipom AA v rs2146323, ki so bili redno zdravljeni z LTRA je imela neurejeno astmo po 12 mesecih zdravljenja. Nasprotno je imelo le 10 % bolnikov, ki so imeli genotipe AC in CC in so prejeli enako zdravljenje neurejeno astmo, kar je statistično značilno različno ($p = 0,020$, OR = 0,07, 95 % CI 0,009–0,57). Povezave z urejenostjo astme pri bolnikih, ki so bili zdravljeni z IK ali z LTRA po potrebi in rs2146323 ni bilo (Preglednici 15 in 16).

Drugi proučevan SNP v genu *VEGFA*, rs833058, je bil povezan z odzivom otrok na zdravljenje z LTRA po potrebi. Pri skupini bolnikov, ki so imeli genotip TT je po 12 mesecih zdravljenja z LTRA po potrebi prišlo do izboljšanja pljučnega delovanja, saj se jim je % predvidene normalne vrednosti FEV1 povečal za 9 % v primerjavi z bolniki z genotipi CC in CT, kjer je bilo izboljšanje % predvidene normalne vrednosti FEV1 le 1 % ($P = 0,029$) (Preglednica 15). Povezave z urejenostjo astme po 12 mesecih zdravljenja in rs833058 ni bilo (Preglednica 16).

Po 6 mesecih zdravljenja z LTRA po potrebi so imeli bolniki z genotipom AA v rs2146323 rahlo poslabšanje razmerja FEV1/FVC (-2) v primerjavi z bolniki z genotipi

AC+CC, pri katerih ni bilo sprememb ($p = 0,044$). Po 12 mesecih zdravljenja razlik ni bilo. Drugih povezav med spremembo FEV1/FVC in rs2146323 ter rs833058 nismo našli (podatki niso prikazani).



Slika 5: Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1 po šestih in 12-ih mesecih zdravljenja z inhalacijskim kortikosteroidom (A), antagonistom receptorjev za levkotriene - redno (B) in antagonistom receptorjev za levkotriene - po potrebi (C) glede na genotipe v SNP-ju rs2146323 v genu *VEGFA*.

Figure 5: Change of % predicted FEV1 after 6 and 12 months of treatment with ICS fluticasone propionate (A), regular use of LTRA montelukast (B) and episodic use of LTRA montelukast (C) according to the rs2146323 genotype.

Preglednica 15: Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1 po šestih in 12 mesecih zdravljenja glede na genotipe SNP-jev v genu *VEGFA*.

Table 15: Change in FEV1 - % predicted after 6 and 12 months of treatment according to genotypes in *VEGFA* polymorphisms.

SNP v genu <i>VEGFA</i>	Trajanje zdravljenja v mesecih	rs2146323 Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1		Vrednost p	rs833058 Sprememba % predvidene normalne vrednosti FEV1		Vrednost p
		AA	AC + CC		TT	CT+CC	
IK (flutikazon propionat)	6	6	1	0,045	-2	5	0,058
	12	9	5	0,018	4	6	0,459
LTRA redno	6	5	0	0,142	0	0	0,931
(montelukast)	12	-1	0	0,667	6	-1	0,407
LTRA po potrebi	6	-6	0	0,222	6	-2	0,131
(montelukast)	12	-6	1	0,460	9	1	0,029

IK = inhalacijski kortikosteroid, LTRA = antagonist receptorjev za levkotriene

IK = inhaled corticosteroid, LTRA = leukotriene receptor antagonist

Preglednica 16: Urejenost astme po 12 mesecih zdravljenja glede na genotipe SNP-jev v genu *VEGFA*.

Table 16: Asthma control after 12 months of treatment according to genotypes in *VEGFA* polymorphisms.

SNP v genu <i>VEGFA</i>	Urejenost astme ^a	rs2146323 n, %		Vrednost p	rs833058 n, %		Vrednost p
		AA	AC + CC		TT	CT+CC	
IK (flutikazon propionat)	Urejena	8 (80)	20 (67)	0,693	2 (33)	25 (76)	0,060
	Neurejena	2 (20)	10 (33)		4 (67)	8 (24)	
LTRA redno	Urejena	2 (40)	37 (90)	0,020 (OR 0,07,	5 (100)	34 (83)	1,000
(montelukast)	Neurejena	3 (60)	4 (10)	95% CI 0,009–0,57)	0 (0)	7 (17)	
LTRA po potrebi	Urejena	5 (83)	32 (82)	1,000	2 (50)	35 (85)	0,140
(montelukast)	Neurejena	1 (17)	7 (18)		2 (50)	6 (15)	

IK = inhalacijski kortikosteroid, LTRA = antagonist receptorjev za levkotriene

^a Astma je bila urejena, če so bile točke ACT > 20 in neurejena, če so bile točke ACT < 20.

IK = inhaled corticosteroid, LTRA = leukotriene receptor antagonist

^a Asthma was controlled if ACT scores were >20 or uncontrolled if ACT scores were < 20.

4.4 *IN SILICO* ANALIZA SNP-JEV POVEZANIH Z ASTMO TER NJIHOVE MOLEKULARNE OKOLICE

Polimorfizem rs4795405, 17:g.39932164T>C, se nahaja navzgor od gena *ORMDL3* v intronu 2 gena *RP11-387H17.4*, ki kodira lincRNA, katere biološka vloga še ni opredeljena. LincRNA naj bi imele vlogo pri cis-uravnavanju izražanja bližnjih genov, kar naj ne bi bilo sekvenčno specifično, temveč naj bi lincRNA le pritegnile proteine (TF-je in komplekse za modifikacijo kromatina), ki so potrebni za prepisovanje genov. LincRNA naj bi torej delovale kot ojačevalci transkripcije (Ulitsky in Bartel, 2013).

V okolici rs4795405 so obogatena mesta za vezavo H3K27ac, ki se pogosto nahaja blizu ojačevalcev prepisovanja genov in nakazuje aktivno prepisovanje v tem območju. V pljučih se v območje SNP-ja veže H3K4me1, kar nakazuje, da se sem vežejo ojačevalci prepisovanja. Izkazalo se je, da SNP rs4795405 spremeni regulatorni motiv za vezavo TF-ja jedrnega dejavnika 1 (NF1), ki se veže na motiv TTGGC(N5)GCCAA. Le-ta se lahko veže tudi na polovični motiv 5' TGGCA 3', vendar z manjšo afiniteto. Ker je SNP rs4795405 zamenjava alela T>C, zamenjava povzroči nastanek zaporedja 5' TGGCA 3' na -1 verigi DNA, ki omogoči vezavo TF-ja v primeru, ko je prisoten alel C. Ker se SNP nahaja 5' navzgor od gena *ORMDL3*, bi nastanek novega motiva, ki omogoča vezavo TF-ja lahko privedel do povišanega izražanja gena *ORMDL3*. Polimorfizem rs4795405 je tudi eQTL za gene *GSDMB*, *ORMDL3* in *MED24* v krvi ter eQTL za gena *GSDMA* in *ORMDL3* v pljučih.

Z analizo molekularnega okolja SNP-ja rs4795405 v okviru 500 bp smo ugotovili, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA, scRNA ter tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni prisotnih vezavnih mest za TF-je (z izjemo NF1, ki se lahko veže ko je prisoten alel C), sem se ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V tem območju se nahaja nekaj dinukleotidov CpG, ki so lahko metilirani in bi lahko doprinesli k spremenjenemu izražanju genov, vendar se nobeden ne pojavlja v obliki otokov CpG.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 52 SNP-jev v okviru razdalje 500 kbp. S pomočjo orodja Variant effect predictor smo predvideli možen vpliv teh SNP-jev. Med tiste, ki bi z največjo verjetnostjo lahko prispevali k spremenjenemu izražanju genov se uvršča SNP rs11078928. Nahaja se v genu *GSDMB* in povzroči spremembo akceptorskega mesta za alternativno izrezovanje intronov, kar lahko vodi v nastanek novega transkripta. Poleg tega bi na izražanje genov lahko vplivali še številni drugi SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs4795405 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

CTCAGCCTCC**CG**AGTGGGCTGGGATTACAKGTGCAYGCCACCACATCCAGGTAATTTTTGTATTTTTART
TGAGACAGGGTTTCACCRGTGTGGCCAGGCTGGTTTTGAACTYCTGACTTCAAGTGATCTGCCYACCTTG
GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTTCAGGCATGAGCCACCAC**CG**SCTGGGCTATTTTCTCTACTTTTTTAATGT
TTAAAACTGTTTCATAATAAAAAAGTCTAAACCTGCWTATAYRTTAATGATTAAGATAAGCYAAAATASAGC
AGCACTGGTAACATCCTCTGGCACCAGACTGCCAGGGTTCAACTYGCAGCTCCTCTAGTTACCAGCTGTG
TRACCTTAAGCMAGTTACTGAACCTCTCTGTGCTTCAGTTACCT**CG**TTGC**Y**AAAAGAATTGGCAAGTGAC
ACTGGTGTT**CG**GAAAAAATAAAGTAAATGAAGATGG**CG**ATGATCATGATAATACCCTCCTCATGTTGTGG
ATATTAAATGGGTCAGTAAATGTGAAATGAAACACTCAAAACAATTCCTGGCACATAATTAAGTGCTCAG
TATGTGTTGCYTTTTATTAATTCATTCCACATTTGAATGATRITTTGAGCATCTACTYTAGGTTATGG
AAATTCAACAAAAATAAAAAACAGACCTTGGG**CG**GGCACTGTGGCTCAAGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG
GAAGCTGAGG**CG**GGAGGATTGCTTGASGCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCAACSTAATGWGACCCCCC

Polimorfizem rs2305480, 17:g.39905943A>G, se nahaja v intronu 8 gena *GSDMB* in je nesinonimna zamenjava, ki povzroči zamenjavo aminokisline prolina v serin. Po podatkih baze PolyPhen naj bi bila ta varianta benigne narave in naj ne bi poškodovala strukture proteina *GSDMB*. Polimorfizem rs2305480 se nahaja v območju za vezavo H3K36me3, ki je običajno prisoten pri aktivno prepisovanih genih ter se pogosto nahaja blizu ojačevalcev prepisovanja ali promotorjev. Polimorfizem rs2305480 spremeni motive za vezavo TF-ja BAF155, ki vpliva na preoblikovanje kromatina, s čimer bi lahko vplival na izražanje genov. Alel A povzroči nastanek motiva za vezavo BAF155, medtem ko se v primeru alela G, ta dejavnik ne veže na DNA. Polimorfizem rs2305480 je eQTL za gena *ORMDL3* in *GSDMA* v pljučih ter *GSDMB*, *MED24* in *ORMDL3* v krvi.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja v okviru 500 bp smo ugotovili, da se v bližnji okolici SNP-ja rs2305480 nahajajo številne genetske variante. V analiziranem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter tarčnih mest za regulatorne miRNA in ni prisotnih vezavnih mest za TF-je, z izjemo CTCF. V to območje se ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. 100 bp navzdol od rs2305480 se nahaja območje preobčuljivostnih mest za DN-aze I. V območju SNP-ja so obogatena mesta za vezavo nukleosoma, za to območje je značilna tudi odprta kromatinska struktura. V tem območju ni dinukleotidov CpG.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 79 SNP-jev. Med tiste, ki bi z največjo verjetnostjo lahko prispevali k spremenjenemu izražanju genov se uvršča SNP rs11078928, katerega vloga je opisana zgoraj. Poleg tega bi na izražanje genov lahko vplivali še številni drugi SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs2305480 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja.

CAGRGCCTYAGTGGCTGATCACACCCAGAACATGTATCATCAAAAGGTTCCAGAGAGCCCCCTGSGAGTGC
TRGATGAGACTTACTCCAAACAGGCCTCTGCTKTGACTCCTGCTTCCCTCTTGGCTGCAGGAGTCACAG
ACRAGGAACCAGCCCCCTCAATGCCTGGCCTGASGAAGACATGAAGGARTGCCYCCCATAAACTGTGAASA
GCAACATGCAGCCCCCTCTCCCAAGATGTGACTCCCCACAGGCCTCTCTGCTCACACTTCYTCCACCCCR

GCCTACRGCASAYCCTTCCTYACCTARSAGRGCATCYAGGAARWCCAGAATGGCTTTTRCANRYRCTTC
TACCAARACBCCAGCAGCATTAAAAAGGCTGCTTASGAGAKGCTTKTYTG^RGTCTCCRTGKGTAGCTCC
CYRGAAAYCAGGACCTCAGATACCTAGGGCCAGKAAGTGTRGGAGAYGAGYARCAGTCTCACCATASCAG
ATTATCCTYACTGTGCCAACTGCCATCCYYTCTGGCYCCYMTCTSTCTCTGCCSCAVGGCTTTCTTAGGG
TCCCTTACTCTTTGCTYTAGATBCTGCRYAATATYCTCCTTGCRYRARGCACTTAGYRAGGGAGTTYRGCA
CATCTTYTCTYTTMTYYTCTGTCAGGTYCTTGAGGAYACTCTCCAYGTCTCCAACCTHTCCTTCATGTT
TCTGGAAYCCTCYRMACCCAAAGACTTKCCTGTARAGGCARCARYYGAGAACCTGGGCCRCCCAGMCCAR

Polimorfizem rs7216389, 17:g.39913696T>C, se nahaja v intronu 2 gena *GSDMB*. Polimorfizem rs7216389 se nahaja v območju kamor se veže H3K36me, ki je običajno prisoten ob aktivno prepisovanih genih. V pljučih se rs7216389 nahaja v območju za vezavo H3K27ac, kar nakazuje, da se sem vežejo ojačevalci prepisovanja. Nukleotidna zamenjava alela C v alel T v SNP-ju rs7216389 povzroči izgubo dinukleotida CpG, kar bi lahko privedlo do sprememb v metilaciji in posledično spremenjenemu izražanju gena. Polimorfizem rs7216389 je eQTL za izražanje genov *GSDMA*, *GSDMB* in *ORMDL3* v pljučih ter *IKZF3*, *GSDMB* in *ORMDL3* v krvi.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs7216389 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni prisotnih vezavnih mest za TF-je, z izjemo CTCF. Sem se ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V tem območju se nahajajo preobčuljivostna mesta za DN-aze I. V območju SNP-ja so obogatena mesta za vezavo nukleosoma, za to območje je značilna odprta kromatinska struktura. V tem območju se nahaja nekaj dinukleotidov CpG, ki bi lahko vplivali na izražanje genov.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 78 SNP-jev v okviru razdalje 500 kbp. Med tiste, ki bi z največjo verjetnostjo lahko prispevali k spremenjenemu izražanju genov se uvršča SNP rs11078928, katerega vloga je že opisana. Poleg tega bi k asociaciji lahko doprinesli trije SNP-ji, ki so nesinonimne variante, rs11557467 v genu *ZPBP2* ter rs2305480 in rs2305479 v genu *GSDMB*. Po podatkih baze PolyPhen od teh le rs2305479 verjetno vpliva na strukturo proteina *GSDMB*. Poleg tega bi na izražanje genov lahko vplivali še številni drugi SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs7216389 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

GGAGCCCCAGCCAATTGGGAAATAAAAATTAAGCAGTTYTG^GGGTGGGCA^{CG}GTGGGGTGGCTCACRCCTG
TAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGASGTGGGTAGATCACYTGAGGTCAGGAGTTKGAGACCAWMCTGRCC
AACAYSGTGAAACYCCAYCTCTAC^YAAATTAGTCRGGGTGGTGGCACAKGCCYRTAATTCAGCTACTT
GGGAGGCYGAGGCAGGAGAAT^{CG}CTTGAAYCTGGGAGGCAGAAGCAAAGABTGCAGTGAGCCAAGATCAM
GCCACTGCACTCCAGCCTGGG^{CG}ACAGYGAGACTCCATCTCCAATAAAAGCAGTTYTGT^{CG}CTGTTGTTT
GTATGAACCACACAAGTATGAAGTGAGGCAACCCCTGGAAAGTCACAAACA^YGCATGGACT^{CG}GCCCTGAT
TGATCAGGMACTAATAAGGGCCTTGTTCTGAGTCAGYTGCCACCCCAGGTTTCRTGGAGGATGTGTGGGC

ATGCYRAAGRGGCTGYGTGCCTTTGTCTCCAAYCTCCCAGATGGGAACCTACAGKGGAGGGAGMGCTCYC
ACTGCTAGGTTTTTGGAGGCAGGGCTGGATTTCCAAAGAYAAATCCATTTTGGAACTGGTGGAAATGTGAC
AGAATTAGAAACAGTGACTGAAATCACTATTTGTGTGTACATRAGACACTAATGTCTYARGGACCATTTG
CTTCTTGAGYAGYGTAAAAAGAAAAGAAAAATATCAGAGAGAAAAAGAAAAATAAAACTATGTGCACAAA

Polimorfizem rs12936231, g.39872867G>C, se nahaja v intronu 4 gena *ZBP2*. Je varianta z regulatornim vplivom, saj alel G ustvari vezavno mesto za TF CTCF, ki povzroči nastanek zank DNA in s tem vpliva na vezavo nukleosoma, ki omogoča prepisovanje genov. Na območje, kjer se nahaja rs12936231 se vežejo še naslednji TF-ji: ARID3A, RFX5, RAD21, SMC3, MYC in MAX, ki bi lahko vplivali na prepisovanje bližnjih genov. V to območje se veže H3K27ac. Polimorfizem rs12936231 se nahaja v preobčutljivostnem mestu za DN-aze I. Ti podatki kažejo, da je tu območje z visoko transkripcijsko aktivnostjo. Polimorfizem rs12936231 je eQTL za izražanje genov *GSDMA*, *GSDMB* in *ORMDL3* v pljučih ter *IKZF3*, *GSDMB* in *ORMDL3* v krvi.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs12936231 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju so obogatena mesta za vezavo TF-ja CTCF ter številnih drugih kot so RFX5, RAD21, SMC3, MYC, MAX in REST. Sem se ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V tem območju so obogatena preobčutljivostna mesta za DN-aze I in ni dinukleotidov CpG, ki bi lahko vplivali na izražanje genov.

Z analiziranim SNP-jev je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 78 SNP-jev. Med tiste, ki bi z največjo verjetnostjo lahko prispevali k spremenjenemu izražanju genov se uvršča SNP rs11078928, katerega vloga je že opisana in rs11557467, ki se nahaja v genu *GSDMB* in je nesinonimna zamenjava, vendar je tudi ta SNP po podatkih PolyPhen benigna varianta. Poleg tega bi na izražanje genov lahko vplivali še številni drugi SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs12936231 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja.

GARCTATTTATRGCAATTTCAAGGTAAAAATTTTTRAAATTTCTTTAATTTTSAMTTTARTCCYGAACCATA
ATAGATTACAAAATTACCATATTAATATAAGATATTTTAAAAGTAATAGGTCTTACATGTTTGTAAARCA
CTAAAGTATGTAGTTGACCTTAGCCTGTTYATGGTTTTAAACCTTAACACACTAAYTAATTACTTTCAAA
TATGACATATTGKTGCTTCTTAAAAATCARTATTTTATTAATACAGCCTTYATGCAGCTAATATTTCACT
TATAACTTCTTAYAGAATTTTAAATTGTAYTTTTGAAAACCTTAGTAAAAGTGAATAATCARACCAATTT
AKTTCTATTCATTTTAAAGCCTTGTAGTTACTTACATTAGCCMCCAGATRSRGTGAAACMATCAAGTATA
AATTATTCAAATTTGTGCACCKTGTTTTATTACTAGGATTAGATAGCTGGACTAAACATGTGCCTGCRTGC
ACATGGAATTCAGCACTTGGACCTTTATTGAAATGTYTGGAACCTTYTCASARTYCSTTTGTGARTSTATS
ATTTTTTYTCYSTTCRGTTAATMCTTTKGCKCYRGGTGGAADGTGYTTGCRATKGRCTGTGTGACTGT
GAAGATRCWCATAATCATAATATCYTCCAGGTGAGAATTTMATGGTAAGGAARAWGTDTTTSTCTTTTTM
TTTTTTYASAGACAGGGTGTCACCSAGGCTGGAGTGCAGTGGTGYGACCAYAGCTCACTGCAGCCTSAAA

Polimorfizem rs7219080, 17:g.39958263C>A, se nahaja 5' navzgor od gena *GSDMA*. Je vezavno mesto za TF CTCF. Nahaja se v preobčutljivostnem mestu za DN-aze I. Poleg drugih tkiv se v pljučih v območje, kjer se nahaja SNP rs7219080, vežejo histoni H3K27ac, kar nakazuje na prisotnost ojačevalcev prepisovanja. Polimorfizem rs7219080 spremeni motiv za vezavo TF-ja TEF-1, pri čemer je vezava močnejša v primeru alela C, kar bi lahko doprineslo k povečanem izražanju gena *GSDMA*. Dva SNP-ja, ki sta v LD-ju z rs7219080, rs3902024 in rs56396280, se nahajata v ojačevalcih prepisovanja, SNP rs7212944 pa se nahaja v eksonu gena *GSDMA*, vendar je le-ta po predvidevanju zbirke PolyPhen benigna varianta. Poleg tega bi na izražanje genov lahko vplivali še številni drugi SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Polimorfizem rs7219080 je eQTL za gena *GSDMA* in *ORMDL3* v pljučih, ter gene *GSDMB*, *ORMDL3* in *MED24* v krvi.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs7219080 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni vezavnih mest za TF-je, z izjemo proteina CTCF. Sem se ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V tem območju se nahajajo preobčutljivostna mesta za DN-aze I, obogatena so tudi mesta za vezavo nukleosoma. V tem območju ni dinukleotidov CpG, ki bi lahko vplivali na izražanje genov. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs7219080 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja.

```
GCTGGGAGGATCACCTGACAGAAGAGAGTTCTCTGGGTTTGGGCTGGAGGCTGGCAGTSGCCTCCTTGCC
CAGACAGRGTGATGGGTAGGGGATTGGCAGTGGRGGGGTGGGGGCAGTGAGGGCTGACACCTTGAAGC
TGGATGCTGAGTTTGACACACTTAGAGCTGAACACTGAKGTCTGTTTCAGCCAGAGTCTGGGGAGGTCTTG
GACTCCAAAGCTGATBTGGGAATTTGGGAAGAAACRTTAAAGCTTTTTAGAGAATAAGGAAAGAGTATGG
GAGCTTYACTCTGTTSAGAAAGGAGAATTTATGGAAGKATAGCTCACAATCTATGATCTGCACCSCCAAA
CATYCARCCTCYCAYATGAGAGATAAAACACAGCATCCCTAGGAAGCATTMTTCCTGCRCTCYACCAGG
CAGTCATGCYCCAGCCAGCCTGTCTTCATCCCTAACCATTACCATTCCACCTCCTTTTGYTCAGGGCAG
GTCTGGGAATATGTTTCATGTGAGGGATCACTTCTTGCAAATGCTCCAGTTATCCTGCACCCTTCAAGTAG
GCTCCAAATCCTACAACATTCTCCTTGCCCTCCCACTYGCAGRGTGCYAGCTTCTTCCCATTTCTGGCCA
GAGTTKGTGACTTCCATGAAYRCCCATAATCTACTTTTCTCTGTTTTCTCTGACCCCATGCTGAGGGGGA
AATCAACAATAATAAAAAGGAGGCCAGGCACAGTGGATCACACCTGTAATCCCAGCAATTTGGGAGGCCA
```

Polimorfizem rs9916279, 17:g.39989901T>C, je sinonimna zamenjava v eksonu 5 gena *PSMD3*. Nahaja se v preobčutljivostnem mestu za DN-aze I ter spremeni motiv za vezavo TF-ja SOX10, saj se na zaporedje, ki vključuje alel T SOX10 veže z večjo afiniteto. Polimorfizem rs9916279 je eQTL za izražanje genov *IKZF3*, *GSDMB*, *ORMDL3*, *PSMD3* in *MED24* v krvi. Polimorfizem rs9916279 z zamenjavo alela T z alelom C ustvari nov dinukleotid CpG, s čimer bi lahko vplival na spremenjeno izražanje genov.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs9916279 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter ni tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni prisotnih vezavnih mest za TF-je, hkrati se sem ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V tem območju se nahaja nekaj dinukleotidov CpG, ki so lahko metilirani in bi lahko doprinesli k spremenjenemu izražanju genov, vendar se nobeden ne pojavlja v obliki otokov CpG. Polimorfizem rs9916279 se nahaja v visoko variabilnem območju, kjer so prisotni številni SNP-ji, med katerimi so tudi nesinonimne zamenjave. V neposredni bližini se nahaja visoko ohranjeno mesto za TF AREB6.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 17 SNP-jev v okviru razdalje 500 kbp. S pomočjo orodja Variant effect predictor smo predvideli možen vpliv teh SNP-jev. Med tiste, ki bi z največjo verjetnostjo lahko prispevali k povezavi z astmo se uvršča SNP rs2012, ki je povzroči zamenjavo glicina z alaninom, vendar je njegov vpliv na protein v bazi PolyPhen neopredeljen. Poleg tega bi na izražanje genov lahko vplivali še številni drugi SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs9916279 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

```
TTCTCATGACCATTGCCTCCCCACTGCACTGCATTCCCTAAGGGCAGGKTTTTGTCCCTTTGTCRCACC  
CAGARTAGTGCTGTACACCTTAGGCACTCRAKAGTTAACRGATTCAGCAAATAACCAGAAAAGCAATTT  
GTATAACTTTTTTAAGGAATTGAGAAAGAGCGWAGAGTTAAARGCAGTTCARAGAGTTGTGATTTGAAGG  
BTTTGACATCKTTTYTTYCTTCTTGMAGCTTCTTGCATDCTYRRCTCYGRACAGCTAYRCTTCRGCATRA  
YRCAGAYGGGCAGGSCACCCTGTTGAACCTCCTGCTGYRGAATTACYTACRSTACAGCTTGACRACCAG  
GCTGAGAAGCTSGTGTCCAAGTCYRTGTTCCMAGAGCAGRYCAAYAACAAYGAGTKKGCAGGTACCTCT  
RCTACACAGGTGAGCASAGGGGCGYAAACCCRTAAATCAGAAGGTGHSTCAGRCCTGC SHVRTGCRAATTT  
TCCAAGGGGTGGTGATAAGAGGCCCATTTGGCACCTGGCTTGTGCGGTGGGGAGTTGGRTGACCCTABT  
CTSTTGACCARCTCTCCTCTCCTCYRCTCCCAGGGCRARTCAAAGCCATYCAGCTGGAGTACTCAGWGKC  
CCRGAGAAAYRATGACCARYGCCCTTCGCAAGGCCCTCAGCACAVAGCTGTYRGCTTCAAACAGAYRGTG  
AGCCACAACACTAYCRYCRTCCYTTTKCCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATGGYGTCTKGCTRTGTTACC
```

Polimorfizem rs8066582, 17:g.39990676T>C, se nahaja v intronu 6 gena *PSMD3*. Je eQTL za gen *GSDMA* v pljučih in gene *GSDMB*, *ORMDL3* in *PSMD3* v krvi. Z orodjem Jaspar smo ugotovili, da alel C ustvari vezavno mesto za TF STAT3, ki se ne veže kadar je prisoten alel T.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs8066582 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter ni tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni prisotnih vezavnih mest za TF-je, hkrati se sem ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V območju SNP-ja so obogatena mesta za vezavo nukleosoma in preobčuljivostna mesta za DN-aze I. V tem območju se nahaja nekaj dinukleotidov CpG, ki bi lahko vplivali na izražanje genov.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 14 SNP-jev v okviru razdalje 500 kbp. Nobeden izmed teh ni nesinonimna zamenjava ali zamenjava z regulatornim vplivom. Na izražanje genov bi lahko vplivali SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs8066582 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

```
TGGTCTKGAAC TCSYGGGTTCAAGAAGTCCTCCACCTCAGCTTCCCAAAGTGCTGGGATCACAGGTATG
AGCCACCATGCGCTGRCCCCCTTTCCTRTTACTCATTCCCTACCACTTCAGTTCTCTTCTCTATGCTAGGG
GMTAGGAAAGGCATCCTTAACCTTCCTATCCAGAAGGACTTCAAMTTYTATTATTATTTTGTGTGTGTGT
GGAGACAGGCATATCACTGTTGCTCAGGTGAGAACTCCTGGGCTCAAGCAATCCTTYGGCCTYTGCCCTCC
CTAAGTGCTGAGATTGCAGG1TGCGAGCTGCCATGTCTGCAAAARGTTGCTTCACATCTATYTGTTGGGTG
TCAATGAAGSAGACRCTACSTGCACCTCTGGCAGTGGATATTCAGAGTGTTYCTGGCAGATAGGTTTAKA
ATATTCCYGATTCCCYAGMGCTCCTGACAGTCATTCCAGGCTYGGACCTAGATTGTGTTGATACARACSC
CAGGTTTTTATCTAGTCCTTCATGTTTCACATTTGGAACTGTATTGTCTGTGGCCAAGRAACCCAGAAAA
TCTCTGCAAGGCTGAGTGGCTCAAGTAAACATAAARCTTGGCCACTTAAGAGCTGTCAGTCAGCAAGTAT
TTAAGCATCAACCTTGGTATTAGGCACTGTAAGGGATAGGAAGGGARGATAATAAGTGATCTTTCTTWCCT
TTTCTTTCRTTTTTTGTCTTCTGAGACAGAGTCTCCMTCTGTCACTCAGGCTGGAGTGCAATGGYRYGAT
```

Polimorfizem rs1042658, 17:g.40017649T>C, se nahaja v 3' neprevedenemu območju gena *CSF3*. Polimorfizem rs1042658 se nahaja v območju za vezavo različnih histonov. Poleg drugih tkiv, se v pljučih na območje, kjer se nahaja SNP, vežeta H3K4me1 in H3K27ac, ki sta pogosto prisotna v bližini ojačevalcev prepisovanja in v območju za vezavo H3K4me3, ki je pogosto prisoten v bližini promotorjev. V neposredni bližini so številna preobčutljivostna mesta za DN-aze I. Iz teh podatkov je razvidno, da je to območje povezano s transkripcijsko aktivnostjo. Je eQTL za izražanje genov *GSDMA* in *MED24* v pljučih ter genov *GSDMB*, *ORMDL3*, *PSMD3* in *MED24* v krvi. Polimorfizem rs1042658 ne spremeni motivov za vezavo TF-jev.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs1042658 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni prisotnih vezavnih mest za TF-je, hkrati se sem ne veže POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V tem območju se nahaja nekaj dinukleotidov CpG, vendar se nobeden ne pojavlja v obliki otokov CpG.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 27 SNP-jev v okviru razdalje 500 kbp. S pomočjo orodja Variant effect predictor smo predvideli možen vpliv teh SNP-jev. Med tiste, ki bi z največjo verjetnostjo lahko prispevali k spremenjenemu izražanju genov se uvršča SNP rs709592, ki povzroči spremembo mesta za izrezovanje intronov v genu *MED24*. Poleg tega bi na izražanje genov lahko vplivali še številni drugi SNP-ji, ki spremenijo motive za vezavo TF-jev. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs1042658 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

GRGTCCCCACCTGGGAYCSTTGAGAGTATCARGTCTCCCA YRTGGGAGACAAGAAATCCCTGTTTAATAT
TTAAACAGCAGTRTTCCCCATCTGGGTCCTTGCACYCCTCACTCTGGCCTCAGCCRACTGCAYAGYGGCC
CCTGCATCCCCCTTGGCTGTGAGGCCCTRGACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGG
GTCCCA**CG**AATTTGCTGGGGAATCTYRTTTTTCTTCTTAAGACTTTTGGGACATGGTTTGACTCCCR AAC
ATCACCRA**CG**YGTCTCCTGTTTTCTGGGTGGCCT**CG**GGACACCTGCCCTRCCCC**CG**AGGGTCAGGAC
TGYGACTCTTTTTAGGGCCAGGCAGGTGCCTGGACATTTGCCTTGCTGGA**Y**GGGGACTGGGGATGTGGGA
GGGAGCAGACAGRARGAATCATGTCAGGCCTGTGTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCACCCTCCACCTCTT
CACCCCCCACTCACCAGTGTCCCCCTCACTGTACATTGTAAGTGAACCTCARGATAATAAAGTGTGTC
CTCCAGTCAYGTCCTTYCTCCTTCTTGAGTCCAGCTGGTGCCTGGCCAGGGGYTGGGGAGRTGGCTGAAG
GGTGGGAGAGGCCAGAGGGAGGTCTGGGAGGAGGTSTGGGAGGAGGTCYRGGGAGGAGGAGGAAAGTTC
TCAAGTTYGTCTGACATTCATTCYRTTAGCACATRTTTATCYGAGCACCTACTCTGTGCAGAC**CG**CTGGRC

Polimorfizem rs2302777, 17:g.40023239A>G, je sinonimna varianta v eksonu 20 gena *MED24*. Nahaja se v vezavnem mestu za TF TFAP2A, vendar ne vpliva na spremembo motiva za njegovo vezavo. Nahaja se v območju za vezavo nukleosoma. V njegovi neposredni bližini se nahajajo številni SNP-ji, med katerimi je veliko nesinonimnih zamenjav. Je eQTL za gen *GSDMA* v pljučih in gena *ORMDL3* ter *GSDMB* v krvi. Poleg drugih tkiv, se v pljučih na območje, kjer se nahaja rs2302777, vežeta H3K27ac in H3K4me1, ki se pogosto nahajata v bližini ojačevalcev prepisovanja. Na to območje se vežejo tudi intragenski ojačevalci prepisovanja, ki naj bi delovali kot alternativni promotorji in omogočali prepisovanje molekul eRNA. Te so sicer enake molekuli mRNA, vendar so krajše in naj ne bi bile prevedene v protein. Prepisovanje eRNA naj bi bilo tkivno specifično, vendar njihova biološka vloga še ni znana (Kowalczyk in sod., 2012).

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs2302777 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ali tarčnih mest za regulatorne miRNA. Sem se ne veže nobena POL2, ki bi omogočila prepisovanje različnih RNA. V tem območju se nahaja nekaj dinukleotidov CpG, vendar se nobeden ne pojavlja v obliki otokov CpG. V neposredni bližini rs2302777 so motivi za vezavo TF-jev STAT3, ESR1 in TFAP2C ter preobčutljivostna mesta za DN-aze I.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, 27 SNP-jev v okviru razdalje 500 kbp. S pomočjo orodja Variant effect predictor v zbirki podatkov Ensembl smo predvideli možen vpliv teh SNP-jev. Med njimi ni nesinonimnih zamenjav. V popolnem LD-ju z rs2302777 so SNP-ji, ki spremenijo številne motive za vezavo TF-jev (na primer rs12451897 spremeni šest motivov, rs12451547 spremeni dva in rs12453343 spremeni štiri motive), kar bi lahko vplivalo na spremenjeno prepisovanje genov. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs2302777 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

WAAGRGRGCAGYTCAGGAGCYRGS GDCCYRGGATCTGGGRCTCCTACACCCTGCCACSCCAGCATGGCTG
TCCAGTAAGGCC**CG**CAGAGGGGGCCCCAGATGTTGCTCCRCCCCCTCAGGCTGAATCCCAGTCTCTGGCCA
GAGCTYCCCAAGGAGGCAACTCTGAGR**CG**AGGCATTCCRGGGAKGCCRCCTGGCTSACRGCAGCCTCTCA
GRSAAGCCTGGCAGACCAGGCCAGGTGTGGGGAGCCMGRGKACAGGRCYCATRTRYRGCCCMCAGCCACTC
CARCYCAASYACCTTAATYAGGTTRTTGCAGAASCAGYAGAYRCYRMMCATGTGCAGCAGGSTGYCAAAG
ATGTGGAHSGAG**CG**GCTGTCCACCCAGMCYTTCTCYAGMACCTTGGCAAA**R**ATGTCYRTCASCACCTCTY
TGATGGGCYRYTTGBGGGRYAGCARGTTSCAGTAGGGMATTGTGTCCACYCCRGTTGGMGGGAAACTTGAT
CTGYDTGGCTGTCTGCTRCAGCAYKYBRGCACACRTGCRYTCCAGGATSGAGTTCATGATCACCASCCYG
RGGGAGGGSYSAGARRASSTGAGGCTCAGGTGCMCTRTAGGRKGGGGAGGGAGAGGAGGGAACACCCAT
GCCAGACTTTCCCTTGGACTTAGGTTA**CG**GAWATCTCCCTGAGGCATTAACCCAGTTTTGCVCTGGGGGA
CRGTAYAMCCCRGGGTGACCTGGCCCCCTGCTCTGCYCCTGGCAGGTCTCTCACCTGCAGGACACAAAGCC

Polimorfizem rs2146323, 6:g.43777358C>A, se nahaja v intronu 2 gena *VEGFA*. Nahaja se v preobčutljivostnem mestu za DN-aze I ter v vezavnem mestu za nukleosom. Poleg drugih tkiv, se v pljučih na območje, kjer se nahaja rs2146323, vežeta H3K27ac in H3K4me1, ki se pogosto nahajata v bližini ojačevalcev prepisovanja. Alel C v SNP-ju rs2146323 spremeni motiv za vezavo TF-ja p53, ki se običajno veže na zaporedje RRRCWWGYYY (R=A,G; W=A,T; Y=C,T), pri čemer je ključno zaporedje CWWG (Benoit in sod., 2011). Na verigi -1 je zaporedje GGCAA(G>T)TC, kar pomeni, da je vezava mogoča le, če je prisoten alel C. Čeprav se vezavno mesto za TF nahaja v intronu, lahko to funkcionalno pomeni dvoje. Lahko se TF veže, vendar ni spremenjenega prepisovanja genov, torej vezava ni funkcionalna. Druga možnost je, da morda lahko vpliva na prepisovanje nekega drugega zaporedja, saj so številni regulatorni elementi, ki se nahajajo v genomu še neraziskani oziroma ni jasno kako vplivajo na prepisovanje oz. na prepisovanje česa vplivajo.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs2146323 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter ni tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni prisotnih vezavnih mest za TF-je, sem se ne veže nobena POL2. V okolici rs2146323 se nahaja območje preobčutljivostnih mest za DN-aze I. V območju SNP-ja so obogatena mesta za vezavo nukleosoma. V neposredni bližini naj bi se nahajal aktiven promotor, kar je bilo dokazano na različnih celičnih linijah. V tem območju se nahaja nekaj dinukleotidov CpG, ki bi lahko vplivali na izražanje genov.

Z analiziranim SNP-jem je v visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, le 1 SNP v okviru razdalje 500 kbp. To je intronski SNP rs3025010. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs2146323 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

GATAGCTGTGSACTACTGTACASAGTWCTCAGGATGTAGTAAGTGCTCAATAAACAGCTGTTGGTATGGT
TGACRTTATGGTAGTGGTTGTGGGGAGGAG**CG**TAGGAACTGGAGACTAGCTTGGCAAAGSTGGCTCTTCC
TCCTTTTAGGGAAAGCTTRGAGCATCCCCATSGGGTATACCCATACTCAGACTGTCTCTGGCATCRAGG

TTGRCCCAGGATTTCAGTTCAGCTGTCACAGTGAGGTGGCRGGATCAGATGTGGCAGGCCATGTCCCTTGG
AACTTGAGTACAT**CG**TGTGATCTCTGGAATGAAAACAGGCCCTTCACCAGYGTTGATGGTGGAAAGCTTAG
GGAAGTGCTTCAAACAYAGTAGGAGGGACTTASGTTAGATTTYGGAAGGA**M**TTGCCTGATTCRGAAGCTC
CAAAGAGTGGCATTACAGAGYTGGGTGGAGAGAGGGGCTAGCYATCTTTYGTGTGSCCACYGGGCTCWT
RTRTYRTRYCTCTCATKCAGYGGTGAARTTCATGGATGTCTATCAG**CG**CAGCTACTGCCATCCARTYGA
RACCCTGRTGGACATCTTCCAGGAGTAYSYTGATGAGWTYAGTACATSTTYAAGCCATCCTGTRTGYCC
CTGAYGCRATGYRGRGGCTRCTGCRATGAYGAGGGCCTGGAGTGYGTGCCCASTGARGAGTCCAAYAYCA
CCATGCAGGTGGRYATCTTTGGGAAKTGGGGCRAGSSGGGGATAGGRAGGVGRGTAASACTTTGGGAAYA

Polimorfizem rs833058, 6:g.43764117T>C, se nahaja navzgor od gena *VEGFA*. SNP rs833058 spremeni motiv za vezavo TF-ja HOXA5, saj alel C omogoči tvorbo sekundarnega vezavnega mesta na verigi +1, medtem ko je v primeru alela T vezava možna le na verigi -1. Po podatkih Haploreg v4 rs833058 spremeni še motive za vezavo TF-jev AP-1, CEBPB ter CEBPD, vendar z bazo Jaspar ne zaznamo vezave slednjih, ne glede na alelno varianto.

Ko smo podrobneje analizirali molekularno okolje SNP-ja rs833058 v okviru 500 bp, se je izkazalo, da v tem območju ni genskega zapisa za miRNA, snoRNA ali scRNA ter ni tarčnih mest za regulatorne miRNA. V tem območju ni prisotnih vezavnih mest za TF-je, sem se ne veže nobena POL2. V območju rs833058 se nahaja območje preobčutljivostnih mest za DN-aze I. V območju SNP-ja so obogatena mesta za vezavo nukleosoma.

Z analiziranim SNP-jem v okviru razdalje 500 kbp ni visokem LD-ju, z $r^2 > 0,8$, noben SNP. Prikazano je zaporedje s SNP-jem rs833058 (podčrtan) ter druge variante, ki se nahajajo v bližini proučevanega SNP-ja, krepko so označeni dinukleotidi CpG.

CAAGGAGCTTAGCTGATGTTTGCTRTTTCATATATTTCCCTACARCCCTGGGAGGTAAGAACCAYGAAC
CTCATTTTACAGATGARGAACTGAGGCTCAGAYAAGATAAGTGAATTGTCCAAGTCTCAAAGCTTGAA
KTGTTGAACCAAGATCAAACCCAGCCTGTCTGGCTTTTTTCYATTACTYGCATATGGGGKTGGTGGKGTGGA
GAAAGGGGAGTGGRGTTGGTGGCTGAGGCTTTTCACAGTGAGGGTTCATCAAGCTGGTGTCTTTYCTGAAA
GGACAGAGGTCTGGCATCTCAGGTAACAGAGGAAG**CG**GTTCCCTACCTGCTGGGATTTGAGGGGTTTCATA
AGAACKGCTTCTCCCTTCCATCACTKGGTGCTGAGCCCCAGATTTACCA**Y**TAGYGCTAGATTTCTTTGA
GTTAAGCACTGCCCTCTCCAAGAGGCTTTTAAACACACAGGCCCTGGAAGATGTGACATTTGKTATCAG
TCATCTCATCTGGAGTGTTTRAGGGAGATGTTACAGSCTYACAGAGMMTCAGARCTTRGGGAGTGGAACC
TCATGCTTTACCCAGGAGAAGCCTGAGGTCCAGCAAGGGGAGCTGACTYGGCCAAGGTCACACAGCATGC
AACAGACTCTGGWAATTTTTTTTTTTTTTAK**CG**GAGYCTYGCTTTGT**CG**CCCAGGCTGGAGTGCAGTG
GTGCCATCTTGGCTTACTTGCCTCYGGGTTTAAAGTATTCTYCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGTTGGYA

5 RAZPRAVA

Astma je kompleksna genetska bolezen k razvoju katere doprinesejo številni geni. Eden izmed najbolj znanih genetskih lokusov, ki doprinese k razvoju astme je kromosomski lokus 17q12–17q21.1 (Bouzigon in sod., 2008; Halapi in sod., 2010). V naši raziskavi smo ugotavljali povezavo SNP-jev področja 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Kot prvi smo želeli preveriti ali je tudi KOPB, ki je tako kot astma, kronična obstruktivna bolezen pljuč, povezan s SNP-jem rs4795405, ki se nahaja na lokusu 17q12–17q21.1.

Poleg iskanja genetske podlage astme je pomembno tudi proučevanje farmakogenetike astme, saj se številni bolniki na zdravljenje slabo odzivajo. Ker za genetske asociacijske raziskave kompleksnih bolezni velja, da potrebujejo ponovitvene raziskave za doseganje boljše zanesljivosti najdenih povezav, smo želeli potrditi, da je gen *VEGFA* res povezan z odzivom na zdravljenje astme z IK.

5.1 POVEZAVA SNP-JA rs4795405, KI SE NAHAJA NAVZGOR OD *ORMDL3* V *RP11-387H17.4*, Z ASTMO PRI ODRASLIH IN KOPB

5.1.1 SNP rs4795405 in astma pri odraslih, s ali brez pridruženega rinitisa

Astma je heterogena bolezen in na njen fenotip lahko vpliva obdobje v katerem se razvije. Astma, ki se pojavi pri odraslem človeku se od astme, ki se pojavi v otroštvu razlikuje v mnogih značilnostih. Največkrat astmo pri otrocih sprožijo ekstrinzični dejavniki in je mnogokrat alergijska, nasprotno je pri odraslih astma večkrat intrinzična. Astma pri odraslih je pogostejše ne-atopijska, težja, upad pljučnega delovanja pa je hitrejši. Spoznanje, da se fenotip astme razlikuje glede na čas njenega nastanka ni novo, a vendar se v zadnjih letih ponovno odkriva in poudarja (de Nijs in sod., 2013). K temu so zagotovo pripomogle tudi genetske raziskave astme, saj se je v številnih raziskavah izkazalo, da je eden izmed najbolj znanih kromosomskih lokusov 17q12–17q21.1 povezan ravno z astmo, ki se razvije v otroštvu (Bouzigon in sod., 2008; Halapi in sod., 2010; Moffatt in sod., 2007). Kljub močni povezavi SNP-jev tega lokusa z astmo v otroštvu se je v nekaterih raziskavah izkazalo, da je lokus 17q12–17q21.1 vendarle povezan tudi z astmo pri odraslih (Fang in sod., 2011; Hrdlickova in sod., 2011). Druge raziskave pa temu spoznanju s svojimi odkritji nasprotujejo (Kreiner-Møller in sod., 2015). Povezava lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih torej ni enotna, zato so potrebne dodatne raziskave, ki bi razjasnile ali imata astma pri otrocih in odraslih vsaj deloma skupno genetsko ozadje, kar zadeva lokus 17q12–17q21.1. Ena izmed možnih razlag zakaj se rezultati genetskih raziskav astme pri otrocih in odraslih razlikujejo je, da je zastopanost fenotipov pri proučevanih skupinah otrok in odraslih z astmo različna, kar vodi v neponovljivost. Astma je namreč kompleksna bolezen, pri kateri različni mehanizmi vodijo v nastanek različnih fenotipov bolezni (Agache in sod., 2012).

Poleg najpogostejše delitve astme glede na atopijo, je ena od delitev bolnikov z astmo delitev bolnikov glede na pridruženi rinitis. Raziskave so pokazale, da je obstrukcija dihalnih poti pri bolnikih z astmo brez pridruženega rinitisa težja oziroma manj reverzibilna kot pri bolnikih s pridruženim rinitisom (Jang in sod., 2010), kar nakazuje na morebitno različno obliko bolezni, z različnim biološkim in genetskim ozadjem. Podobno kot je za astmo brez pridruženega rinitisa značilna slabše reverzibilna obstrukcija dihalnih poti, je to glavna značilnost KOPB-ja. Zgodovinsko sicer velja, da je v nasprotju z astmo, za KOPB značilna ne-reverzibilna oziroma fiksna obstrukcija dihalnih poti in da sta astma in KOPB popolnoma različni bolezni (Zeki in sod., 2011). A vendar se je v zadnjih letih izkazalo, da sta obe bolezni izjemno heterogeni in se pri nekaterih bolnikih lahko tudi prekrivata. Izkazalo se je, da imajo tudi nekateri bolniki z astmo ne-reverzibilno obstrukcijo. Hkrati, je pri nekaterih bolnikih s KOPB obstrukcija lahko deloma reverzibilna (Lenz in Panos, 2014). Različni fenotipi astme naj bi imeli različno genetsko osnovo in domnevamo, da imajo določeni fenotipi astme skupno genetsko ozadje s KOPB.

ORMDL3 je eden izmed najbolj znanih kandidatnih genov za astmo. V številnih raziskavah je bil povezan z astmo, predvsem z zgodnjo astmo, ki se prične v otroštvu (Binia in sod., 2011; Bouzigon in sod., 2008; Kavalarić in sod., 2012). Eden izmed kandidatnih SNP-jev gena *ORMDL3*, ki je bil v preteklih raziskavah povezan z astmo, je SNP rs4795405 T>C (Moffatt in sod., 2007). Nahaja se navzgor od *ORMDL3* v genu za lincRNA *RP11-387H17.4*. Pogosto je imenovan kar SNP gena *ORMDL3*, saj je bil povezan z njegovim izražanjem. V eni izmed naših preteklih raziskav genetike astme pri otrocih smo ugotovili, da je SNP rs4795405 močnejše povezan z astmo brez pridruženega rinitisa v primerjavi z astmo s pridruženim rinitisom (Kavalarić in sod., 2012). Ta rezultat smo želeli potrditi še na skupini odraslih bolnikov z astmo. Hkrati smo želeli ugotoviti ali je rs4795405 povezan tudi s KOPB.

Pri proučevanju odraslih bolnikov smo dokazali statistično značilno povezavo alelov rs4795405 z astmo. Pogostnost rizičnega alela C je bila pri bolnikih z astmo 59 % v primerjavi z zdravimi kontrolami, kjer je bila 49 % ($p = 0,017$). Z uporabo recesivnega genetskega modela smo ugotovili, da je pogostnost genotipa CC pri odraslih bolnikih z astmo 35 % v primerjavi z zdravimi kontrolami, kjer je bila 26 %, vendar ta razlika ni bila statistično značilno različna. Po delitvi bolnikov na bolnike z astmo s pridruženim rinitisom in na bolnike z astmo brez pridruženega rinitisa, se je izkazalo, da je rs4795405 statistično značilno povezan le z astmo brez rinitisa, saj je bila pogostnost rizičnega genotipa CC podobna pri bolnikih z astmo in rinitisom kot pri zdravih kontrolah (24 % in 26 %). Pri bolnikih z astmo brez rinitisa je bila pogostnost genotipa CC 44 %, kar je statistično značilno večje kot pri zdravih kontrolah ($p = 0,006$) in tudi statistično značilno različno od astme z rinitisom ($p = 0,017$). Tudi pogostnosti genotipov rs4795405 se niso razlikovale med bolniki, ki imajo izključno rinitis in zdravimi (Balantić in sod., 2013). S tem smo potrdili tudi rezultate naše predhodne raziskave pri otrocih z astmo (Kavalarić in sod., 2012).

Rezultati naše raziskave kažejo na izjemen pomen proučevanja različnih fenotipov astme, pri ugotavljanju genetskega ozadja te fenotipsko heterogene bolezni, saj domnevajo, da je manifestacija astme odsev specifične genetske nagnjenosti (Meng in Rosenwasser, 2010). Pokazali smo, da SNP, ki se nahaja v kandidatnem lokusu 17q12–17q21.1, ni povezan izključno z astmo pri otrocih, vendar je povezan tudi z astmo pri odraslih. Poleg tega, smo s ponovitvijo povezave med rs4795405 in astmo pokazali, da druge genetske raziskave astme odsevajo tudi genetsko ozadje pri slovenskih bolnikih z astmo. Kot je že znano, določena genetska varianta, ki jo lahko zaznamo preko določitve SNP-jev lahko vodi v različne teže bolezni (Halapi in sod., 2010) ali kot smo pokazali, do astme, ki jo spremlja rinitis ali ne in je po svoji biologiji lahko bistveno drugačna. To je pomembno spoznanje, saj je lahko tudi neodzivnost na zdravljenje z določeno vrsto terapije posledica različne biologije astme. Naše odkritje, da je rs4795405 močno povezan z astmo brez rinitisa in ni povezan z astmo s pridruženim rinitisom, niti ne z izključno rinitisom (Balantič in sod., 2013) je skladno z raziskavo, kjer so proučevali povezanost med najbolj proučevanim SNP-jem lokusa 17q12–17q21.1 - rs7216389 in rinitisom (Bisgaard in sod., 2008), saj tudi oni povezave niso našli. Polimorfizem rs7216389 se 18 kbp navzdol od *ORMDL3*, v genu *GSDMB*, in je bil tako kot rs4795405 povezan z izražanjem gena *ORMDL3* (Moffatt in sod., 2007). Hkrati sta omenjena SNP-ja v LD-ju ($r^2 = 0,79$), kar potrjuje naše ugotovitve. Nasprotno, so v eni izmed raziskav našli povezavo med SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1 in astmo s pridruženim alergijskim rinitisom in hkrati z rinitisom brez astme (Fuentes in sod., 2015).

Astma in rinitis se pogosto pojavljata skupaj, vendar je rinitis bolezen zgornjih dihalnih poti, medtem, ko je astma bolezen spodnjih dihalnih poti. Tudi bolniki z rinitisom, ki sicer nimajo astme v 38 % izkusijo simptome astme in mnogokrat je pojav rinitisa izhodišče za kasnejši razvoj astme (Corren, 1997). Po nekaterih raziskavah je za bolnike z astmo brez rinitisa v primerjavi z astmo z rinitisom značilna slabša reverzibilnost obstrukcije dihalnih poti ter slabša odzivnost na kortikosteroidno zdravljenje. Zanje je značilen tudi nižji odstotek atopije. Ti dve skupini bolnikov z astmo se v preteklih raziskavah nista razlikovali glede na celokupne IgE, število eozinofilcev v izmečku, indeks telesne mase in provokacijsko koncentracijo metaholina, ki zniža FEV1 za 20 % (Jang in sod., 2010). Pokazali so tudi, da so imeli bolniki z astmo brez rinitisa slabše pljučno delovanje v primerjavi s tistimi z rinitisom (Dixon in sod., 2006). Druge raziskave so pokazale, da je lahko sopojava rinitisa tudi rizični dejavnik za težji potek astme (Ponte in sod., 2008).

Ponovitev povezave rs4795405 z astmo brez rinitisa, ki smo jo prvotno odkrili na otroški populaciji bolnikov (Kavalarić in sod., 2012), potrjuje možne različne mehanizme oziroma izvor astme z ali brez pridruženega rinitisa, ki temeljijo na genetskem ozadju posameznikov. Morda je potrebna ločena obravnava teh dveh skupin bolnikov in s tem tudi izbira ustreznega zdravljenja. Z našo raziskavo smo potrdili tudi povezavo z astmo pri odrasli slovenski populaciji, kar je v skladu z drugimi raziskavami, ki so pokazale,

da lokus 17q12–17q21.1 ni povezan izključno z astmo v otroštvu (Karunas in sod., 2011), vendar je potrebno proučevati še druge fenotipe astme znotraj že proučevanih, kot sta astma pri otrocih in odraslih.

5.1.2 SNP rs4795405 in KOPB

Astma in KOPB sta kronični bolezni dihalnih poti z deloma se prekrivajočimi kliničnimi simptomi. Za obe bolezni je značilna obstrukcija dihal, ki pomeni zožitev dihalnih poti, z glavno razliko v reverzibilnosti (Meyers in sod., 2004). V nekaterih primerih astma lahko vodi v razvoj KOPB (Soriano in sod., 2005). Kljub deloma podobni etiologiji bolezni, sta bili le v nekaj primerih skupaj proučevani v eni genetski raziskavi. Zaradi odkrite povezave med rs4795405 in astmo brez rinitisa (Kavalarić in sod., 2012), za katero je značilna slabše reverzibilna obstrukcija dihalnih poti (Jang in sod., 2010), smo v analizo vključili še bolnike s KOPB, za katere velja fiksiranost oziroma ne-reverzibilnost obstrukcije. To je bila tudi ena prvih raziskav, v kateri smo v analizo kandidatnega lokusa za astmo 17q12–17q21.1 vključili bolnike s KOPB.

Pogostnost alela C v rs4795405 je bila statistično značilno večja pri bolnikih s KOPB, kot pri zdravih kontrolah. Alel C je imelo 63 % bolnikov s KOPB v primerjavi z 49 % zdravih kontrol ($p = 0,001$). Z uporabo recesivnega genetskega modela smo ugotovili, da so pogostnosti rizičnega genotipa CC pri bolnikih s KOPB 37 % in 26 % pri zdravih kontrolah, kar je statistično značilno različno ($p = 0,045$). Hkrati so bile pogostnosti rizičnega genotipa CC in alela C podobne pri KOPB in astmi brez rinitisa (37 % vs. 44 % in 63 % vs. 65 %). Pogostnost alela C je bila statistično značilno različna med bolniki s KOPB in astmo s pridruženim rinitisom ($p = 0,044$). Ti rezultati nakazujejo na možno klinično prekrivanje med KOPB in določenimi fenotipi astme. Že v predhodnih raziskavah so namreč pokazali, da so nekateri geni povezani tako z astmo kot s KOPB. Dva izmed teh sta gen *ADRB2* ter gen *ADAM33* (Gosman in sod., 2007; Jie in sod., 2011; Matheson in sod., 2006). Ker za našo analizo nismo imeli podatkov o FEV1/FVC, na podlagi katerih bi lahko ocenili stopnjo obstrukcije, to ostaja zanimiv raziskovalni problem za prihodnje raziskave.

Nasprotno našim pričakovanjem, smo odkrili tudi statistično značilno povezavo med rizičnim genotipom CC in boljšim pljučnim delovanjem pri bolnikih s KOPB, kar kaže na to, da je genotip CC sicer rizični dejavnik za razvoj KOPB, a je hkrati značilen za blažje oblike KOPB, z manj prizadetim pljučnim delovanjem (Balantič in sod., 2013). Ta rezultat nakazuje na povezavo rs4795405 z določenim fenotipom KOPB, podobno kot se je izkazalo za astmo. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno oceniti stopnjo reverzibilnosti obstrukcije pri bolnikih s KOPB in povezavo s SNP-jem rs4795405. Genetske raziskave so ravno s pristopom proučevanja povezave SNP-jev s posameznimi fenotipi astme vodile do razumevanja, da je astma kompleksna bolezen, pri kateri obstaja več fenotipov in endotipov, ki imajo lahko različna genetska ozadja in se različno odzivajo na zdravljenje, kar morda velja tudi za KOPB.

Prekrivanje genetskega ozadja astme in KOPB, ki smo ga nakazali v naši raziskavi, sovпада tudi z obstojem ACOS-a, za katerega je značilno prekrivanje simptomov obeh bolezni. Ker smo našli povezavo rs4795405 z astmo brez rinitisa, za katero je značilna manj reverzibilna obstrukcija dihalnih poti in hkrati povezavo z milejšo obliko KOPB bi bilo ta SNP oz. lokus 17q12–17q21.1 smiselno preučiti še na skupini bolnikov z ACOS-om. Do sedaj je bila izvedena le ena raziskava, kjer so proučevali genetiko ACOS-a. Ugotovili so, da so z njim povezani geni *CSMD1*, *SOX5* in *GPR65* (Hardin in sod., 2014).

5.1.3 Vloga SNP-ja rs4795405

Polimorfizem rs4795405 leži navzgor od protein-kodirajočega gena *ORMDL3* in je bil povezan z njegovim izražanjem (Moffatt in sod., 2007). Pred kratkim so na območju, kjer leži ta polimorfizem anotirali še gen *RP11-387H17.4*, ki kodira lincRNA. Vloga molekul lincRNA je trenutno slabo znana. Domnevajo, da naj bi nekatere lincRNA neodvisno od zaporedja cis-uravnavale transkripcijo bližnjih genov, saj naj bi označevale območja z odprto, transkripcijsko kompetentno kromatinsko strukturo s čimer naj bi privlačile RNA-vezavne proteine. Po drugi hipotezi naj bi lincRNA trans uravnavale izražanje genov, saj naj bi se večinoma nahajale v citosolu. Molekule lincRNA naj bi vezale različne proteine, molekule DNA in RNA. Usmerjale naj bi komplekse, ki modificirajo kromatin k specifičnim tarčnim genom, s čimer naj bi uravnavale izražanje genov. Dokazano je bilo, da lahko vežejo dejavnik CTCF in nekatere druge proteine. CTCF se na RNA veže z drugo domeno kot na DNA. Mehanizem vezave med lincRNA in proteini še ni jasn, hkrati ni znano kakšna je vezava z DNA. Po eni izmed hipotez naj bi lincRNA pritegnile proteine potrebne za transkripcijo, medtem ko se aktivno prepisujejo in so še pripete na DNA z RNA-polimerazo. Po drugi teoriji se lincRNA vežejo na mRNA podobno kot miRNA ali snoRNA (Ulitsky in Bartel, 2013).

Polimorfizem rs4795405 bi torej lahko vplival na izražanje gena *ORMDL3* na podlagi dejstva, da se nahaja navzgor od gena *ORMDL3* in vpliva na spremenjeno vezavo TF-ja NF-1, preko delovanja lincRNA ali pa je eQTL za gen *ORMDL3* na podlagi LD-ja z nekim drugim SNP-jem, ki dejansko uravnava njegovo izražanje.

Polimorfizem rs4795405 naj bi bil odgovoren za približno 20 % variabilnosti v izražanju gena *ORMDL3* v perifernih krvnih limfocitih CD4⁺ (Murphy in sod., 2010). Glavna vloga *ORMDL3* pri astmi naj bi bila celično uravnavanje Ca²⁺, saj preko endoplazemske črpalke SERC-e omogoča privzemanje citosolnega Ca²⁺ v endoplazemski retikulum. Kadar je *ORMDL3* prekomerno izražen se delovanje SERC-e zmanjša, kar povzroča povečane stopnje znotrajceličnega Ca²⁺ in vodi v krčenje gladkih mišičnih celic, preodzivnost dihal in nepravilno zvijanje proteinov, kar povzroči odziv na ne-zvite proteine, ki vodi v vnetja. Ca²⁺ je pomemben tudi za eozinofilce, saj omogoča citoskeletno reorganizacijo, spremembe v morfologiji ter modulacijo

integrinskih receptorjev, celično adhezijo, migracijo in njihovo degranulacijo (Wong in sod., 2004). Povečane stopnje Ca^{2+} so odkrili pri bolnikih z astmo in pri bolnikih s KOPB, pri katerih so bile stopnje Ca^{2+} povezane tudi s težo bolezni (Manral in sod., 2011; Parameswaran in sod., 2002). *ORMDL3* je vpleten tudi v sfingolipidni metabolizem in bioaktivni sfingolipidni metaboliti uravnavajo imunske in vnetne procese (Breslow in sod., 2010).

Modeli miši z utišanim genom *ORMDL3*, so imeli nižje stopnje znotrajceličnega Ca^{2+} , kar je vodilo v sprostitvev dihalnih gladkih mišic (Cantero-Recasens in sod., 2010; Ha in sod., 2013). Za transgene miši s prekomerno izraženim *ORMDL3* je značilno povečano preoblikovanje dihalnih poti, povečano gladko mišičje v pljučih, subepitelijska fibroza ter povečano nastajanje sluzi. Hkrati so razvile spontano preodzivnost dihalnih poti na metaholin in so imele tudi povišane stopnje protiteles IgE (Miller in sod., 2014).

Polimorfizem rs4795405 ali SNP-ji, ki so z njim v LD-ju bi torej lahko vplivali na astmo preko uravnavanja Ca^{2+} . Raziskave so namreč pokazale, da je rs4795405 povezan z izražanjem gena *ORMDL3*, kar kaže na možno funkcionalno vlogo pri razvoju astme (Moffatt in sod., 2007). Alel C, ki se je v naši raziskavi izkazal kot rizičen za razvoj astme, je bil povezan s povečanim izražanjem gena *ORMDL3* (Sharma in sod., 2014).

Motnje v homestazi Ca^{2+} in posledično aktivaciji odziva na nezvite proteine so bile pokazane za mnoge kronične vnetne bolezni, med njimi tudi KOPB in druge bolezni, kot je vnetna črevesna bolezen (Hasnain in sod., 2012), ki so bile ravno tako povezane s SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1.

V naši raziskavi smo pokazali, da je SNP rs4795405 povezan z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih, predvsem s fenotipom astme brez pridruženega rinitisa. Hkrati smo pokazali, da je rs4795405 povezan tudi s KOPB, a vendar s fenotipom KOPB za katerega je značilna manjša prizadetost dihal. Te ugotovitve nakazujejo, da imajo različni fenotipi astme in KOPB lahko različno genetsko ozadje in da si določeni fenotipi teh dveh bolezni lahko delijo genetsko ozadje. Kot prvi smo dokazali, da SNP-ji, ki se nahajajo v kromosomskem lokusu 17q12–17q21.1 niso povezani izključno z astmo, vendar doprinesejo tudi h KOPB. Zaradi ugotovljene povezave rs4795405 z astmo pri odraslih, smo naše raziskovanje lokusa 17q12–17q21.1 razširili tako, da smo v naslednjem delu raziskave preučevali 13 SNP-jev tega lokusa na drugi skupini bolnikov z astmo.

5.2 POVEZAVA SNP-JEV LOKUSA 17q12–17q21.1 Z ASTMO PRI ODRASLIH

Lokus 17q12–17q21.1 je eden izmed glavnih kandidatnih kromosomskih lokusov, ki naj bi bil pomemben za razvoj astme. Ker smo v prvem delu naše raziskave potrdili povezavo SNP-ja rs4795405 z astmo pri odraslih, smo želeli ta lokus podrobneje preučiti na drugi, večji skupini bolnikov, pri čemer smo analizirali večje število SNP-

jev in haplotipov, kar nam je omogočilo proučevanje večjega dela lokusa 17q12–17q21.1.

Za našo raziskavo smo izbrali 13 SNP-jev in sicer: rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246, rs4795405, rs8079416, rs3893044, rs7219080, rs8069202, rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777, ki se nahajajo v območju osmih protein-kodirajočih genov - *ZPBP2*, *GSDMB*, *ORMDL3*, *LRR3C3*, *GSDMA*, *PSMD3*, *CSF3* in *MED24* in zajemajo 121 kbp kromosomskega lokusa 17q12–17q21.1.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da po popravku za testiranje več spremenljivk, pri čemer je vrednost p , ki je statistično značilna $< 0,004$, noben izmed proučevanih SNP-jev ni statistično značilno povezan z astmo pri odraslih. Z astmo so bili šibko oz. mejno ($p < 0,05$) povezani rs12936231 v *ZPBP2*, rs2305480 in rs7216389 v *GSDMB*, rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4* in rs7219080 v *GSDMA* (Žavbi in sod., 2016). Razmerja obetov, ki predstavljajo povečano tveganje za razvoj astme, so bila po pričakovanjih relativno majhna, od 1,10 do 2,03, saj so frekvence manj pogostega alela v splošni populaciji relativno visoke in posledično ni pričakovati velikega doprinosa k bolezni. Vsi ti SNP-ji so bili mejno povezani z astmo na podlagi linearnega modela logistične regresije, po popravku za spol in starost, saj proučevani skupini nista bili primerljivi po spolu, starostni interval pa je bil zelo velik. Na ta način smo zagotovili, da povezava SNP-jev z astmo ne bi bila posledica raznolikosti dveh proučevanih skupin.

Našli smo močno povezavo enega izmed treh haplotipnih blokov, ki ga sestavljajo SNP-ji rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777, ki se nahajajo v genih *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, z astmo, z visokimi razmerji obetov, do 12,32 in globalno haplotipno povezavo s $p < 0,0001$ (Žavbi in sod., 2016). Tako smo pokazali pomen proučevanja haplotipov v povezavi s kompleksnimi boleznimi v primerjavi s posameznimi SNP-ji (Akey in sod., 2001).

5.2.1 Povezava posameznih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih

Izmed 13-ih proučevanih SNP-jev noben ni bil statistično značilno povezan z astmo pri odraslih. Nakazane so bile šibke, mejne povezave 5-ih SNP-jev. Te povezave bi lahko bile posledica naključja, saj so vrednosti p relativno visoke oz. nobena ni $< 0,004$, kakršna bi morala biti, da bi zadostili statističnim pogojem glede na število proučevanih SNP-jev. Kljub temu so bili ravno SNP-ji, ki so bili v naši raziskavi mejno povezani z astmo, SNP-ji, ki so se že v preteklih raziskavah izkazali kot eni izmed najmočnejše povezanih z astmo. Ravno te SNP-je, z izjemo rs7219080, smo izbrali na podlagi preteklih objav, medtem ko so bili preostali izbrani s pomočjo orodja Haploview in zanje z analizo posameznih SNP-jev nismo našli nobene povezave z astmo. Polimorfizem rs7219080 je bil edini, ki je bil v naši raziskavi z astmo mejno povezan z

uporabo recesivnega genetskega modela, medtem ko so bili preostali mejno povezani z astmo z uporabo dominantnega genetskega modela (Žavbi in sod., 2016).

Polimorfizem rs7219080 je bil v naši raziskavi le šibko oz. mejno povezan z astmo, kar pomeni, da bi bila ta povezava lahko posledica naključja. Nahaja se na 5' koncu gena *GSDMA*. V eni izmed raziskav so pri analizi 16 SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 odkrili najmočnejšo povezavo med astmo in SNP-ji, ki se nahajajo v genu *GSDMA* (Marinho in sod., 2012). Gen *GSDMA* je sicer eden izmed najmočnejših kandidatnih genov lokusa 17q12–17q21.1 za astmo. Čeprav je bil gen *GSDMA* že v predhodnih raziskavah povezan s tveganjem za razvoj astme (Yu in sod., 2011), je njegova vloga pri astmi popolnoma neznana. Znano je le, da so SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1 povezani z izražanjem gena *GSDMA* (Hao in sod., 2012; Llius in sod., 2011). Polimorfizem rs7219080 je eQTL za gen *GSDMA* v pljučih in gene *ORMDL3*, *GSDMB* in *MED24* v krvi. To kaže, da bi rs7219080 lahko imel funkcionalno vlogo v patologiji astme, vendar je bila v naši raziskavi povezava z astmo prešibka, da bi lahko sklepali, da pomembno doprinese k astmi. Gen *GSDMA* je visoko izražen v apikalnih in v bazalnih epitelih celicah pljuč (Hao in sod., 2012). Proteini *GSDMA* imajo v gastričnem epiteliju visoko apoptotsko aktivnost (Saeki in sod., 2007), zato lahko predpostavimo, da povečano izražanje *GSDMA* povzroča vnetje, kar bi lahko delno pojasnilo povezavo SNP-jev v genu *GSDMA* z astmo odkrito v predhodnih raziskavah. Proteini *GSDMA* naj bi bili vpleteni v mnoge imunske procese, kot je signaliziranje T-celičnega receptorja in uravnavanje izražanja receptorjev na površini celic pri imunskem odzivu (Hao in sod., 2012).

Dva SNP-ja, ki sta v visokem LD-ju, rs2305480 in rs7216389, sta bila v naši raziskavi le šibko oz. mejno povezana z astmo, zato ne moremo potrditi, da pomembno doprineseta k astmi pri odraslih. Nahajata se v genu *GSDMB*. Polimorfizma rs2305480 in rs7216389 sodita med najbolj znane in z astmo največkrat povezane SNP-je lokusa 17q12–17q21.1. Polimorfizma rs2305480 in rs7216389 sta eQTL-a za izražanje genov *GSDMB* in *ORMDL3* v krvi, kar kaže na morebitno funkcionalno vlogo v biologiji astme. Polimorfizem rs2305480 je bil predhodno povezan izključno z astmo, ki se prične v otroštvu, medtem ko ni bil povezan z astmo pri odraslih. To se je nakazovalo tudi v naši raziskavi ko smo proučevali povezavo SNP-jev z obdobjem v katerem se astma razvije, vendar je bila povezava z astmo, ki se razvije v otroštvu šibka oz. mejna, zato z našo raziskavo ne moremo potrditi, da rs2305480 doprinese k razvoju astme v otroštvu. Kljub šibki povezavi, ki smo jo ugotovili v naši raziskavi so naši rezultati v skladu z drugimi (Bouzigon in sod., 2008), saj se je alel G nakazoval kot rizičen za razvoj astme. V predhodnih raziskavah so alel T v rs7216389, ki se je nakazoval kot rizičen za astmo v naši raziskavi, povezali s povečanim izražanjem genov *ORMDL3* in *GSDMB*, katerih izražanje je bilo povezano, kar kaže na možno koregulacijo teh dveh genov, ki sodita med glavne kandidatne gene za razvoj astme (Halapi in sod., 2010). Polimorfizem rs7216389 je bil v GWAS, ki je odkrila povezavo 17q12–17q21.1 z astmo, povezan z njenim razvojem pri otrocih (Moffatt in sod., 2007). Povezan je bil

tudi s težko astmo, pri čemer je bil rizičen alel T (Halapi in sod., 2010; Binia in sod., 2011). V raziskavi kjer so proučevali rusko populacijo se je pokazala tudi povezava z astmo pri odraslih, čeprav šibkejša kot povezava z astmo pri otrocih (Karunas in sod., 2011). Z raziskavami afro-ameriške populacije niso potrdili povezave rs7216389 z astmo (Galanter in sod., 2008). Na podlagi drugačne haplotipne strukture med populacijami lahko sklepamo, da rs7216389 ne vpliva na astmo, temveč je verjetno vzrok SNP v LD-ju z njim. Sklepamo lahko, da je pri afro-američanih vzročen SNP oziroma genetska varianta v nižjem LD-ju z rs7216389 kot pri evropski populaciji, pri kateri je povezava med rs7216389 in astmo visoko ponovljiva. Vloga gena *GSDMB* je znana le pri nekaterih vrstah tumorjev, kjer spodbuja invazijo in metastaziranje (Hergueta-Redondo in sod., 2014; Komiyama in sod., 2010).

Polimorfizem rs12936231, ki se nahaja v genu *ZBP2*, v naši raziskavi ni bil statistično značilno povezan z astmo, nakazovala se je le šibka, mejna povezava, zato ne moremo potrditi njegove povezave z astmo pri odraslih. Ravno rs12936231 naj bi bil glavni funkcionalni kandidatni SNP, ki pojasnjuje fenotipsko povezavo z astmo (Verlaan in sod., 2009). Polimorfizem rs12936231 je namreč del regulatornega območja, ki narekuje izražanje večjega števila genov, med njimi *ZBP2*, *GSDMB* in *ORMDL3*. Nahaja se v visoko ohranjenem območju, je vezavno mesto za različne proteine, povzroča spremembo regulatornih motivov in vpliva na razporejanje nukleosoma (Verlaan in sod., 2009). Poleg povezave z astmo, je bil ta SNP povezan tudi z ankilozirajočim spondilitisom, ki je kronična vnetna bolezen (Qui in sod., 2013). Povezan je bil z astmo pri odraslih pri kitajski populaciji, pri čemer se je, kot se je nakazalo v naši raziskavi, kot rizičen izkazal alel C. Dokazali so, da se izražanje genov *ORMDL3* in *GSDMB* sorazmerno večja s številom kopij alela C (Fang in sod., 2011), kar nakazuje na funkcionalno vlogo tega SNP-ja. Ne nazadnje je rs12936231 eQTL za *GSDMB*, *ORMDL3*, *IKZF3* in izražanje drugih genov v krvi.

Polimorfizem rs4795405 v drugem delu naše raziskave ni bil statistično značilno povezan z astmo, nakazovala se je le šibka oz. mejna povezava, zato nismo potrdili rezultatov iz prvega dela raziskave, kjer smo ugotovili, da je rs4795405 povezan z astmo pri odraslih, predvsem z astmo brez pridruženega rinitisa. Kljub temu, da v tem delu raziskave nismo imeli podatkov o rinitisu, sklepamo, da je bila zastopanost bolnikov brez pridruženega rinitisa bistveno manjša kot v prvem delu, glede na podatke, da je rinitis prisoten pri približno 80 % bolnikov z astmo. V prvi del raziskave smo namreč načrtno vključili približno enak delež bolnikov z astmo s pridruženim rinitisom in brez pridruženega rinitisa, saj smo želeli ovrednotiti povezavo rs4795405 brez rinitisa, ki smo jo prvotno ugotovili pri skupini otrok z astmo (Kavalari in sod., 2012). Kot zaščitni se je v drugem delu raziskave nakazal genotip TT, kar je skladno z rezultati naših predhodnih raziskav izvedenih pri odraslih bolnikih z astmo, otrocih in tudi bolnikih s KOPB (Kavalari in sod., 2012; Balantič in sod., 2013). Podobno so ugotovili tudi pri proučevanju ruske populacije bolnikov z astmo, kjer je bil ravno tako rizičen alel C, hkrati je bil v tej raziskavi rs4795405 povezan tako z astmo pri otrocih, kot z

astmo pri odraslih (Karunas in sod., 2011). Druga raziskava je pokazala povezavo izključno z astmo, ki se prične v otroštvu, medtem ko niso potrdili povezave z astmo, ki se prične v odrasli dobi (Bouzigon in sod., 2008). Pri vseh omenjenih raziskavah se je kot rizičen izkazal alel C.

V prvem delu raziskave, v katerem smo preučevali izključno rs4795405 je bilo v skupini zdravih kontrol 4 % manj oseb z genotipom CC (26 % vs. 30 %) ter 4 % več oseb z genotipom TT (27 % vs. 23 %). Podobno smo pri predhodni raziskavi, kjer smo preučevali otroke, ugotovili, da se pri zdravih genotip CC pojavi v 24 % in genotip TT v 30 %. (Kavalar in sod., 2012). Pri vseh treh raziskavah se je pri bolnikih z astmo genotip TT pojavil v 17 %. V populaciji CEU je 30 % oseb z genotipom CC in 17 % oseb z genotipom TT. Ti podatki nakazujejo, da je v slovenski populaciji zdravih % oseb z genotipom TT, ki se je nakazal kot zaščitni, nekaj % višji. Hkrati je bila razporeditev genotipov pri kontrolni skupini v drugem delu raziskave bolj podobna populaciji CEU kot v prvem delu raziskave. Medtem ko se frekvence genotipov rs4795405 niso razlikovale pri skupinah bolnikov z astmo, so se razlikovale pri skupinah zdravih kontrol, kar bi lahko doprineslo k neponovljenemu rezultatu povezave rs4795405 z astmo.

Statistična moč pri analizi povezave posameznih SNP-jev z astmo pri odraslih, pri čemer je bilo vključenih 418 bolnikov in 288 kontrol, je bila zadostna pri analizi z dominantnim genetskim modelom, medtem ko je bila relativno skromna pri analizi z recesivnim genetskim modelom, glede na ugotovljene skromne OR-je. Kljub omejeni moči naših analiz in ugotovljenim šibkim povezavam se rezultati ujemajo z ugotovitvami drugih raziskav (Moffatt in sod., 2007).

Genetske raziskave astme so doprinesle pomemben vpogled v kompleksnost astme, ki je bolezen mnogih fenotipov. Zato iščemo genetske različice, povezane s specifičnimi fenotipi astme, ki bi lahko razložile genetsko osnovo bioloških razlik med različnimi fenotipi astme (Hesselmar in sod., 2012). Tudi v našo raziskavo smo vključili nekatere parametre, ki oblikujejo fenotipe astme in sicer atopijo, pljučno delovanje, astmo, ki se pojavi v otroštvu ali odrasli dobi. Kot okoljski dejavnik, ki bi lahko vplival na razvoj astme smo v analizo vključili vpliv kajenja.

Ko smo proučevali povezavo različnih fenotipov astme (atopija, pljučno delovanje, obdobje v katerem se astma pojavi, kajenje) pri odraslih s 13-imi izbranimi SNP-ji nobena povezava ni bila statistično značilna, zato ne moremo potrditi, da lokus 17q12–17q21.1 doprinese k razvoju specifičnih fenotipov astme oz. k heterogenosti bolezni. Ugotovili smo le šibke, mejne povezave SNP-ja rs2305480, ki se nahaja v genu *GSDMB* in rs8066582, ki se nahaja v genu *PSMD3* z astmo, ki se pojavi v otroštvu. Lokus 17q12–17q21.1 je bil v preteklih raziskavah povezan predvsem z astmo pri otrocih, medtem, ko je povezava z astmo pri odraslih nejasna (Moffatt in sod., 2007; Karunas in sod., 2011). Razlog za različno povezavo SNP-jev z astmo pri otrocih in

astmo pri odraslih je verjetno v različni biologiji astme, saj je heritabilnost astme pri otrocih in odraslih zelo podobna in znaša približno 62 % (de Nijs in sod., 2013). Ker so nekatere raziskave dokazale tudi povezavo SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih (Balantič in sod., 2013; Karunas in sod., 2011) sklepamo, da je pomembna kombinacija ustreznih SNP-jev in sprožilcev, kar vodi v nastanek astme v otroštvu ali v odrasli dobi, kar bo potrebno razjasniti v prihodnjih raziskavah.

Pomemben vpliv na razvoj astme ima tudi kajenje. Polimorfizmi, ki se nahajajo na lokusu 17q12–17q21.1 so bili že v predhodnih raziskavah povezani z astmo, pri kateri so bili bolniki izpostavljeni tobačnem dimu (Bouzigon in sod., 2008). V naši raziskavi nismo našli statistično značilne povezave med 13-imi proučevanimi SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1 in kajenjem pri bolnikih z astmo. Ugotovili smo le šibko, mejno povezavo SNP-ja rs9916279, ki se nahaja v genu *PSMD3*, z astmo pri kadilcih, vendar ne moremo trditi, da kombinacija kajenja in genotipov v rs9916279 doprinese k razvoju astme.

Ugotovljene povezave 13-ih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 so šibke oz. mejne, z nizkimi OR-ji, zato ne moremo potrditi, da posamezni SNP-ji doprinesejo k razvoju astme pri odraslih. Ker so bili proučevani vzorci preiskovancev majhni, je potrebno naše ugotovitve potrditi na vzorcih z večjim številom preiskovancev.

5.2.2 Povezava haplotipov lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih

V primeru, da v enem lokusu obstaja več kandidatnih SNP-jev, ki bi lahko bili odgovorni za razvoj bolezni, kar je značilno za lokus 17q12–17q21.1 in astmo, je v primerjavi z analizo posameznih SNP-jev učinkovitejša analiza haplotipov (Morris in Kaplan, 2002). Haplotipi namreč predstavljajo variacije širšega območja, saj na podlagi strukture LD, zajamemo informacije o večjem številu SNP-jev. Haplotipi predstavljajo naravno zaporedje DNA, ki bi bilo popolno, če bi med SNP-je vrinili še preostale ohranjene nukleotide. V nasprotju s predvidevanjem, da nek SNP povzroča fenotipsko spremembo, domnevamo, da se nekeje v območju, ki ga predstavlja posamezen z boleznijo povezan haplotip, nahaja vzročna varianta oziroma več vzročnih variant. Haplotipi so pomembni za odkrivanje variant, ki povzročajo bolezen, saj se haplotipne strukture ohranjajo med generacijami in tako se znotraj haplotipov prenašajo tudi bolezenske genetske variacije. Ker se haplotipi prenašajo znotraj obolelih družinskih članov, bomo bolezensko variacijo lažje zaznali (Cullen in sod., 1997; Daly in sod., 2001; Stephens in sod., 2001; Wall in Pritchard, 2003).

Posamezni SNP-ji povezani z astmo se v večini primerov nahajajo v ne-kodirajočih območjih kot so introni in intergenska območja. Haplotipi, ki jih predstavljajo SNP-ji in obsegajo 2–15 SNP-jev običajno pokrijejo 20–300 kbp velika območja DNA in predstavljajo variacije v eksonih enega ali več genov, kar pomeni, da s proučevanjem haplotipov analiziramo bistveno več informacij o zaporedju DNA kot pri analizi

posameznih SNP-jev (Morris in Kaplan, 2002). Analiza haplotipov je pomembna predvsem pri SNP-jih, ki so v šibkem LD-ju, saj tako pridobimo bistveno več informacij. Glavna slabost proučevanja haplotipov pri klasični asociacijski raziskavi je nepoznavanje dejanskih vezavnih faz SNP-jev. Zato so bili haplotipi v naši raziskavi konstruirani z orodjem SNPStats, ki zgradi haplotipe po eni izmed najbolj uporabljenih metod, imenovani EM-algoritem.

V naši raziskavi smo analizirali 13 SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1. Z orodjem Haploview (Barrett in sod., 2005) smo določili, da pripadajo trem haplotipnim blokom. Dva izmed treh, sestavljena iz rs12936231, rs2305480, rs7216389, rs3744246 in rs4795405, ki se nahajajo v območju protein-kodirajočih genov *ZPBP2*, *GSDMB*, *ORMDL3* in *LRRC3C* ter rs8079416, rs3893044, rs7219080 in rs8069202, ki se nahajajo v območju protein-kodirajočih genov *LRRC3C* in *GSDMA* nista bila povezana s tveganjem za razvoj astme pri odraslih slovenskih bolnikih.

Čeprav smo pri analizi posameznih SNP-jev našli šibke oz. mejne povezave SNP-jev rs12936231, rs2305480, rs7216389 in rs4795405 z astmo pri odraslih, le-ti v kombinaciji z rs3744246 niso bili povezani z astmo, ko smo analizirali haplotipe. Haplotipi so bili sestavljeni iz petih SNP-jev, pri čemer je najpogostejši haplotip vključeval kombinacijo štirih alelov, ki so se v analizi posameznih SNP-jev nakazovali kot rizični. Peti SNP, rs3744246, pa ni bil povezan z astmo. Morda rs3744246, ki pri analizi posameznih SNP-jev ni bil niti šibko povezan z astmo vpliva na kombinacijo SNP-jev in zabriše učinek preostalih ali pa so bile šibke povezave ugotovljene pri analizi posameznih SNP-jev naključne.

Glavni rezultat naše raziskave je povezava haplotipov enega izmed treh blokov, ki ga sestavljajo SNP-ji rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777 z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Ti SNP-ji se nahajajo v območju genov *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, ki so vpleteni v diferenciacijo belih krvnih celic, predvsem nevtrofilcev (Nalls in sod., 2011). Štirje haplotipi z največjo frekvenco TCCG, TTTA, CCCA in TTCA so bili pogostejši pri bolnikih z astmo, kot pri zdravih kontrolah. Obratno so bili preostali štirje (TTCG, TCCA, TCTA in TTTG), sicer manj pogosti, pogostejši pri zdravih kontrolah kot pri bolnikih z astmo. Ti štirje haplotipi so bili prisotni le pri 3 % bolnikov z astmo, vendar skoraj pri tretjini (31 %) zdravih kontrol (Žavbi in sod., 2016).

Haplotip z največjo frekvenco - TCCG je bil uporabljen kot referenčni haplotip na katerega so bile izvedene vse nadaljnje primerjave. Haplotip TTTCG je bil prisoten le pri 0,6 % bolnikov z astmo, a kar pri 12,2 % zdravih kontrol, kar kaže na visoko zaščitno vlogo ($p < 0,0001$). Haplotip TCCA je bil prisoten le pri 0,3 % bolnikov z astmo, a kar pri 9,5 % zdravih kontrol ($p = 0,0001$) in haplotip TCTA je bil prisoten le pri 0,6 % bolnikov z astmo, a kar pri 7,1 % zdravih kontrol ($p = 0,0001$) (Žavbi in sod., 2016).

V nasprotju z analizo posameznih SNP-jev so haplotipi pokazali bistveno višja tveganja za razvoj astme. Nepričakovano, SNP-ji, ki sestavljajo ta haplotipni blok, niso bili povezani z astmo pri analizi posameznih SNP-jev, kar lahko razložimo z zgoraj opisanim, in sicer, da haplotipi predstavljajo več informacij in variacij lokusa, predvsem pri SNP-jih, ki so v šibkem LD-ju, kar je značilno za SNP-je, ki tvorijo haplotype povezane z astmo v naši raziskavi. Povezava haplotipov z boleznijo je lahko posledica učinka kombinacije SNP-jev, ki je potrebna, da lahko vplivajo na spremenjeno izražanje proteina, kot se je izkazalo za gen, ki kodira IL-4 α (Kruse in sod., 1999). Genetska raznolikost populacij je organizirana v haplotype in ravno haplotipi, in ne posamezni SNP-ji, naj bi bili osnova za fenotipsko variabilnost (Silverman, 2007). Hkrati naj bi bile raziskave, ki vključujejo haplotype učinkovitejše, saj vključujejo tudi možne epistatske interakcije (Liu in sod., 2008). Haplotipi povezani z astmo sami najverjetneje niso funkcionalni element, zato je z molekularno validacijo potrebno raziskati, katera oz. katere od genetskih variant, ki jih pokrivajo haplotipi povezani z boleznijo povzročajo fenotipske vplive (Silverman, 2007).

Sodeč po bioinformacijski analizi z orodjem HaploReg v4 (Ward in Kellis, 2012), so SNP-ji, ki sestavljajo haplotype povezane z astmo v naši raziskavi, v visokem LD-ju ($r^2 > 0,80$) s SNP-ji, ki so vezavna mesta za GATA-1, GATA-2 in GATA-3 proteine in zato povzročajo spremembe v GATA-motivih. GATA-1 in GATA-2 se vežeta na STAT3 in ga inhibirata. Tudi STAT3 se nahaja v območju 17q21.1.31 in je pomemben pri vnetju dihalnih poti, eozinofiliji in vdoru celic Th2 v pljuča (Ezoe in sod., 2005; Simeone-Penney in sod., 2007). Na osnovi teh podatkov lahko sklepamo, da SNP-ji v 17q12–17q21.1 ne vplivajo nujno samo na gene v neposredni bližini, vendar so za potrditev le-tega potrebne funkcionalne raziskave. Izkazalo se je tudi, da sta SNP-ja, ki tvorita haplotip, rs1042658 in rs2302777, eQTL-a za izražanje *GSDMA* v pljučih, medtem ko so vsi štirje SNP-ji eQTL-i za izražanje večih genov v krvi, med drugim *GSDMB*, *ORMDL3*, *IKZF3* in *PSMD3*, kar kaže na morebitno biološko vlogo teh haplotipov v biologiji astme.

Geni *CSF3*, *PSMD3* in *MED24* imajo verjetno pomembno vlogo pri uravnavanju granulocitov. Na mišjih modelih za astmo so pokazali, da tretiranje miši s *CSF3* zmanjša akumulacijo infiltrirajočih eozinofilcev v bronhoalveolarne, peribronhialne in perivaskularne dele pljuč, preprečuje upornost dihal po aplikaciji alergena in ima mnoge vplive na nastajanje citokinov in kemokinov, saj zmanjšuje IL-2, IL-12 in eotaksin v BAL-u. Po tretiranju s *CSF3*, so v plazmi našli povečane koncentracije nevtrofilnega atraktanta KC in znižan IL-5. Hkrati je *CSF3* preprečil nastajanje eozinofilcev v kostnem mozgu izzvanih miši ter stimuliral nastajanje nevtrofilnih kolonij. To kaže, da *CSF3* pomembno vpliva na eozinofilce v pljučih in v kostnem mozgu (Queto in sod., 2011). Druge raziskave so pokazale na vlogo *CSF3* v ekspanziji in zorenju nevtrofilnih populacij (Shochat in sod., 2007). Gena *CSF3* in *PSMD3* sta bila povezana s številom limfocitov in nevtrofilcev (Okada in sod., 2010). V raziskavi genskega podpisa Th2 pri bolnikih z astmo so odkrili povišano izražanje citokinov in kemokinov Th2, to so *IL13*,

CCL13 ter *CCL26* in znižano izražanje *CSF3*, *IL12A*, *CXCL6* in *CXCL11* (Choy in sod., 2010), ki so udeleženi v imunskem odzivu Th1. Polimorfizmi genov *PSMD3* in *MED24* so bili v nedavni raziskavi povezani s koncentracijami serumskega fosfatidilholina pri bolnikih z astmo (Reid in sod., 2013). Fosfatidilholin je pomembna sestavina celične membrane in je pljučni surfaktant, ki zmanjšuje površinsko napetost na prehodu zrakotkivo in predstavlja bariero za inhalacijske alergene.

V preteklih raziskavah je bilo nekaj haplotipov lokusa 17q12–17q21.1 že povezanih z astmo, čeprav so se mnoge raziskave osredotočile le na analizo posameznih SNP-jev. Z analizo haplotipov gena *ORMDL3* na češki populaciji bolnikov z astmo, so ugotovili le mejno povezavo (Hrdilckova in Holla, 2011). Pri proučevanju kitajske populacije bolnikov z astmo so našli povezavo med astmo in haplotipi sestavljenimi iz SNP-jev, ki se nahajajo v genih *ORMDL3*, *GSDMB*, *ZPBP2* in *IKZF3* (Fang in sod., 2011), vendar z bistveno nižjimi razmerji obetov, kot pri naši raziskavi.

Rezultati naše raziskave potrjujejo pomemben doprinos lokusa 17q12–17q21.1 k tveganju za astmo pri odraslih in poudarjajo pomen analize haplotipov, poleg posameznih SNP-jev, za proučevanje genetskega ozadja astme. Iz navedenih bioloških vlog lahko sklepamo, da je povezava haplotipov, ki se nahajajo v genih *CSF3*, *PSMD3* in *MED24* z astmo smiselna, vendar bi bile potrebne dodatne raziskave, ki bi omogočile določitev SNP-ja ali druge genetske variante, ki je vzrok povezavi haplotipov z astmo, ki smo jo odkrili. Hkrati rezultati naše raziskave poleg že znanih kandidatnih genov za astmo kot so *ORMDL3*, *GSDMB* in *ZPBP2* postavljajo v ospredje nove, pri astmi slabo proučene gene - *CSF3*, *PSMD3* in *MED24* (Žavbi in sod., 2016).

5.3 POVEZAVA SNP-JEV V GENU *VEGFA* Z ODZIVOM OTROK NA ZDRAVLJENJE ASTME

VEGFA je dimerni glikoprotein, ki ima glavno vlogo pri nastajanju novih krvnih žil. Pri bolnikih z astmo so odkrili povečane koncentracije *VEGFA*, ki so bile v obratnem sorazmerju s pljučnim delovanjem in v sorazmerju s preodzivnostjo dihal (Horvath in Wanner, 2006). Domnevamo, da *VEGFA* pri astmi doprinese k obstrukciji dihal preko uravnavanja vnetja, povečevanja prepustnosti žil, spodbujanja nastajanja citokinov odziva Th2, mukozne metaplazije, hiperplazije gladkega mišičevja ter parenhimalnega in žilnega preoblikovanja (Wang in sod., 2008; Lee K.S. in sod., 2004). Vloga *VEGFA* pri astmi še ni popolnoma jasna.

VEGFA je ena izmed posrednih tarč pri zdravljenju astme. Zdravljenje astme z IK in LTRA namreč vodi do znižanja sicer povečanih koncentracij *VEGFA* (Lee K.S. in sod., 2004). *VEGFA* je vpleten v številne biološke procese na katere vpliva zdravljenje z IK, med njimi vazodilatacijo, mikrovaskularno permeabilnost in angiogenezo (Zanini in sod., 2010). Eozinofilci in mastociti pri nekaterih tipih astme sproščajo vnetne molekule, ki jih imenujemo levkotrieni. Tudi levkotrieni doprinesejo k povečanemu

izražanju VEGFA, kar podpira tudi dejstvo, da se VEGFA vrne v normalno raven po zdravljenju z LTRA (Poulin in sod., 2011). To kaže, da različna zdravljenja, ki se uporabljajo za astmo, vplivajo na VEGFA. Zato je *VEGFA* eden izmed zanimivih kandidatnih genov na področju farmakogenetike astme, kjer poskušamo odkriti gene ali SNP-je, ki bi bili povezani z odgovorom na zdravljenje astme. Odziv bolnikov z astmo na zdravljenje je namreč zelo raznolik. Domnevajo, da bi lahko genetsko ozadje pomembno doprineslo k raznolikosti v odzivu (Silverman in sod., 2001). Polimorfizem rs2146323 v genu *VEGFA* je bil povezan z odzivom na IK (Sharma in sod., 2009).

V našo raziskavo smo vključili otroke z astmo, ki so prejeli bodisi IK flutikazon propionat bodisi LTRA montelukast redno ali po potrebi. V naši raziskavi smo analizirali povezavo med SNP-jema rs2146323 in rs833058, ki se nahajata v genu *VEGFA* in odgovorom otrok z astmo na zdravljenje po šestih in 12 mesecih zdravljenja. Kot merilo izboljšanja smo uporabili spremembo v % predvidene normalne vrednosti FEV1, za katerega je bilo že prej dokazano, da je obratno sorazmeren s koncentracijami VEGFA (Sharma in sod., 2009) ter razmerje FEV1/FVC, na podlagi katerega ugotavljamo obstrukcijo dihalnih poti. Odkrili smo statistično značilno povezavo med rs2146323 in spremembo v % predvidene normalne vrednosti FEV1 po šestih in 12 mesecih zdravljenja z IK. Z recesivnim genetskim modelom smo ugotovili, da so bolniki zdravljeni z IK, ki so homozigoti za manj pogost alel A kazali večje izboljšanje v % predvidene normalne vrednosti FEV1, v primerjavi s kombiniranimi heterozigoti in pogostejšimi homozigoti, AC+CC, v obeh časovnih točkah, po šestih in 12 mesecih zdravljenja. Nasprotno, je imelo 60 % bolnikov z genotipom AA v rs2146323 po 12 mesečnem zdravljenju z LTRA neurejeno astmo, v primerjavi z 10 % bolnikov z genotipom AC+CC (Balantič in sod., 2012).

Ti podatki kažejo, da se bolniki z genotipom AA v rs2146323 bolje odzivajo na zdravljenje z IK v primerjavi z LTRA. Podobno so pokazali tudi Sharma in sod., ki so ugotovili, da so imeli bolniki z genotipom CC v rs2146323 po 4 letih zdravljenja z IK podobno razmerje FEV1/FVC kot nezdravljene kontrole, medtem, ko se je bolnikom z genotipom AA pljučno delovanje izboljšalo (Sharma in sod., 2009).

V naši raziskavi smo našli tudi povezavo med SNP-jem rs833058 v *VEGFA* in spremembo % predvidene normalne vrednosti FEV1 po 12 mesecih zdravljenja pri bolnikih, ki so se zdravili z LTRA po potrebi. Bolniki z genotipom TT v rs833058 so imeli večjo spremembo v pljučnem delovanju v primerjavi z bolniki z združenimi genotipi CT+CC. Razlike v odzivu na zdravljenje glede na SNP-je bi lahko bile posledica delovanja samega zdravila na tarčne molekule ali različnih podtipov astme.

Funkcionalna vloga proučevanih SNP-jev v genu *VEGFA*, rs2146323 in rs833058, ni znana. S spletnimi orodji, kot sta PolyPhen (Adzhubei in sod., 2010) in SnpEff (de Baets in sod., 2011), ki omogočajo predvidevanje vloge različnih genetskih variant nismo ugotovili na kakšen način bi lahko vplivala na protein. SNP rs2146323 se namreč

nahaja v intronu gena *VEGFA*, rs833058 pa navzgor od gena *VEGFA*. Z orodjem HaploReg v4 (Ward in Kellis 2012) smo ugotovili, da rs2146323 spremeni motiv za vezavo transkripcijskega dejavnika p53. Nedavno je bilo pokazano, da p53 vpliva na izražanje *VEGFA* (Farhang in sod., 2013). Polimorfizem rs833058 spremeni motive za vezavo promotorskih ojačevalcev prepisovanja in povzroči spremembe v motivih za vezavo TF-jev. S pomočjo orodja SNAP (Johnson in sod., 2008) smo ugotovili nizek LD ($r^2 = 0,21$; $D' = 0,90$) med analiziranimi SNP-jema, kar podpira njuno različno povezavo z odzivom na zdravljenje.

Do sedaj se je večina farmakogenetskih raziskav o učinkovitosti IK pri astmi osredotočila na kortikosteroidne receptorje ali druge tarče v kortikosteroidni poti (Tantisira in sod., 2004; Tantisira in sod., 2005). Vendar je tudi gen *VEGFA*, ena izmed pomembnih tarč teh zdravil, saj kortikosteroidi znižujejo koncentracije VEGFA. Na celičnih kulturah humanih žilnih gladkih celic so dokazali sorazmerno znižanje izražanja mRNA *VEGFA* z naraščajočimi koncentracijami kortikosteroida deksametazona (Nauck in sod., 1998). Tudi pri bolnikih z astmo so zaznali znižane koncentracije VEGFA v izmečku po aplikaciji IK. Čeprav VEGFA ni neposredna tarča terapij, ki se uporabljajo pri zdravljenju astme, imajo znižane koncentracije VEGFA, kot posledica zdravljenja, pozitivne učinke na bolnike (Feltis in sod., 2007). Trenutno se neposredno anti-VEGF zdravljenje uporablja za zdravljenje nekaterih vrst rakov, vendar ima tovrstno zdravljenje mnogo stranskih učinkov, kot so poškodbe ledvic, krvavitve, diareja, dermatitis in levkopenija (Izzedine, 2014; Kamba in McDonald, 2007). V prihodnosti bi z izboljšanjem lokalizacije delovanja anti-VEGF zdravil, potencialno lahko le-te uporabili tudi pri zdravljenju astme (Rothenberg, 2004), pri čemer bi morda lahko kot pomoč pri izbiri bolnikov uporabili farmakogenetske označevalce, kot sta SNP-ja rs2146323 in rs833058 v genu *VEGFA*.

Rezultati naše raziskave jasno kažejo, da genetska variabilnost pomembno doprinese k odzivu bolnikov z astmo na zdravljenje z IK in LTRA. Farmakogenetske raziskave so zelo pomembne pri odkrivanju bolnikov, ki se na neko zdravljenje ne odzivajo, še posebno pri pogostih kroničnih boleznih kot je astma (Ruggiero in sod., 2011). Ker je bila naša raziskava izvedena na majhnem številu bolnikov, bi bilo potrebno rezultate ponoviti na večji skupini bolnikov zdravljenih z IK, pri čemer bi bilo potrebno vključiti še skupino bolnikov, ki bi prejemale placebo. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno narediti tudi analizo, kjer bi skupina bolnikov prejemale zdravljenje glede na genotip v rs2146323 v primerjavi s skupino, ki bi prejemale IK naključno. S tem bi lahko ovrednotili dejansko uporabno vrednost naših rezultatov.

Kortikosteroidi aktivirajo glukokortikoidni receptor, ki posredno ali neposredno vpliva na izražanje tarčnih genov. Ocenjujejo, da lahko vpliva na izražanje do 100 genov v celici. Spremenjena transkripcija je lahko posledica vezave z različnimi TF-ji ali kompleksi, ki vplivajo na preoblikovanje kromatina. Večina genov, ki so aktivirani pri astmi nima specifične sekvence za vezavo glukokortikoidnega receptorja v svojih

promotorjih, vendar vseeno prihaja do zmanjšane prepisovanja, zato domnevajo da kortikosteroidi verjetno delujejo navzdol od promotorjev. Domnevajo, da naj bi kortikosteroidi pomembno vplivali na strukturo kromatina z interakcijo z dejavniki, ki inhibirajo acetilacijo, metilacijo in fosforilacijo histonov (Barnes in Adcock, 2003). Preučevan SNP rs2146323 se nahaja v območju kamor se vežejo H3K4me1 in H3K27ac v pljučih in drugih tkivih in celicah, kar nakazuje na prisotnost ojačevalcev transkripcije na tem območju. Kljub slabo poznani vlogi SNP-jev, ki se nahajajo v teh območjih je bilo za nekatere že pokazano, da vplivajo na prepisovanje genov. Eden izmed primerov je funkcionalni SNP rs12821256, ki se nahaja v ojačevalcu za prepisovanje gena *KITLG*, ki vpliva na razvoj lasnih foliklov (Guenther in sod., 2014). Tako bi bil lahko tudi rs2146323 povezan z aktivnostjo ojačevalcev, vendar so za to potrebne funkcionalne raziskave.

Čeprav smo v naši raziskavi ugotovili povezavo med SNP-ji v genu *VEGFA* in odzivom na zdravljenje z IK in LTRA ne moremo pojasniti na kakšen način bi omenjeni terapiji lahko vplivali na *VEGFA*, saj ni znano kakšna naj bi bila interakcija na nivoju protein/učinkovina med *VEGFA* in IK oz. LTRA. Znano je, da zdravljenje znižuje koncentracije *VEGFA* pri bolnikih z astmo, saj vpliva tako na samo izražanje mRNA kot tudi na zniževanje koncentracij proteina. Sklepamo, da lahko pri bolnikih prihaja do razlik v koncentraciji ali strukturi *VEGFA* ali pa SNP-ji, ki so povezani z odzivom dejansko odražajo različne fenotipe astme, ki se različno odzivajo na zdravljenje. Slabost naše raziskave je majhen vzorec proučevanih bolnikov glede na dva proučevana SNP-ja in tri izide zdravljenja. Po delitvi bolnikov glede na genotipe so bile nekatere skupine zelo majhne, kar bi lahko vplivalo na najdene povezave. Da bi lahko zagotovo potrdili povezavo SNP-jev v genu *VEGFA* z odzivom na zdravljenje je potrebno rezultate potrditi na večji populaciji preiskovancev z namenom doseganja boljše statistične moči ter ovrednotiti funkcionalno vlogo le-teh. Kljub omejenemu znanju o funkcionalnosti SNP-jev v genu *VEGFA* in interakciji z IK oz. LTRA najdeno povezavo lahko potrdimo s predhodnimi ugotovitvami, kjer so ugotovili, da je rs2146323 povezan z odzivom na zdravljenje z IK (Sharma in sod., 2009), kot se je izkazalo v naši raziskavi.

S farmakogenetskimi raziskavami astme trenutno lahko razložimo le majhen del variabilnosti v odzivu na zdravljenje. Na farmakogenetske asociacije lahko vpliva več dejavnikov, na primer interakcije med geni in genetsko ozadje populacij. Morda bomo v prihodnosti našli nove SNP-je ali kombinacije SNP-jev, ki bodo razložili večji del fenotipske variabilnosti v odzivu. Tudi za razumevanje farmakogenetike astme je potrebno v prihodnjih raziskavah natančneje opredeliti fenotipe oziroma endotipe astme, saj je lahko različna biologija fenotipov astme eden ključnih dejavnikov pri razumevanju genetske podlage za različen odziv na zdravljenje.

Rezultati naše preiskave kažejo, da je *VEGFA* pomemben farmakogenetski gen, pri odzivu otrok z astmo na zdravljenje z IK. Izkazalo se je, da se bolniki z genotipom AA

v rs2146323 bolje odzivajo na zdravljenje z IK v primerjavi z bolniki z genotipi AC+CC. Hkrati so imeli bolniki z genotipom AA po zdravljenju z LTRA v večji meri neurejeno astmo, kar nakazuje da bi bili lahko učinkoviteje zdravljeni z IK. Alel T v rs833058 pa je bil povezan z boljšim odzivom na zdravljenje z LTRA (Balantič in sod., 2012). Hkrati povezava odziva na zdravljenje z različnimi terapijami z genom *VEGFA* nakazuje, da bi bilo morda v prihodnosti anti-VEGFA zdravljenje učinkovito pri določenih bolnikih z astmo, ki bi jih morda lahko prepoznali na osnovi genotipov v genu *VEGFA*.

5.4 ZAKLJUČNA RAZPRAVA

Astma je kompleksna heterogena bolezen. V naši raziskavi smo pokazali, da so geni lokusa 17q12–17q21.1 povezani z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Eden izmed SNP-jev, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4*, rs4795405, je bil povezan z astmo. V nadaljevanju se je izkazalo, da povezan predvsem s fenotipom astme, ki ji ni pridružen rinitis. Polimorfizem rs4795405 je bil povezan tudi s KOPB, pri čemer je bil povezan z lažjo obliko KOPB oziroma boljšim pljučnim delovanjem. Ker so doprinosi posameznih SNP-jev majhni, a vendar ponovljivi, domnevamo, da k astmi prispevajo številni geni hkrati in da različni geni vplivajo na izražen fenotip astme. V drugem delu raziskave, na drugi skupini bolnikov, smo ugotovili, da je lokus 17q12–17q21.1 povezan z astmo pri odraslih, saj smo našli močno povezavo haplotipov, ki jih sestavljajo SNP-ji rs9916279, rs8066582, rs1042658, rs2302777 in se nahajajo v genih *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, z astmo pri odraslih. Hkrati nismo našli statistično značilne povezave posameznih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 z astmo pri odraslih. Polimorfizmi rs12936231 v *ZBP2*, rs7216389 in rs2305480 v *GSDMB*, rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4* in rs7219080 v *GSDMA* so bili le šibko oz. mejno povezani z astmo, zato ne moremo potrditi, da doprinesejo k astmi pri odraslih. V drugem delu raziskave torej nismo potrdili ugotovitve iz prvega dela, da je rs4795405 povezan z astmo, predvsem z astmo brez rinitisa. V tem delu raziskave nismo imeli podatkov o prisotnosti rinitisa. Ko smo proučevali različne fenotipe astme v povezavi s SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1 nismo našli statistično značilnih povezav. Nakazala se je le šibka oz. mejna povezava SNP-jev, rs2305480 v *GSDMB* in rs8066582 v *PSMD3* z astmo, ki se pojavi že v otroštvu in mejna povezava rs9916279 v *PSMD3* z astmo pri kadilcih. Razen doprinosa rs4795405 k razvoju astme brez rinitisa, ne moremo potrditi doprinosa 13-ih preučevanih SNP-jev lokusa 17q12–17q21.1 k heterogenosti astme. Noben izmed 13-ih SNP-jev ni bil niti mejno povezan z atopijsko astmo ali pljučnim delovanjem. Zaključimo lahko, da s proučevanjem haplotipov poleg posameznih SNP-jev lahko najdemo močnejše povezave z astmo, saj na ta način zajamemo variacije v večjem delu lokusa. S tem pristopom smo ugotovili, da so poleg že znanih kandidatnih genov za astmo, kot so *GSDMA*, *ORMDL3* in *GSDMB*, lahko pomembni tudi drugi, kot so *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*. Nadaljnje proučevanje genetike astme sklopljeno z računalniško analizo bo morda lahko ovrednotilo doprinos seštevka različnih genetskih variant k astmi. Kot se je nakazovalo tudi v naši raziskavi je

pomembno v raziskave genetike astme vključiti tudi različne fenotipe astme, saj so genetski razlogi za pojav posameznih fenotipov lahko različni. Morda bo definiranje endotipov astme prineslo boljše razumevanje genetike astme ter večjo ponovljivost med različnimi raziskavami. V zadnjih petih letih se je pogled na genetiko astme zelo spremenil. Pred prvo GWAS leta 2007 je bila genetika astme proučevana večinoma na podlagi analize kandidatnih genov. Od takrat dalje so rezultati GWAS bistveno pomembnejši kot rezultati analize kandidatnih genov. Poudarja se pomen proučevanja različnih populacij, dejavnikov okolja, zadostne velikosti vzorcev ter definiranja fenotipov in endotipov astme. Najnovejše hipoteze predvidevajo, da k razvoju astme dejansko doprinesejo redke variante, ki jih lahko odkrijemo z metodami sekvencioniranja naslednje generacije in bodo v prihodnosti verjetno prinesle nov vpogled v genetiko astme. Proučevanje genetike astme je prineslo odkritje o številnih genih ponovljivo povezanih z astmo, ki verjetno vplivajo na njeno patogenezo, a je njihova biološka vpletenost v astmo mnogokrat še nejasna. Zaradi številnih bolnikov z astmo je pomemben vidik proučevanja tudi povezava odziva na različne terapije, ki se uporabljajo za zdravljenje astme in genetskih označevalcev, na podlagi katerih bi lahko predvideli odziv na zdravljenje astme brez predhodnega preizkušanja učinkovitosti zdravljenja. Izkazalo se je namreč, da se mnogi bolniki ne odzivajo na določeno zdravljenje in da je ta odziv ponovljiv, zato domnevamo, da obstaja genetska podlaga. Do sedaj so odkrili nekaj genov povezanih z odzivom na zdravljenje astme, a vendar so kot pri proučevanju astme, doprinosi genov majhni. V naši raziskavi smo odkrili, da sta SNP-ja rs2142363 in rs833058, ki se nahajata v genu *VEGFA* povezana z odzivom otrok na zdravljenje. To pomeni, da bi ta dva SNP-ja z ustreznimi validacijami lahko uporabili za izbiro vrste zdravljenja. To odkritje hkrati potrjuje vlogo *VEGFA* pri astmi. Morda bi na podlagi teh SNP-jev lahko izbrali bolnike za anti-VEGFA zdravljenje pri določenih bolnikih z astmo. Zaključimo lahko, da sta genetika in farmakogenetika astme, kljub mnogim raziskavam še vedno nejasni, a so kljub temu odkriti številni geni, ki prispevajo k razvoju astme in tako prinašajo vpogled v biologijo astme ter razumevanje astme, kot kompleksne bolezni z mnogimi fenotipi.

6 SKLEPI

V sklopu doktorske disertacije smo sklenili sledeče ugotovitve:

Na podlagi proučevanja SNP-ja rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4*, lahko zaključimo naslednje:

- Polimorfizem rs4795405, ki je bil v predhodnih raziskavah večinoma povezan z astmo pri otrocih, je povezan tudi z astmo pri odraslih.
- Fenotipska analiza je pokazala, da je SNP rs4795405 pomembno povezan predvsem z astmo brez rinitisa.
- Kot prvi smo pokazali, da je SNP rs4795405 povezan tudi s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB).

Navedeni zaključki vodijo v potrditev prve hipoteze, da je SNP rs4795405 povezan z astmo in KOPB pri odraslih.

Na podlagi proučevanja lokusa 17q12–17q21.1 lahko zaključimo naslednje:

- Haplotipi, ki jih sestavljajo SNP-ji rs9916279, rs8066582, rs1042658, rs2302777, ki se nahajajo v genih *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, so pomembno povezani z astmo pri odraslih.
- Na nivoju povezave posameznih SNP-jev so ugotovljene povezave z astmo šibke oziroma mejno statistično značilne, zato ne moremo potrditi njihovega doprinosa k astmi pri odraslih. Nakazane so naslednje povezave: rs12936231 v *ZPBP2*, rs7216389 in rs2305480 v *GSDMB*, rs4795405, ki se nahaja navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4* in rs7219080 v *GSDMA*. S fenotipsko analizo so nakazane naslednje povezave: rs2305480 v *GSDMB* in rs8066582 v *PSMD3* z astmo, ki se prične v otroštvu in rs9916279 v *PSMD3* z astmo pri kadilcih. Atopija in pljučno delovanje pri bolnikih z astmo nista povezana s proučevanimi SNP-ji.

Navedeni zaključki vodijo v potrditev druge zastavljene hipoteze, da je lokus 17q12–17q21.1 povezan z astmo pri odraslih, vendar ni povezan s fenotipi astme.

Na podlagi proučevanja SNP-jev v genu *VEGFA* lahko zaključimo naslednje:

- Polimorfizma rs2146323 in rs833058 sta povezana z odgovorom na zdravljenje otrok z astmo, ki so zdravljeni z inhalacijskimi kortikosteroidi (IK) ali z antagonisti receptorjev za levkotriene (LTRA). Otroci z genotipom AA v rs2146323 imajo večje izboljšanje pljučnega delovanja po zdravljenju z IK in večji delež neurejene astme po zdravljenju z LTRA v primerjavi z nosilci alela C. Genotip TT v rs833058 je povezan z večjim izboljšanjem pljučnega delovanja pri otrocih, ki prejemajo LTRA po potrebi.

Navedeni zaključki vodijo v potrditev tretje zastavljene hipoteze, da sta SNP-ja rs2146323 in rs833058 v genu *VEGFA* farmakogenetska označevalca pri astmi.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Za astmo je značilna družinska obremenjenost. Kljub številnim raziskavam, genetsko ozadje astme ostaja nepojasnjeno. Domnevamo, da k njenemu razvoju doprinesejo številni geni z majhnimi učinki. V naši raziskavi smo pri odraslih slovenskih bolnikih z astmo proučevali SNP rs4795405, ki se nahaja na lokusu 17q12–17q21.1, navzgor od *ORMDL3* v *RP11-387H17.4*. Ugotovili smo, da je rs4795405 povezan z astmo pri odraslih. Izkazalo se je, da je ta SNP povezan predvsem z astmo brez rinitisa, s čimer smo potrdili rezultate predhodne raziskave pri otrocih. Ker je bilo v preteklosti pokazano, da je za astmo brez rinitisa značilna manj reverzibilna obstrukcija dihalnih poti, ki je sicer značilna za bolnike s KOPB, smo ta SNP preiskovali še na skupini bolnikov s KOPB. Izkazalo se je, da je rs4795405 povezan tudi s KOPB in da je rizični alel skladen z rizičnim alelom za astmo. Hkrati je to prva raziskava, v kateri smo proučevali SNP, ki se nahaja na kandidatnem lokusu za astmo 17q12–17q21.1 pri bolnikih s KOPB. V drugem delu smo naše raziskovanje razširili na večji del lokusa 17q12–17q21.1, tako da smo analizirali 13 SNP-jev na drugi skupini bolnikov z astmo. Pri proučevanju posameznih SNP-jev noben izmed 13-ih SNP-jev ni bil statistično značilno povezan z astmo pri odraslih. Nakazovale so se le šibke, mejne povezave z naslednjimi SNP-ji: rs12936231, ki se nahaja v genu *ZPBP2*, rs2305480 in rs7216389, ki se nahajata v genu *GSDMB*, ter rs7219080, ki se nahaja v genu *GSDMA*. Nakazovala se je tudi povezava rs4795405 s celotno skupino bolnikov z astmo, saj v tem delu raziskave nismo imeli podatkov o prisotnosti rinitisa pri bolnikih z astmo. Ker nobena izmed povezav ni bila statistično značilna ne moremo potrditi vloge posameznih SNP-jev pri odraslih z astmo. Tudi pri proučevanju povezave med fenotipi astme in 13-imi SNP-ji lokusa 17q12–17q21.1 nismo ugotovili statistično značilnih povezav z atopijo, pljučnim delovanjem, obdobjem, ko se astma razvije in kajenjem, zato ne moremo potrditi vloge teh SNP-jev pri heterogenosti astme. Najpomembnejši rezultat naše raziskave je močna povezava haplotipov lokusa 17q12–17q21.1 z astmo. Eden izmed treh blokov haplotipov je bil povezan z astmo pri odraslih slovenskih bolnikih. Sestavljajo ga rs9916279, rs8066582, rs1042658 in rs2302777, ki se nahajajo v genih *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*. Haplotipi z največjo frekvenco - TCCG, TTTA, CCCA in TTCA so bili pogostejši pri astmi kot pri zdravih kontrolah, medtem ko so bili preostali haplotipi TTCC, TCCA, TCTA in TTTG pogostejši pri zdravih kontrolah, in so predstavljali kar 31 % zdravih kontrol v primerjavi s 3 % bolnikov. Z povezavo haplotipov smo potrdili doprinos lokusa 17q12–17q21.1 k astmi pri odraslih. Domnevamo, da se neke v haplotipnem bloku nahaja genetska varianta ali kombinacija variant, ki doprinesejo k astmi pri odraslih. Hkrati smo z analizo haplotipov zaznali, da bi tudi geni *PSMD3*, *CSF3* in *MED24*, ki se pri analizi posameznih SNP-jev niso izkazali kot pomembni, lahko doprinesli k biologiji astme in do sedaj še niso bili proučevani. Za zdravljenje astme se uporabljajo različne terapije. Izkazalo se je, da imajo pomemben vpliv na VEGFA, zato smo proučevali povezavo SNP-jev rs2146323

in rs833058 v genu *VEGFA* z odzivom otrok z astmo na zdravljenje z IK in LTRA. Izkazalo se je, da je genotip AA v rs2146323 povezan z boljšim odzivom bolnikov na zdravljenje z IK, vendar slabšim odzivom na zdravljenje z LTRA, kar nakazuje da bi bolniki z genotipom AA lahko bili učinkoviteje zdravljeni z IK. Genotip TT v rs833058 je bil povezan z boljšim odzivom pri bolnikih, ki so bili zdravljeni z LTRA po potrebi. Ti rezultati kažejo, da so SNP-ji v genu *VEGFA* lahko farmakogenetski označevalci pri astmi.

Astma po več kot 15 letih intenzivnega genetskega proučevanja še vedno ostaja uganka. Glavno odkritje, ki so ga prinesle genetske raziskave je pogled na astmo kot neenotno bolezen, kar smo potrdili tudi mi, saj je bil rs4795405 povezan le z astmo brez rinitisa. Povezan je bil tudi s KOPB, kar nakazuje na skupne genetske označevalce. Lokus 17q12–17q21.1 je eden izmed najmočnejših lokusov povezanih z astmo in v naši raziskavi smo potrdili njegovo povezavo z astmo pri odrasli slovenski populaciji, saj smo odkrili močno povezavo haplotipov, ki se nahajajo v genih *PSMD3*, *CSF3* in *MED24* in so morda pomembni pri razvoju astme. Pokazali smo tudi, da je *VEGFA* pomemben farmakogenetski gen za astmo, katerega bi bilo potrebno dalje preučiti.

7.2 SUMMARY

Family history is very important in asthma. Despite numerous studies, its genetic background remains unsolved. It is assumed that numerous genes with small effects contribute to asthma development. In our study, we have analysed SNP rs4795405, located in 17q12–17q21.1 locus, upstream of *ORMDL3* in *RP11-387H17.4*, in Slovenian adult patients with asthma. We found rs4795405 to be associated with asthma. It has revealed that rs4795405 is specifically associated only with asthma without rhinitis, what confirms our previous findings in children with asthma. It has been previously shown that fixed obstruction characterizes asthma without rhinitis, what is also typical for COPD. Thus, we further analysed rs4795405 in COPD patients. These SNP was found to be associated also with COPD, with a risk allele identical to asthma. Nevertheless, this was the first study analysing 17q12–17q21.1 SNP in COPD patients. Due to rs4795405 association found, we have additionally analysed a larger region of 17q12–17q21.1 locus in other group of asthma patients. We have analysed 13 SNPs in adult Slovenian patients with asthma. No significant association was found with asthma in adults in single SNP analysis. There were only marginal associations found between rs12936231 in *ZPBP2*, rs2305480 and rs7216389 in *GSDMB*, rs7219080 in *GSDMA*, rs4795405 located upstream of *ORMDL3* in *RP11-387H17.4* and asthma, thus we cannot conclude that analysed single SNPs contribute to asthma in adults. We have not confirmed association between asthma and rs4795405 found in first part of the analysis. The reason could be in smaller portion of patients without rhinitis in this part of the analysis. In the first part approximately equal number of patients with and without rhinitis was included, while in second part a general population of asthma patients was

analysed, for which a higher prevalence of rhinitis is typical. None of 13 analysed SNPs was significantly associated with asthma phenotypes, specifically atopy, lung function, asthma in childhood or smoking. Thus we cannot conclude that 13 SNPs analysed contribute to asthma heterogeneity. The most important result found in our study is a strong association found between haplotypes constructed of analysed SNPs and asthma in adult Slovenian patients, what confirms a role of locus 17q12–17q21.1 in asthma in adults. One of three haplotype blocks was highly associated with asthma. It was composed of rs9916279, rs8066582, rs1042658 and rs2302777, located in genes *PSMD3*, *CSF3* and *MED24*. Haplotypes with the highest frequency TCCG, TTTA, CCCA and TTCA were more frequent in asthma compared to healthy controls, whereas the remaining haplotypes TTCC, TCCA, TCTA and TTTG were more frequent in healthy controls. TTCC, TCCA, TCTA and TTTG haplotypes were found in 31% of healthy controls compared to only 3% of asthma patients. We assume there is a variant or a combination of variants located in associated haplotype that could have a major impact on asthma. Furthermore, genes *PSMD3*, *CSF3*, *MED24* were not found to be important in adult asthma in single SNP analysis, whereas they were found to be highly important in haplotype analysis. These three genes are poorly studied but could have a biological role in asthma, thus making them interesting targets for further research. For asthma treatment, different therapies are used. One of the targets of asthma treatment is VEGFA. Elevated levels were found in asthma patients, which decreased after treatment, thus we analysed SNPs rs2146323 and rs833058 located in *VEGFA* gene and treatment response in children with asthma treated with ICS or LTRA. It has revealed that patients with AA genotype in rs2146323 had better response when treated with ICS. In contrast, AA genotype was associated with worst response to LTRA. These findings suggest that patients with AA genotype in rs2146323 could be more efficiently treated with ICS. Furthermore, genotype TT in rs833058 was associated with better response in patients receiving LTRA episodically. These results show that *VEGFA* gene is a prominent marker for personalized asthma treatment.

After more than 15 years of asthma genetics research, its genetic background still remains an enigma. The main overall observation of those studies is that asthma is a heterogeneous disease, what was also confirmed in our research, where rs4795405 was associated only with asthma without rhinitis. We have also shown that rs4795405 is associated with COPD, what suggests shared genetic background between both diseases. In our research we have also confirmed asthma association with one of the most highly replicated locus – 17q12–17q21.1. We found that haplotypes located in *PSMD3*, *CSF3* and *MED24* are highly associated with asthma and could be important in asthma development. Finally, we have shown that *VEGFA* is a prominent asthma pharmacogenetic gene that should be further studied.

8 VIRI

- Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7, 4: 248–249
<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml> (7. april 2016)
- Agache I., Akdis C., Jutel M., Virchow J.C. 2012. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*, 67, 7: 835–846
- Akey J., Jin L., Xiong M. 2001. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain? *European Journal of Human Genetics*, 9, 4: 291–300
- Alangari A.A. 2010. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Annals of Thoracic Medicine*, 5, 3: 133–139
- Allen M., Heinzmann A., Noguchi E., Abecasis G., Broxholme J., Ponting C.P., Bhattacharyya S., Tinsley J., Zhang Y., Holt R., Jones E.Y., Lench N., Carey A., Jones H., Dickens N.J., Dimon C., Nicholls R., Baker C., Xue L., Townsend E., Kabesch M., Weiland S.K., Carr D., von Mutius E., Adcock I.M., Barnes P.J., Lathrop G.M., Edwards M., Moffatt M.F., Cookson W.O. 2003. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nature Genetics*, 35, 3: 258–263
- Asai K., Kanazawa H., Kamoi H., Shiraishi S., Hirata K., Yoshikawa J. 2003. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. *Clinical & Experimental Allergy*, 33, 5: 595–599
- Asthma, COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS). 2015. Global Initiative for Asthma (GINA): 18 str.
<http://www.ginasthma.org/documents/14> (12. januar 2016)
- Balaci L., Spada M.C., Olla N., Sole G., Loddo L., Anedda F., Naitza S., Zuncheddu M.A., Maschio A., Altea D., Uda M., Pilia S., Sanna S., Masala M., Crisponi L., Fattori M., Devoto M., Doratiotto S., Rassu S., Mereu S., Giua E., Cadeddu N.G., Atzeni R., Pelosi U., Corrias A., Perra R., Torrazza P.L., Pirina P., Ginesu F., Marcias S., Schintu M.G., Del Giacco G.S., Manconi P.E., Malerba G., Bisognin A., Trabetti E., Boner A., Pescolliderung L., Pignatti P.F., Schlessinger D., Cao A., Pilia G. 2007. IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *The American Journal of Human Genetics*, 80, 6: 1103–1114
- Balantič M., Rijavec M., Fležar M., Camlek T., Hudoklin I., Košnik M., Korošec P., Šuškovič S. 2013. A polymorphism in *ORMDL3* is associated not only with asthma without rhinitis but also with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 23, 4: 256–256
- Balantič M., Rijavec M., Skerbinjek Kavalarič M., Šuškovič S., Šilar M., Košnik M., Korošec P. 2012. Asthma treatment outcome in children is associated with vascular endothelial growth factor A (VEGFA) polymorphisms. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 16, 3: 173–180
- Bandi N., Kompella U.B. 2004. Budesonide reduces vascular endothelial growth factor secretion and expression in airway (Calu-1) and alveolar (A549) epithelial

- cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169, 10: 1131–1134
- Barnes K.C. 2011. Genetic studies of the etiology of asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8, 2: 143–148
- Barnes P.J. 2006. Drugs for asthma. *British Journal of Pharmacology*, 147, Supplement 1: S297–S303
- Barnes P.J., Adcock I.M. 2003. How do corticosteroids work in asthma? *Annals of Internal Medicine*, 139, 5: 359–370
- Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21, 2: 263–265
- Barrett J.C., Hansoul S., Nicolae D.L., Cho J.H., Duerr R.H., Rioux J.D., Brant S.R., Silverberg M.S., Taylor K.D., Barmada M.M. 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*, 40, 8: 955–962
- Bartemes K. R., Kita H. 2012. Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. *Clinical Immunology*, 143, 3: 222–235
- Beno I., Rosenthal K., Levitine M., Shaulov L., Haran T.E. 2011. Sequence-dependent cooperative binding of p53 to DNA targets and its relationship to the structural properties of the DNA targets. *Nucleic Acids Research*, 39, 5: 1919–1932
- Berlivet S., Moussette S., Ouimet M., Verlaan D.J., Koka V., Al Tuwaijri A., Kwan T., Sinnett D., Pastinen T., Naumova A.K. 2012. Interaction between genetic and epigenetic variation defines gene expression patterns at the asthma-associated locus 17q12-q21 in lymphoblastoid cell lines. *Human Genetics*, 131, 7: 1161–1171
- Binia A., Khorasani N., Bhavsar P.K., Adcock I., Brightling C.E., Chung K.F., Cookson W.O., Moffatt M.F. 2011. Chromosome 17q21 SNP and severe asthma. *Journal of Human Genetics*, 56, 1: 97–98
- Bisgaard H., Bonnelykke K., Sleiman P.A.M., Brasholt M., Chawes B., Moller E.K., Stage M., Kim C., Tavendale R., Baty F., Bressen C., Phipper B., Palmer C.N.N., Hakonarsson H. 2008. *ORMDL3* associated gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179, 3: 179–185
- Bønnelykke K., Sleiman P., Nielsen K., Kreiner-Møller E., Mercader J.M., Belgrave D., den Dekker H.T., Husby A., Sevelsted A., Faura-Tellez G., Mortensen L.J., Paternoster L., Flaaten R., Mølgaard A., Smart D.E., Thomsen P.F., Rasmussen M.A., Bonàs-Guarch S., Holst C., Nohr E.A., Yadav R., March M.E., Blicher T., Lackie P.M., Jaddoe V.W., Simpson A., Holloway J.W., Duijts L., Custovic A., Davies D.E., Torrents D., Gupta R., Hollegaard M.V., Hougaard D.M., Hakonarson H., Bisgaard H. 2014. A genome-wide association study identifies *CDHR3* as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nature Genetics*, 46, 1: 51–55
- Bousquet J., Khaltayev N., Cruz A.A., Denburg J., Fokkens W.J., Togias A., Zuberbier T., Baena-Cagnani C.E., Canonica G.W., van Weel C., Agache I., Aït-Khaled N.,

- Bachert C., Blaiss M.S., Bonini S., Boulet L.P., Bousquet P.J., Camargos P., Carlsen K.H., Chen Y., Custovic A., Dahl R., Demoly P., Douagui H., Durham S.R., van Wijk R.G., Kalayci O., Kaliner M.A., Kim Y.Y., Kowalski M.L., Kuna P., Le L.T., Lemiere C., Li J., Lockey R.F., Mavale-Manuel S., Meltzer E.O., Mohammad Y., Mullol J., Naclerio R., O'Hehir R.E., Ohta K., Ouedraogo S., Palkonen S., Papadopoulos N., Passalacqua G., Pawankar R., Popov T.A., Rabe K.F., Rosado-Pinto J., Scadding G.K., Simons F.E., Toskala E., Valovirta E., van Cauwenberge P., Wang D.Y., Wickman M., Yawn B.P., Yorgancioglu A., Yusuf O.M., Zar H., Annesi-Maesano I., Bateman E.D., Ben Kheder A., Boakye D.A., Bouchard J., Burney P., Busse W.W., Chan-Yeung M., Chavannes N.H., Chuchalin A., Dolen W.K., Emuzyte R., Grouse L., Humbert M., Jackson C., Johnston S.L., Keith P.K., Kemp J.P., Klossek J.M., Larenas-Linnemann D., Lipworth B., Malo J.L., Marshall G.D., Naspitz C., Nekam K., Niggemann B., Nizankowska-Mogilnicka E., Okamoto Y., Orru M.P., Potter P., Price D., Stoloff S.W., Vandenplas O., Viegi G., Williams D. 2008. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update. *Allergy*, 63, Supplement 86: S8–S160
- Bouzigon E., Corda E., Aschard H., Dizier M.H., Boland A., Bousquet J., Chateigner N., Gormand F., Just J., Le Moual N., Scheinmann P., Siroux V., Vervloet D., Zelenika D., Pin I., Kauffmann F., Lathrop M., Demenais F. 2008. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *The New England Journal of Medicine*, 359, 19: 1985–1994
- Boyle A.P., Hong E.L., Hariharan M., Cheng Y., Schaub M.A., Kasowski M., Karczewski K.J., Park J., Hitz B.C., Weng S., Cherry J.M., Snyder M. 2012. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, 22, 9: 1790–1797
<http://regulomedb.org/> (4. april 2016)
- Breslow D.K., Collins S.R., Bodenmiller B., Aebersold R., Simons K., Shevchenko A., Ejsing C.S., Weissman J.S. 2010. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature*, 463, 7284: 1048–1053
- Campbell C.D., Mohajeri K., Malig M., Hormozdiari F., Nelson B., Du G., Patterson K.M., Eng C., Torgerson D.G., Hu D., Herman C., Chong J.X., Ko A., O'Roak B.J., Krumm N., Vives L., Lee C., Roth L.A., Rodriguez-Cintron W., Rodriguez-Santana J., Brigino-Buenaventura E., Davis A., Meade K., LeNoir M.A., Thyne S., Jackson D.J., Gern J.E., Lemanske R.F.Jr., Shendure J., Abney M., Burchard E.G., Ober C., Eichler E.E. 2014. Whole-genome sequencing of individuals from a founder population identifies candidate genes for asthma. *PLoS One*, 9, 8: e104396, doi: 10.1371/journal.pone.0104396.g001: 12 str.
- Cantero-Recasens G., Fandos C., Rubio-Moscardo F., Valverde M.A., Vicente R. 2010. The asthma-associated *ORMDL3* gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Human Molecular Genetics*, 19, 1: 111–121
- Chilvers E.R., Lomas D.A. 2010. Diagnosing COPD in non-smokers: splitting not lumping. *Thorax*, 65, 6: 465–466

- Choy D.F., Modrek B., Abbas A.R., Kummerfeld S., Clark H.F., Wu L.C., Fedorowicz G., Modrusan Z., Fahy J.V., Woodruff P.G., Arron J.R. 2010. Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *The Journal of Immunology*, 186, 3: 1861–1869
- Corren J. 1997. Allergic rhinitis and asthma: how important is the link? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99, 2: S781–S786
- Corren J. 2013. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discovery Medicine*, 15, 83: 243–249
- Creyghton M.P., Cheng A.W., Welstead G.G., Kooistra T., Carey B.W., Steine E.J., Hanna J., Lodato M.A., Frampton G.M., Sharp P.A., Boyer L.A., Young R.A., Jaenisch R. 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 107, 50: 21931–21936
- Crosslin D.R., McDavid A., Weston N., Nelson S.C., Zheng X., Hart E., de Andrade M., Kullo I.J., McCarty C.A., Doheny K.F., Pugh E., Kho A., Hayes M.G., Pretel S., Saip A., Ritchie M.D., Crawford D.C., Crane P.K., Newton K., Li R., Mirel D.B., Crenshaw A., Larson E.B., Carlson C.S., Jarvik G.P. 2012. Electronic Medical Records and Genomics (eMERGE) Network. Genetic variants associated with the white blood cell count in 13,923 subjects in the eMERGE Network. *Human Genetics*, 131, 4: 639–652
- Cullen M., Noble J., Erlich H., Thorpe K., Beck S., Klitz W., Trowsdale J., Carrington M. 1997. Characterization of recombination in the HLA class II region. *The American Journal of Human Genetics*, 60, 2: 397–407
- Daly M.J., Rioux J.D., Schaffner S.F., Hudson T.J., Lander E.S. 2001. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature Genetics*, 29, 2: 229–232
- de Baets G., Van Durme J., Reumers J., Maurer-Stroh S., Vanhee P., Dopazo J., Schymkowitz J., Rousseau F. 2011. SNPeffect 4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Research*, 40: doi: 10.1093/nar/gkr996: 5 str.
<http://snpeffect.switchlab.org/> (6. april 2016)
- de Nijs S.B., Venekamp L.N., Bel E.H. 2013. Adult-onset asthma: is it really different? *European Respiratory Review*, 22: 44–52
- DisGenNET database. 2015. Barcelona, GRIB/IMIM/UPF Integrative Biomedical Informatics Group.
<http://www.disgenet.org/> (15. januar 2016)
- Dixon A.E., Kaminsky D.A., Holbrook J.T., Wise R.A., Shade D.M., Irvin C.G. 2006. Allergic rhinitis and sinusitis in asthma: differential effects on symptoms and pulmonary function. *Chest*, 130, 2: 429–435
- Dixon A.E., Raymond D.M., Suratt B.T., Bourassa L.M., Irvin C.G. 2008. Lower airway disease in asthmatics with and without rhinitis. *Lung*, 186, 6: 361–368
- Dizier M.H., Besse-Schmittler C., Guilloud-Bataille M., Annesi-Maesano I., Boussaha M., Bousquet J., Charpin D., Degioanni A., Gormand F., Grimfeld A., Hochez J., Hyne G., Lockhart A., Luillier-Lacombe M., Matran R., Meunier F., Neukirch F.,

- Pacheco Y., Parent V., Paty E., Pin I., Pison C., Scheinmann P., Thobie N., Vervloet D., Kauffmann F., Feingold J., Lathrop M., Demenais F. 2000. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, 5: 1812–1818
- Drazen J.M., Silverman E.K., Lee T.H. 2000. Heterogeneity of therapeutic responses in asthma. *British Medical Bulletin*, 56, 4: 1054–1070
- Drysdale C.M., McGraw D.W., Stack C.B., Stephens J.C., Judson R.S., Nandabalan K., Arnold K., Ruano G., Liggett S.B. 2000. Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 97, 19: 10483–10488
- ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489, 7414: 57–74
<https://genome.ucsc.edu/ENCODE/index.html> (6. april 2016)
- Ezoe S., Matsumura I., Gale K., Satoh Y., Ishikawa J., Mizuki M., Takahashi S., Minegishi N., Nakajima K., Yamamoto M., Enver T., Kanakura Y. 2005. GATA transcription factors inhibit cytokine-dependent growth and survival of a hematopoietic cell line through the inhibition of STAT3 activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 13: 13163–13170
- Fang Q., Zhao H., Wang A., Gong Y., Liu Q. 2011. Association of genetic variants in chromosome 17q21 and adult-onset asthma in a Chinese Han population. *BMC Medical Genetics*, 12: 133, doi: 10.1186/1471-2350-12-133: 7 str.
- Farhang G.M., Goossens S., Nittner D., Bisteau X., Bartunkova S., Zwolinska A., Hulpiau P., Haigh K., Haenebalcke L., Drogat B., Jochemsen A., Roger P.P., Marine J.C., Haigh J.J. 2013. p53 promotes VEGF expression and angiogenesis in the absence of an intact p21-Rb pathway. *Cell Death & Differentiation*, 20, 7: 888–897
- Feltis B.N., Wignarajah D., Reid D.W., Ward C., Harding R., Walters E.H. 2007. Effects of inhaled fluticasone on angiogenesis and vascular endothelial growth factor in asthma. *Thorax*, 62, 4: 314–319
- Ferreira M.A., McRae A.F., Medland S.E., Nyholt D.R., Gordon S.D., Wright M.J., Henders A.K., Madden P.A., Visscher P.M., Wray N.R., Heath A.C., Montgomery G.W., Duffy D.L., Martin N.G. 2011. Association between *ORMDL3*, *IL1RL1* and a deletion on chromosome 17q21 with asthma risk in Australia. *European Journal of Human Genetics*, 19, 4: 458–464
- Fuertes E., Söderhäll C., Acevedo N., Becker A., Brauer M., Chan-Yeung M., Dijk F.N., Heinrich J., de Jongste J., Koppelman G.H., Postma D.S., Kere J., Kozyskyj A.L., Pershagen G., Sandford A., Standl M., Tiesler C.M., Waldenberger M., Westman M., Carlsten C., Melén E. 2015. Associations between the 17q21 region and allergic rhinitis in 5 birth cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135, 2: 573–576
- 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, 11: 1194–1200
- Gibson P.G., McDonald V.M. 2015. Asthma-COPD overlap 2015: now we are six. *Thorax*, 70, 7: 683–91
- Global strategy for asthma management and prevention. 2006. Global Initiative for Asthma (GINA): 110 str.
http://www.ginasthma.org/documents/5/documents_variants/31 (22. maj 2012)
- Global strategy for diagnosis, management and prevention of COPD. 2007. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): 109 str.
<http://www.goldcopd.org/Guidelines/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management-2007.html> (22. maj 2012)
- Gosman M.M., Boezen H.M., van Diemen C.C., Snoeck-Stroband J.B., Lapperre T.S., Hiemstra P.S., Ten Hacken N.H., Stolk J., Postma D.S. 2007. A disintegrin and metalloprotease 33 and chronic obstructive pulmonary disease pathophysiology. *Thorax*, 62, 3: 242–247
- Granell R., Sterne J.A., Henderson J. 2012. Associations of different phenotypes of wheezing illness in early childhood with environmental variables implicated in the aetiology of asthma. *PLoS One* 7, 10: e48359, doi: 10.1371/journal.pone.0048359: 8 str.
- Gudbjartsson D.F., Bjornsdottir U.S., Halapi E., Helgadóttir A., Sulem P., Jonsdóttir G.M., Thorleifsson G., Helgadóttir H., Steinthorsdóttir V., Stefansson H., Williams C., Hui J., Beilby J., Warrington N.M., James A., Palmer L.J., Koppelman G.H., Heinzmann A., Krueger M., Boezen H.M., Wheatley A., Altmüller J., Shin H.D., Uh S.T., Cheong H.S., Jonsdóttir B., Gislason D., Park C.S., Rasmussen L.M., Porsbjerg C., Hansen J.W., Backer V., Werge T., Janson C., Jönsson U.B., Ng M.C., Chan J., So W.Y., Ma R., Shah S.H., Granger C.B., Quyyumi A.A., Levey A.I., Vaccarino V., Reilly M.P., Rader D.J., Williams M.J., van Rij A.M., Jones G.T., Trabetti E., Malerba G., Pignatti P.F., Boner A., Pescoll derung L., Girelli D., Olivieri O., Martinelli N., Ludvíksson B.R., Ludvíksdóttir D., Eyjólfsson G.I., Arnar D., Thorgeirsson G., Deichmann K., Thompson P.J., Wjst M., Hall I.P., Postma D.S., Gislason T., Gulcher J., Kong A., Jonsdóttir I., Thorsteinsdóttir U., Stefansson K. 2009. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nature Genetics*, 41, 3: 342–347
- Guenther C.A., Tasic B., Luo L., Bedell M.A., Kingsley D.M. 2014. A molecular basis for classic blond hair color in Europeans. *Nature Genetics*, 46, 7: 748–752
- Ha S.G., Ge X.N., Bahaie N.S., Kang B.N., Rao A., Rao S.P., Sriramaraio P. 2013. *ORMDL3* promotes eosinophil trafficking and activation via regulation of integrins and CD48. *Nature Communications*, 4: 2479, doi: 10.1038/ncomms3479: 22 str.
- Halapi E., Gudbjartsson D.F., Jonsdóttir G.M., Bjornsdottir U.S., Thorleifsson G., Helgadóttir H., Williams C., Koppelman G.H., Heinzmann A., Boezen H.M.,

- Jonasdottir A., Blondal T., Gudjonsson S.A., Jonasdottir A., Thorlacius T., Henry A.P., Altmueller J., Krueger M., Shin H.D., Uh S.T., Cheong H.S., Jonsdottir B., Ludviksson B.R., Ludviksdottir D., Gislason D., Park C.S., Deichmann K., Thompson P.J., Wjst M., Hall I.P., Postma D.S., Gislason T., Kong A., Jonsdottir I., Thorsteinsdottir U., Stefansson K. 2010. A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma. *European Journal of Human Genetics*, 18, 8: 902–908
- Hao K., Bossé Y., Nickle D.C., Paré P.D., Postma D.S., Laviolette M., Sandford A., Hackett T.L., Daley D., Hogg J.C., Elliott W.M., Couture C., Lamontagne M., Brandsma C.A., van den Berge M., Koppelman G., Reicin A.S., Nicholson D.W., Malkov V., Derry J.M., Suver C., Tsou J.A., Kulkarni A., Zhang C., Vessey R., Opiteck G.J., Curtis S.P., Timens W., Sin D.D. 2012. Lung eQTLs to help reveal the molecular underpinnings of asthma. *PLoS Genetics*, 8, 11: e1003029, doi: 10.1371/journal.pgen.1003029: 11 str.
- The International HapMap Project. 2007. The International HapMap Consortium.
<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> (15. oktober 2011)
- Hardin M., Cho M., McDonald M.L., Beaty T., Ramsdell J., Bhatt S., van Beek E.J., Make B.J., Crapo J.D., Silverman E.K., Hersh C.P. 2014. The clinical and genetic features of COPD-asthma overlap syndrome. *European Respiratory Journal*, 2: 341–350
- Harkness L.M., Ashton A.W., Burgess J.K. 2014. Asthma is not only an airway disease, but also a vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 148: 17–33
- Hasnain S.Z., Lourie R., Das I., Chen A.C., McGuckin M.A. 2012. The interplay between endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Immunology & Cell Biology*, 90, 3: 260–270
- Henderson A.J. 2014. Childhood asthma phenotypes in the twenty-first century. *Breathe*, 10, 2: 100–108
- Hergueta-Redondo M., Sarrió D., Molina-Crespo Á., Megias D., Mota A., Rojo-Sebastian A., García-Sanz P., Morales S., Abril S., Cano A., Peinado H., Moreno-Bueno G. 2014. Gasdermin-B promotes invasion and metastasis in breast cancer cells. *PLoS One*, 9, 3: e90099, doi: 10.1371/journal.pone.0090099: 15 str.
- Hesselmar B., Enelund A.C., Eriksson B., Padyukov L., Hanson L.A., Aberg N. 2012. The heterogeneity of asthma phenotypes in children and young adults. *Journal of Allergy (Cairo)*: 163089, doi: 10.1155/2012/163089: 6 str.
- Himes B.E., Hunninghake G.M., Baurley J.W., Rafaels N.M., Sleiman P., Strachan D.P., Wilk J.B., Willis-Owen S.A., Klanderman B., Lasky-Su J., Lazarus R., Murphy A.J., Soto-Quiros M.E., Avila L., Beaty T., Mathias R.A., Ruczinski I., Barnes K.C., Celedón J.C., Cookson W.O., Gauderman W.J., Gilliland F.D., Hakonarson H., Lange C., Moffatt M.F., O'Connor G.T., Raby B.A., Silverman E.K., Weiss S.T. 2009. Genome-wide association analysis identifies *PDE4D* as an asthma-susceptibility gene. *The American Journal of Human Genetics*, 84: 581–593

- Hirota T., Takahashi A., Kubo M., Tsunoda T., Tomita K., Doi S., Fujita K., Miyatake A., Enomoto T., Miyagawa T., Adachi M., Tanaka H., Niimi A., Matsumoto H., Ito I., Masuko H., Sakamoto T., Hizawa N., Taniguchi M., Lima J.J., Irvin C.G., Peters S.P., Himes B.E., Litonjua A.A., Tantisira K.G., Weiss S.T., Kamatani N., Nakamura Y., Tamari M. 2011. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nature Genetics*, 43, 9: 893–896
- Hirschfield G.M., Liu X., Xu C., Lu Y., Xie G., Gu X., Walker E.J., Jing K., Juran B.D., Mason A.L. 2009. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *The New England Journal of Medicine*, 360, 24: 2544–2555
- Holloway J.W., Yang I.A., Holgate S.T. 2010. Genetics of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 2, Supplement 2: S81–S94
- Horvath G., Wanner A. 2006. Inhaled corticosteroids: effects on the airway vasculature in bronchial asthma. *European Respiratory Journal*, 27, 1: 172–187
- Howard T.D., Koppelman G.H., Xu J., Zheng S.L., Postma D.S., Meyers D.A., Bleeker E.R. 2002. Gene-gene interaction in asthma: *IL4RA* and *IL13* in a dutch population with asthma. *American Journal of Human Genetics*, 70, 1: 230–236
- Hrdlickova B., Holla L.I. 2011. Relationship between the 17q21 locus and adult asthma in a Czech population. *Human Immunology*, 72, 10: 921–925
- Hsu K.J., Turvey S.E. 2013. Functional analysis of the impact of *ORMDL3* expression on inflammation and activation of the unfolded protein response in human airway epithelial cells. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 9, 1: 4, doi: 10.1186/1710-1492-9-4: 10 str.
- Izzedine H. 2014. Anti-VEGF cancer therapy in nephrology practice. *International Journal of Nephrology*: 143426, doi: 10.1155/2014/143426: 8 str.
- Jang A.S., Park J.S., Lee J.H., Park S.W., Kim D.J., Uh S.T., Kim Y.H., Park C.S. 2010. Asthmatics without rhinitis have more fixed airway obstruction than those with concurrent rhinitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 2, 2: 108–113
- Jeffery P.K. 2004. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1, 3: 176–183
- Jie Z., Hu Z., Bai C., Jin M. 2011. *ADAM33* gene polymorphisms associate with asthma susceptibility and severity in East China han population. *Journal of Asthma*, 48, 10: 979–985
- Johnson A.D., Handsaker R.E., Pulit S.L., Nizzari M.M., O'Donnell C.J., de Bakker P.I. 2008. SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. *Bioinformatics*, 24, 24: 2938–2939 <https://www.broadinstitute.org/mpg/snap/ldsearch.php> (4. april 2016)
- Jongepier H., Boezen H.M., Dijkstra A., Howard T.D., Vonk J.M., Koppelman G.H., Zheng S.L., Meyers D.A., Bleeker E.R., Postma D.S. 2004. Polymorphisms of the *ADAM33* gene are associated with accelerated lung function decline in asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 34, 5: 757–760

- Kamba T., McDonald D.M. 2007. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *British Journal of Cancer*, 96, 12: 1788–1795
- Kanazawa H., Nomura S., Asai K. 2007. Roles of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on airway microvascular permeability in asthmatic patients. *Chest*, 131, 4: 1035–1041
- Kang M.J., Yu H.S., Seo J.H., Kim H.Y., Jung Y.H., Kim Y.J., Kim H.J., Lee S.Y., Hong S.J. 2012. *GSDMB/ORMDL3* variants contribute to asthma susceptibility and eosinophil-mediated bronchial hyperresponsiveness. *Human Immunology*, 73, 9: 954–959
- Karunas A.S., Iunusbaev B.B., Fedorova I.I., Gimalova G.F., Ramazanov N.N., Gur'eva L.L., Mukhtarova L.A., Zagidullin S.Z., Etkina E.I., Khusnutdinova E.K. 2011. Genome-wide association study of bronchial asthma in the Volga-Ural region of Russia. *Molecular Biology (Moscow)*, 45, 6: 992–1003
- Kavalar M.S., Balantič M., Šilar M., Košnik M., Korošec P., Rijavec M. 2012. Association of *ORMDL3*, *STAT6* and *TBXA2R* gene polymorphisms with asthma. *International Journal of Immunogenetics*, 39, 1: 20–25
- Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Research*, 12, 6: 996–1006
<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> (6. april 2016)
- Khor Y.H., Teoh A.K., Lam S.M., Mo D.C., Weston S., Reid D.W., Walters E.H. 2009. Increased vascular permeability precedes cellular inflammation as asthma control deteriorates. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 11: 1659–1667
- Komiyama H., Aoki A., Tanaka S., Maekawa H., Kato Y., Wada R., Maekawa T., Tamura M., Shiroishi T. 2010. Alu-derived cis-element regulates tumorigenesis-dependent gastric expression of GASDERMIN B (*GSDMB*). *Genes & Genetic Systems*, 85, 1: 75–83
- Kowalczyk M.S., Hughes J.R., Garrick D., Lynch M.D., Sharpe J.A., Sloane-Stanley J.A., McGowan S.J., De Gobbi M., Hosseini M., Vernimmen D., Brown J.M., Gray N.E., Collavin L., Gibbons R.J., Flint J., Taylor S., Buckle V.J., Milne T.A., Wood W.G., Higgs D.R. 2012. Intragenic enhancers act as alternative promoters. *Molecular Cell*, 45, 4: 447–458
- Kreiner-Møller E., Strachan D.P., Linneberg A., Husemoen L.L., Bisgaard H., Bønnelykke K. 2015. 17q21 gene variation is not associated with asthma in adulthood. *Allergy*, 70, 1: 107–114
- Kruse S., Japha T., Tedner M., Sparholt S.H., Forster J., Kuehr J., Deichmann K.A. 1999. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology*, 96, 3: 365–371
- Lambrecht B.N., Hammad H. 2012. The airway epithelium in asthma. *Nature*, 18, 5: 684–692
- Lee C.G., Link H., Baluk P., Homer R.J., Chapoval S., Bhandari V., Kan M.J., Cohn L., Kim J.K., McDonald D.M., Elias J.A. 2004. Vascular endothelial growth factor

- (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nature Medicine*, 10, 10: 1095–1103
- Lee K.S., Kim S.R., Park H.S., Jin G.Y., Lee Y.C. 2004. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates vascular permeability by reducing vascular endothelial growth factor expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 5: 1093–1099
- Lenz P.H., Panos R.J. 2014. Asthma and COPD - overlapping disorders or distinct processes? V: *COPD Clinical Perspectives*. Panos R.J. (ed.). Rijeka, Intech: doi: 10.5772/58234: 18 str.
- Li M., Li C. 2008. Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. *Genetic Epidemiology*, 32, 7: 589–599
- Li X., Howard T.D., Zheng S.L., Haselkorn T., Peters S.P., Meyers D.A., Bleeker E.R. 2010. Genome-wide association study of asthma identifies *RAD50-IL13* and *HLA-DR/DQ* regions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 2: 328–335
- Lima J.J., Blake K.V., Tantisira K.G., Weiss S.T. 2009. Pharmacogenetics of asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 15, 1: 57–62
- Lin Y.N., Roy A., Yan W., Burns K.H., Matzuk M.M. 2008. Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 19: 6794–6805
- Liu N., Zhang K., Zhao H. 2008. Haplotype-association analysis. *Advances in Genetics*, 60: 335–405
- Lopert A., Rijavec M., Žavbi M., Korošec P., Fležar M. 2013. Asthma treatment outcome in adults is associated with rs9910408 in *TBX21* gene. *Scientific Reports*, 3: 2915, doi: 10.1038/srep02915: 6 str.
- Lötvall J., Akdis C.A., Bacharier L.B., Bjermer L., Casale T.B., Custovic A., Lemanske R.F. Jr., Wardlaw A.J., Wenzel S.E., Greenberger P.A. 2011. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127, 2: 355–360
- Madore A.M., Tremblay K., Hudson T.J., Laprise C. 2008. Replication of an association between 17q21 SNPs and asthma in a French-Canadian familial collection. *Human Genetics*, 123, 1: 93–95
- Mahn K., Hirst S.J., Ying S., Holt M.R., Lavender P., Ojo O.O., Siew L., Simcock D.E., McVicker C.G., Kanabar V., Snetkov V.A., O'Connor B.J., Karner C., Cousins D.J., Macedo P., Chung K.F., Corrigan C.J., Ward J.P., Lee T.H. 2009. Diminished sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) expression contributes to airway remodelling in bronchial asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 106, 26: 10775–10780
- Manral S., Bhatia S., Sinha R., Kumar A., Rohil V., Arya A., Dhawan A., Arya P., Joshi R., Sreedhara S.C., Gangopadhyay S., Bansal S.K., Chatterjee S., Chaudhury N.K., Vijayan V.K., Saso L., Parmar V.S., DePass A.L., Prasad A.K., Raj H.G. 2011. Normalization of deranged signal transduction in lymphocytes of

- COPD patients by the novel calcium channel blocker H-DHPM. *Biochimie*, 93, 7: 1146–1156
- March M.E., Sleiman P.M.A., Hakonarson H. 2013. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. *International Journal of General Medicine*, 6: 253–265
- Marinho S., Custovic A., Marsden P., Smith J.A., Simpson A. 2012. 17q12–21 variants are associated with asthma and interact with active smoking in an adult population from the United Kingdom. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 108, 6: 402–411
- Mathelier A., Fornes O., Arenillas D.J., Chen C.Y., Denay G., Lee J., Shi W., Shyr C., Tan G., Worsley-Hunt R., Zhang A.W., Parcy F., Lenhard B., Sandelin A., Wasserman W.W. 2016. JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 44: doi: 10.1093/nar/gkv1176: 6 str.
http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?rm=browse&db=core&tax_group=vertebrates (9. april 2016)
- Matheson M.C., Ellis J.A., Raven J., Johns D.P., Walters E.H., Abramson M.J. 2006. Beta2-adrenergic receptor polymorphisms are associated with asthma and COPD in adults. *Journal of Human Genetics*, 51, 11: 943–951
- Mayo O. 2008. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Research of Human Genetics*, 11, 3: 249–256
- Mendes E.S., Campos M.A., Hurtado A., Wanner A. 2001. Effect of montelukast and fluticasone propionate on airway mucosal blood flow in asthma. *European Journal of Pharmacology*, 425, 2: 109–116
- Meng J.F., Rosenwasser L.J. 2010. Unraveling the genetic basis of asthma and allergic diseases. *Allergy & Asthma Immunology Research*, 2, 4: 215–227
- Meyers D.A. 2010. Genetics of asthma and allergy: what have we learned? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126, 3: 439–446
- Meyers D.A., Larj M.J., Lange L. 2004. Genetics of asthma and COPD. Similar results for different phenotypes. *Chest*, 126, Supplement 2: 105S–110S
- Miller M., Rosenthal P., Beppu A., Mueller J.L., Hoffman H.M., Tam A.B., Doherty T.A., McGeough M.D., Pena C.A., Suzukawa M., Niwa M., Broide D.H. 2014. *ORMDL3* transgenic mice have increased airway remodeling and airway responsiveness characteristic of asthma. *The Journal of Immunology*, 192, 8: 3475–3487
- Moffatt M.F., Gut I.G., Demenais F., Strachan D.P., Bouzigon E., Heath S., von Mutius E., Farrall M., Lathrop M., Cookson W.O., GABRIEL Consortium. 2010. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *The New England Journal of Medicine*, 363, 13: 1211–1221
- Moffatt M.F., Kabisch M., Liang L., Dixon A.L., Strachan D., Heath S., Depner M., von Berg A., Bufe A., Rietschel E., Heinzmann 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*, 26, 448: 470–473
- Morris R.W., Kaplan N.L. 2002. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles. *Genetic Epidemiology*, 23, 3: 221–233
- Morrow T. 2007. Implications of pharmacogenomics in the current and future treatment of asthma. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13, 6: 497–505
- Mukherjee A.B., Zhang Z. 2011. Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 38: 32883–32889
- Murphy A., Chu J.H., Xu M., Carey V.J., Lazarus R., Liu A., Szeffler S.J., Strunk R., Demuth K., Castro M., Hansel N.N., Diette G.B., Vonakis B.M., Adkinson N.F.Jr, Klanderman B.J., Senter-Sylvia J., Ziniti J., Lange C., Pastinen T., Raby B.A. 2010. Mapping of numerous disease-associated expression polymorphisms in primary peripheral blood CD4⁺ lymphocytes. *Human Molecular Genetics*, 19, 23: 4745–4757
- Nalls M.A., Couper D.J., Tanaka T., van Rooij F.J., Chen M.H., Smith A.V., Toniolo D., Zakai N.A., Yang Q., Greinacher A., Wood A.R., Garcia M., Gasparini P., Liu Y., Lumley T., Folsom A.R., Reiner A.P., Gieger C., Lagou V., Felix J.F., Völzke H., Gouskova N.A., Biffi A., Döring A., Völker U., Chong S., Wiggins K.L., Rendon A., Dehghan A., Moore M., Taylor K., Wilson J.G., Lettre G., Hofman A., Bis J.C., Pirastu N., Fox C.S., Meisinger C., Sarnbrook J., Arepalli S., Nauck M., Prokisch H., Stephens J., Glazer N.L., Cupples L.A., Okada Y., Takahashi A., Kamatani Y., Matsuda K., Tsunoda T., Tanaka T., Kubo M., Nakamura Y., Yamamoto K., Kamatani N., Stumvoll M., Tönjes A., Prokopenko I., Illig T., Patel K.V., Garner S.F., Kuhnel B., Mangino M., Oostra B.A., Thein S.L., Coresh J., Wichmann H.E., Menzel S., Lin J., Pistis G., Uitterlinden A.G., Spector T.D., Teumer A., Eiriksdottir G., Gudnason V., Bandinelli S., Frayling T.M., Chakravarti A., van Duijn C.M., Melzer D., Ouwehand W.H., Levy D., Boerwinkle E., Singleton A.B., Hernandez D.G., Longo D.L., Soranzo N., Witterman J.C., Psaty B.M., Ferrucci L., Harris T.B., O'Donnell C.J., Ganesh S.K. 2011. Multiple loci are associated with white blood cell phenotypes. *PLoS Genetics*, 7, 6: e1002113, doi: 10.1371/journal.pgen.6 str.
- Nauck M., Karakiulakis G., Perruchoud A.P., Papakonstantinou E., Roth M. 1998. Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 12, 341: 309–315
- Naujokat C., Hoffmann S. 2002. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Laboratory Investigation*, 82, 8: 965–980
- Navarro A., Valero A., Juliá B., Quirce S. 2008. Coexistence of asthma and allergic rhinitis in adult patients attending allergy clinics: ONEAIR study. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18, 4: 233–238

- Neurath M.F., Finotto S., Glimcher L.H. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Medicine*, 8, 6: 567–573
- Ober C., Hoffjan S. 2006. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes & Immunity*, 7, 2: 95–100
- Ober C., Yao T.C. 2011. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunological Reviews*, 242, 1: 10–30
- Ober C., Tsalenko A., Parry R., Cox N.J. 2000. A Second-Generation Genomewide Screen for Asthma-Susceptibility Alleles in a Founder Population The American Journal of Human Genetics, 67, 5: 1154–1162
- Okada Y., Kamatani Y., Takahashi A., Matsuda K., Hosono N., Ohmiya H., Daigo Y., Yamamoto K., Kubo M., Nakamura Y., Kamatani N. 2010. Common variations in *PSMD3-CSF3* and *PLCB4* are associated with neutrophil count. *Human Molecular Genetics*, 19, 10: 2079–2085
- Ono J.G., Worgall T.S., Worgall S. 2014. 17q21 locus and *ORMDL3*: an increased risk for childhood asthma. *Pediatric Research*, 75, 1-2: 165–170
- Pan L., Delmonte J.Jr., Jalonon C. 1995. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood*, 86, 12: 4422–4429
- Parameswaran K., Janssen L.J., O'Byrne P.M. 2002. Airway hyperresponsiveness and calcium handling by smooth muscle: a "deeper look". *Chest*, 121, 2: 621–624
- Pearce N., Pekkanen J., Beasley R. 1999. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*, 54, 3: 268–272
- Pinto L.A., Depner M., Klopp N., Illig T., Vogelberg C., von Mutius E., Kabesch M. 2010. *MMP-9* gene variants increase the risk for non-atopic asthma in children. *Respiratory Research*, 11: 23, doi: 10.1186/1465-9921-11-23: 9 str.
- Ponte E.V., Franco R., Nascimento H.F., Souza-Machado A., Cunha S., Barreto M.L., Naspitz C., Cruz A.A. 2008. Lack of control of severe asthma is associated with co-existence of moderate-to-severe rhinitis. *Allergy*, 63, 5: 564–569
- Postma D.S., Kerkhof M., Boezen H.M., Koppelman G.H. 2011. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: common genes, common environments? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183, 12: 1588–1594
- Poulin S., Thompson C., Thivierge M., Véronneau S., McMahon S., Dubois C.M., Stankova J., Rola-Pleszczynski M. 2011. Cysteinyl-leukotrienes induce vascular endothelial growth factor production in human monocytes and bronchial smooth muscle cells. *Clinical & Experimental Allergy*, 41, 2: 204–217
- Purcell S., Cherny S.S., Sham P.C. 2003. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics*, 19, 1: 149–150
- <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/> (3. maj 2015)
- Qiu R., Zhang H., Zhao H., Li J., Guo C., Gong Y., Liu Q. 2013. Genetic variants on 17q21 are associated with ankylosing spondylitis susceptibility and severity in a Chinese Han population. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 42, 6: 469–472

- Queto T., Vasconcelos Z.F., Luz R.A., Anselmo C., Guiné A.A., Silva P.M., Farache J., Cunha J.M., Bonomo A.C., Gaspar-Elsas M.I., Xavier-Elsas P. 2011. G-CSF suppresses allergic pulmonary inflammation, downmodulating cytokine, chemokine and eosinophil production. *Life Sciences*, 88, 20: 830-838
- Rothenberg M.E. 2004. VEGF obstructs the lungs. *Nature Medicine*, 10, 10: 1041–1042
- Ruggiero D., Dalmasso C., Nutile T., Sorice R., Dionisi L., Aversano M., Bröet P., Leutenegger A.L., Bourgain C., Ciullo M. 2011. Genetics of VEGF serum variation in human isolated populations of cilento: importance of *VEGF* polymorphisms. *PLoS One*, 6, 2: e16982, doi: 10.1371/journal.pone.0016982: 10 str.
- Sadeghnejad A., Ohar J.A., Zheng S.L., Sterling D.A., Hawkins G.A., Meyers D.A., Bleecker E.R. 2009. *ADAM33* polymorphisms are associated with COPD and lung function in long-term tobacco smokers. *Respiratory Research*, 12, 10: 21, doi: 10.1186/1465-9921-10-21: 9 str.
- Saeki N., Kim D.H., Usui T., Aoyagi K., Tatsuta T., Aoki K., Yanagihara K., Tamura M., Mizushima H., Sakamoto H., Ogawa K., Ohki M., Shiroishi T., Yoshida T., Sasaki G. 2007. *GASDERMIN*, suppressed frequently in gastric cancer, is a target of LMO1 in TGF-beta-dependent apoptotic signalling. *Oncogene*, 26, 45: 6488–6498
- Saeki N., Usui T., Aoyagi K., Kim D.H., Sato M., Mabuchi T., Yanagihara K., Ogawa K., Sakamoto H., Yoshida T., Sasaki H. 2009. Distinctive expression and function of four GSDM family genes (*GSDMA-D*) in normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 3: 261–271
- Salvato G. 2001. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax*, 56, 12: 902–906
- 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. *The European Respiratory Journal*, 33, 6: 1287–1294
- Sharma S., Zhou X., Thibault D.M., Himes B.E., Liu A., Szeffler S.J., Strunk R., Castro M., Hansel N.N., Diette G.B., Vonakis B.M., Adkinson N.F. Jr, Avila L., Soto-Quiros M., Barraza-Villareal A., Lemanske R.F. Jr, Solway J., Krishnan J., White S.R., Cheadle C., Berger A.E., Fan J., Boorgula M.P., Nicolae D., Gilliland F., Barnes K., London S.J., Martinez F., Ober C., Celedón J.C., Carey V.J., Weiss S.T., Raby B.A. 2014. A genome-wide survey of CD4(+) lymphocyte regulatory genetic variants identifies novel asthma genes. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 134, 5: 1153–1162
- Shasstry B.S. 2002. SNP alleles in human disease and evolution. *Journal of Human Genetics*, 47, 11: 561–566
- Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*,

29, 1: 308–311

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> (5. marec 2012)

- Shochat E., Rom-Kedar V., Segel L.A. 2007. G-CSF control of neutrophils dynamics in the blood. *Bulletin of Mathematical Biology*, 69, 7: 2299–2338
- Silverman E.K. Haplotype thinking in lung disease. 2007. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4, 1: 4–8
- Silverman E.S., Liggett S.B., Gelfand E.W., Rosenwasser L.J., Baron R.M., Bolk S., Weiss S. T., Drazen J.M. 2001. The pharmacogenetics of asthma: a candidate gene approach. *Pharmacogenomics Journal*, 1, 1: 27–37
- Simeone-Penney M.C., Severgnini M., Tu P., Homer R.J., Mariani T.J., Cohn L., Simon A.R. 2007. Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation in a murine model of asthma. *The Journal of Immunology*, 178, 10: 6191–6199
- Sleiman P.M., Flory J., Imielinski M., Bradfield J.P., Annaiah K., Willis-Owen S.A., Wang K., Rafaels N.M., Michel S., Bonnelykke K., Zhang H., Kim C.E., Frackelton E.C., Glessner J.T., Hou C., Otieno F.G., Santa E., Thomas K., Smith R.M., Glaberson W.R., Garris M., Chiavacci R.M., Beaty T.H., Ruczinski I., Orange J.S., Allen J., Spergel J.M., Grundmeier R., Mathias R.A., Christie J.D., von Mutius E., Cookson W.O., Kabesch M., Moffatt M.F., Grunstein M.M., Barnes K.C., Devoto M., Magnusson M., Li H., Grant S.F., Bisgaard H., Hakonarson H. 2010. Variants of DENND1B associated with asthma in children. *The New England Journal of Medicine*, 363, 10: 36–44
- Smit A.F.A., Hubley R. 2008–2015. RepeatModeler Open-1.0. Seattle, Institute for Systems Biology.
- <http://www.repeatmasker.org> (7. marec 2012)
- Smit L.A., Bouzigon E., Pin I, Siroux V., Monier F., Aschard H., Bousquet J., Gormand F., Just J., Le Moual N., Nadif R., Scheinmann P., Vervloet D., Lathrop M., Demenais F., Kauffmann F., EGEA Cooperative Group. 2010. 17q21 variants modify the association between early respiratory infections and asthma. *European Respiratory Journal*, 36, 1: 57–64
- Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 22, 15: 1928–1929
- Sordillo J.E., Kelly R., Bunyavanich S., McGeachie M., Qiu W., Croteau-Chonka D.C., Soto-Quiros M., Avila L., Celedón J.C., Brehm J.M., Weiss S.T., Gold D.R., Litonjua A.A. 2015. Genome-wide expression profiles identify potential targets for gene-environment interactions in asthma severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136, 4: 885–892
- Soriano J.B., Visick G.T., Muellerova H., Payvandi N., Hansell A.L. 2005. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest*, 128, 4: 2099–2107
- Spycher B.D., Henderson J., Granell R., Evans D.M., Smith G.D., Timpson N.J., Sterne J.A. 2012. Genome-wide prediction of childhood asthma and related phenotypes in a longitudinal birth cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130, 2: 503–509

- Stephens J.C., Schneider J.A., Tanguay D.A., Choi J., Acharya T., Stanley S.E., Jiang R., Messer C.J., Chew A., Han J.H., Duan J., Carr J.L., Lee M.S., Koshy B., Kumar A.M., Zhang G., Newell W.R., Windemuth A., Xu C., Kalbfleisch T.S., Shaner S.L., Arnold K., Schulz V., Drysdale C.M., Nandabalan K., Judson R.S., Ruano G., Vovis G.F. 2001. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, 293, 5529: 489–493
- Su A.I., Wiltshire T., Batalov S., Lapp H., Ching K.A., Block D., Zhang J., Soden R., Hayakawa M., Kreiman G., Cooke M.P., Walker J.R., Hogenesch J.B. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 101, 16: 6062–6067
- Szalai C., Ungvári I., Pelyhe L., Tölgyesi G., Falus A. 2008. Asthma from a pharmacogenomic point of view. *British Journal of Pharmacology*, 53, 8: 1602–1614
- Šuškovič S., Camlek T., Gril M., Hudoklin I., Klobučar A., Koren I., Koterle M., Terzin Krajnović L., Mežnar B., Silič A. 2011. Prevalenca astme v Sloveniji. *Zdravniški vestnik*, 80, 6: 141–147
- Tantisira K.G., Lake S., Silverman E.S., Palmer L.J., Lazarus R., Silverman E.K., Liggett S.B., Gelfand E.W., Rosenwasser L.J., Richter B., Israel E., Wechsler M., Gabriel S., Altshuler D., Lander E., Drazen J., Weiss S.T. 2004. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in *CRHR1* with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Human Molecular Genetics*, 13, 13:1353–1359
- Tantisira K.G., Small K.M., Litonjua A.A., Weiss S.T., Liggett S.B. 2005. Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase type 9 in asthma: interaction between beta-agonist and corticosteroid pathways. *Human Molecular Genetics*, 14, 12: 1671–1677
- Tao F.C., Tolloczko B., Eidelman D.H., Martin J.G. 1999. Enhanced Ca^{2+} mobilization in airway smooth muscle contributes to airway hyperresponsiveness in an inbred strain of rat. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, 2: 446–453
- Tavendale R., Macgregor D.F., Mukhopadhyay S., Palmer C.N. 2008. A polymorphism controlling *ORMDL3* expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 4: 860–863
- Thomsen S.F., van der Sluis S., Kyvik K.O., Skytthe A., Backer V. 2010. Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clinical & Experimental Allergy*, 40, 7: 1054–1061
- To T., Stanojevic S., Moores G., Gershon A.S., Bateman E.D., Cruz A.A., Boulet L.P. 2012. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*, 12: 204, doi: 10.1186/1471-2458-12-204: 8 str.
- Torgerson D.G., Ampleford E.J., Chiu G.Y., Gauderman W.J., Gignoux C.R., Graves P.E., Himes B.E., Levin A.M., Mathias R.A., Hancock D.B., Baurley J.W., Eng

- C., Stern D.A., Celedón J.C., Rafaels N., Capurso D., Conti D.V., Roth L.A., Soto-Quiros M., Togias A., Li X., Myers R.A., Romieu I., Van Den Berg D.J., Hu D., Hansel N.N., Hernandez R.D., Israel E., Salam M.T., Galanter J., Avila P.C., Avila L., Rodriguez-Santana J.R., Chapela R., Rodriguez-Cintron W., Diette G.B., Adkinson N.F., Abel R.A., Ross K.D., Shi M., Faruque M.U., Dunston G.M., Watson H.R., Mantese V.J., Ezurum S.C., Liang L., Ruczinski I., Ford J.G., Huntsman S., Chung K.F., Vora H., Li X., Calhoun W.J., Castro M., Sienra-Monge J.J., del Rio-Navarro B., Deichmann K.A., Heinzmann A., Wenzel S.E., Busse W.W., Gern J.E., Lemanske R.F.Jr., Beaty T.H., Bleecker E.R., Raby B.A., Meyers D.A., London S.J., Mexico City Childhood Asthma Study (MCAAS), Gilliland F.D., Children's Health Study (CHS) in HARBORS study, Burchard EG, Genetics of Asthma in Latino Americans (GALA) Study, Study of Genes-Environment and Admixture in Latino Americans (GALA2) in Study of African Americans, Asthma, Genes & Environments (SAGE), Martinez FD, Childhood Asthma Research and Education (CARE) Network, Weiss S.T., Childhood Asthma Management Program (CAMP), Williams L.K., Study of Asthma Phenotypes in Pharmacogenomic Interactions by Race-Ethnicity (SAPPHIRE), Barnes K.C., Genetic Research on Asthma in African Diaspora (GRAAD) Study, Ober C., Nicolae D.L. 2011. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nature Genetics*, 43, 9: 887–892
- Umland S.P., Schleimer R.P., Johnston S.L. 2002. Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 15, 1: 35–50
- Ulitsky I., Bartel D.P. 2013. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 3, 154: 26–46
- van der Valk R.J., Duijts L., Timpson N.J., Salam M.T., Standl M., Curtin J.A., Genuneit J., Kerhof M., Kreiner-Møller E., Cáceres A., Gref A., Liang L.L., Taal H.R., Bouzigon E., Demenais F., Nadif R., Ober C., Thompson E.E., Estrada K., Hofman A., Uitterlinden A.G., van Duijn C., Rivadeneira F., Li X., Eckel S.P., Berhane K., Gauderman W.J., Granell R., Evans D.M., St Pourcain B., McArdle W., Kemp J.P., Smith G.D., Tiesler C.M., Flexeder C., Simpson A., Murray C.S., Fuchs O., Postma D.S., Bønnelykke K., Torrent M., Andersson M., Sleiman P., Hakonarson H., Cookson W.O., Moffatt M.F., Paternoster L., Melén E., Sunyer J., Bisgaard H., Koppelman G.H., Ege M., Custovic A., Heinrich J., Gilliland F.D., Henderson A.J., Jaddoe V.W., de Jongste J.C., EARly Genetics & Lifecourse Epidemiology (EAGLE) Consortium. 2014. Fraction of exhaled nitric oxide values in childhood are associated with 17q11.2–q12 and 17q12–q21 variants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134, 1: 46–55
- Van Eerdewegh P., Little R.D., Dupuis J., Del Mastro R.G., Falls K., Simon J., Torrey D., Pandit S., McKenny J., Braunschweiger K., Walsh A., Liu Z., Hayward B., Folz C., Manning S.P., Bawa A., Saracino L., Thackston M., Benchekroun Y., Capparell N., Wang M., Adair R., Feng Y., Dubois J., FitzGerald M.G., Huang

- H., Gibson R., Allen K.M., Pedan A., Danzig M.R., Umland S.P., Egan R.W., Cuss F.M., Rorke S., Clough J.B., Holloway J.W., Holgate S.T., Keith T.P. 2002. Association of the *ADAM33* gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, 418, 6896: 426–430
- Verlaan D.J., Berlivet S., Hunninghake G.M., Madore A.M., Larivière M., Moussette S., Grundberg E., Kwan T., Ouimet M., Ge B., Hoberman R., Swiatek M., Dias J., Lam K.C., Koka V., Harmsen E., Soto-Quiros M., Avila L., Celedón J.C., Weiss S.T., Dewar K., Sinnett D., Laprise C., Raby B.A., Pastinen T., Naumova A.K. 2009. Allele-specific chromatin remodeling in the *ZBP2/GSDMB/ORMDL3* locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *The American Journal of Human Genetics*, 85, 3: 377–393
- Walker J.A., McKenzie A.N.J. 2013. Development and function of group 2 innate lymphoid cells. *Current Opinion in Immunology*, 25, 2: 148–155
- Wall J.D., Pritchard J.K. 2003. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 4, 8: 587–597
- Wan Y.I., Shrine N.R., Soler Artigas M., Wain L.V., Blakey J.D., Moffatt M.F., Bush A., Chung K.F., Cookson W.O., Strachan D.P., Heaney L., Al-Momani B.A., Mansur A.H., Manney S., Thomson N.C., Chaudhuri R., Brightling C.E., Bafadhel M., Singapuri A., Niven R., Simpson A., Holloway J.W., Howarth P.H., Hui J., Musk A.W., James A.L., Australian Asthma Genetics Consortium, Brown M.A., Baltic S., Ferreira M.A., Thompson P.J., Tobin M.D., Sayers I., Hall I.P. 2012. Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. *Thorax*, 67, 9: 762–768
- Wang K., Liu C.T., Wu Y.H., Feng Y.L., Bai H.L. 2008. Budesonide/formoterol decreases expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 1 within airway remodelling in asthma. *Advances in Therapy*, 25, 4: 342–354
- Wang S., Haynes C., Barany F., Ott J. 2009. Genome-wide autozygosity mapping in human populations. *Genetic Epidemiology*, 33, 2: 172–180
- Ward L.D., Kellis M. 2012. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research*, 40: 930–934
www.broadinstitute.org/mammals/haploreg (16. junij 2015)
- Wechsler M.E., Lehman E., Lazarus S.C., Lemanske R.F.Jr, Boushey H.A., Deykin A., Fahy J.V., Sorkness C.A., Chinchilli V.M., Craig T.J., DiMango E., Kraft M., Leone F., Martin R.J., Peters S.P., Szeffler S.J., Liu W., Israel E. 2006. Beta-Adrenergic receptor polymorphisms and response to salmeterol. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173, 5: 519–526
- Wong C.K., Ip W.K., Lam C.W. 2004. Biochemical assessment of intracellular signal transduction pathways in eosinophils: implications for pharmacotherapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41, 1: 79–113
- Worgall T.S., Veerappan A., Sung B., Kim B.I., Weiner E., Bholah R., Silver R.B., Jiang X.C., Worgall S. 2013. Impaired sphingolipid synthesis in the respiratory

- tract induces airway hyperreactivity. *Science Translational Medicine* 5, 186: 186ra67, doi: 10.1126/scitranslmed.3005765: 8 str.
- Wray N.R. 2005. Allele frequencies and the r^2 measure of linkage disequilibrium: impact on design and interpretation of association studies. *Twin Research of Human Genetics*, 8, 2: 87–94
- Yates A., Akanni W., Amode M.R., Barrell D., Billis K., Carvalho-Silva D., Cummins C., Clapham P., Fitzgerald S., Gil L., Girón C.G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S.E., Janacek S.H., Johnson N., Juettemann T., Keenan S., Lavidas I., Martin F.J., Maurel T., McLaren W., Murphy D.N., Nag R., Nuhn M., Parker A., Patricio M., Pignatelli M., Rahtz M., Riat H.S., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Wilder S.P., Zadissa A., Birney E., Harrow J., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Spudich G., Trevanion S.J., Cunningham F., Aken B.L., Zerbino D.R., Flicek P. 2016. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Research*, 44, D1: doi: 10.1093/nar/gkv1157: 6 str.
<http://www.ensembl.org/> (8. april 2016)
- Yu J., Kang M.J., Kim B.J., Kwon J.W., Song Y.H., Choi W.A., Shin Y.J., Hong S.J. 2011. Polymorphisms in *GSDMA* and *GSDMB* are associated with asthma susceptibility, atopy and BHR. *Pediatric Pulmonology*, 46, 7: 701–708
- Zanini A., Chetta A., Imperatori A.S., Spanevello A., Olivieri D. 2010. The role of the bronchial microvasculature in the airway remodelling in asthma and COPD. *Respiratory Research*, 11: 132, doi: 10.1186/1465-9921-11-132: 11 str.
- Zeki A.A., Schivo M., Chan A., Albertson T.E., Louie S. 2011. The asthma-COPD overlap syndrome: a common clinical problem in the elderly. *Journal of Allergy (Cairo)*: 861926, doi: 10.1155/2011/861926: 10 str.
- Zhang Y., Leaves N.I., Anderson G.G., Ponting C.P., Broxholme J., Holt R., Edser P., Bhattacharyya S., Dunham A., Adcock I.M., Pulleyn L., Barnes P.J., Harper J.I., Abecasis G., Cardon L., White M., Burton J., Matthews L., Mott R., Ross M., Cox R., Moffatt M.F., Cookson W.O. 2003. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nature Genetics*, 34, 2: 181–186
- Žavbi M., Korošec P., Fležar M., Škrjat Kristan S., Marc Malovrh M., Rijavec M. 2016. Polymorphisms and haplotypes of the chromosome locus 17q12-17q21.1 contribute to adult asthma susceptibility in Slovenian patients. *Human Immunology*: doi: 10.1016/j.humimm.2016.05.003: 8 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. Petru Korošču in somentorju doc. dr. Matiju Rijavcu, ki sta me s svojimi strokovnimi nasveti usmerjala in mi pomagala tekom zasnove, izvedbe in objave raziskovalnega dela.

Zahvaljujem se komisiji, izr. prof. dr. Tanji Kunej, prof. dr. Borutu Peterlinu in prof. dr. Mitju Košniku, za pregled doktorskega dela in strokovne nasvete, ki so izboljšali nalogo.

Iskrena hvala tudi vsem sodelavcem Laboratorija za molekularno genetiko in klinično imunologijo Univerzitetne klinike Golnik, s katerimi smo ob razpravah vedno prišli do zanimivih zaključkov ali novih vprašanj.

Zahvaljujem se tudi zdravnikom Univerzitetne Klinike Golnik ter drugih ustanov, ki so sodelovali pri zbiranju vzorcev in kliničnih podatkov.

Iskrena zahvala gre tudi moji družini, Matjažu in Roku, ter seveda staršem, ki so me vedno podpirali pri mojem delu. Hvala, ker ste mi vedno stali ob strani.