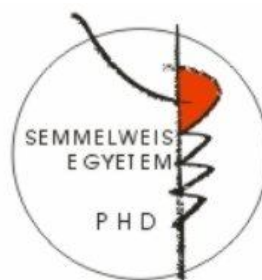


A gyermekkori asztma patomechanizmusát befolyásoló genetikai variációk és gén-környezet interakciók vizsgálata

Doktori értekezés

Ungvári Ildikó

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szalai Csaba, egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Halász Adrien, főorvos, Ph.D

Dr. Rónai Zsolt, egyetemi adjunktus, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sasvári Mária, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Mészáros Tamás, egyetemi adjunktus, Ph.D

Dr. Vizler Csaba, tudományos főmunkatárs, Ph.D

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések.....	4
1 Irodalmi áttekintés.....	8
1.1 Asztma és allergia.....	8
1.2 Az asztma epidemiológiája	9
1.3 Környezeti tényezők szerepe az asztma kialakulásában.....	10
1.4 Az asztma patomechanizmusa.....	14
1.4.1 Gyulladásos sejtek	15
1.4.2 Gyulladásos mediátorok.....	17
1.4.2.1 Kemokinek az allergia és asztma patomechanizmusában.....	17
1.4.2.2 Nitrogén-monoxid (NO).....	19
1.5 Asztma és az apoptózis	21
1.6 Az asztma genetikai háttere; a fontosabb genetikai/genomikai vizsgálati módszerek áttekintése	23
2 Célkitűzés	27
3 Módszerek.....	29
3.1 A biobank ismertetése: betegek és kontrollok.....	29
3.1.1 A genotípus asszociációs vizsgálatokban résztvevő személyek jellemzői.....	29
3.1.2 Az indukált köpet vizsgálatban résztvevő személyek jellemzői	34
3.2 Genomiális DNS szeparálás	35
3.3 Genotipizálási módszerek	36
3.3.1 RANTES -403 A/G és CCR5Δ32 polimorfizmusok genotipizálása	36
3.3.2 Genotipizálás GenomeLab SNPstream rendszerrel.....	37
3.3.3 Rs545659 genotipizálása 5' nukleáz TaqMan allél-specifikus PCR módszerrel	39
3.3.4 Genotipizálás Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technológiával ...	40
3.4 Mycoplasma pneumoniae specifikus IgG és IgA antitestek meghatározása ..	40
3.5 Laboratóriumi paraméterek meghatározása	40
3.6 Köpetindukció	41
3.7 Légzésfunkció, FENO mérés	41

3. 8	Légszennyezettségi értékek megállapítása.....	42
3. 9	Egér allergizálás	42
3. 10	RNS szeparálás, koncentrációmérés és minőség-ellenőrzés.....	42
3. 11	Reverz transzkripció és mRNS expresszió mérés TaqMan valósídejű PCR módszerrel	43
3. 12	Asszociációs vizsgálatokat megelőző bioinformatikai szűrés	43
3. 13	Asszociációs vizsgálatok során alkalmazott statisztikai módszerek	44
4	Eredmények	46
4.1	Mycoplasma pneumoniae fertőzés, RANTES -403G/A és CCR5Δ32 polimorfizmusok hatása az asztma kialakulására	46
4.2	NFE2L2 és KEAP1 gének polimorfizmusai és a légköri nitrogén-dioxid szennyezés hatása az asztma kialakulására	49
4.2.1	SNP asszociációs elmezések	51
4.2.2	Gén-környezet interakciók vizsgálata.....	54
4.3	11q13 és 14q22 kromoszómaregiók parciális genomszűrése	56
4.3.1	A frekventista statisztikai módszer eredményei	60
4.3.2	A bayesi-elemzés során kapott eredmények	63
4.3.2.1	Egyváltozós vizsgálatok.....	63
4.3.2.2	SNP-SNP és gén-gén interakciók	65
4.3.2.3	A megfigyelt asszociációk típusainak meghatározása	67
4.3.3	Génexpresszió mérés	69
4.4	A survivin szerepe az asztmában.....	70
4.4.1	BIRC5 expressziójának meghatározása ovalbuminnal allergizált egérben és humán indukált köpet mintákban.....	70
4.4.2	BIRC5 szabályozó régióiban lévő SNP-k vizsgálata.....	74
5	Megbeszélés.....	80
5.1	Vizsgálatok a bakteriális fertőzés - genetikai háttér - asztma hajlam háromszögében	80
5.2	NFE2L2 és KEAP1 gének polimorfizmusainak asztmára hajlamosító hatásának vizsgálata a légszennyezettség tükrében	81
5.3	A 11q13 és 14q22 genomterületek parciális genomszűrése során kapott eredmények megbeszélése.....	84

5.4	A BIRC5 gén szerepe az asztma illetve endofenotípusainak megjelenésében.....	90
6	Következtetések.....	93
7	Összefoglalás.....	96
8	Summary.....	97
9	Irodalomjegyzék.....	98
10	Saját publikációk jegyzéke.....	110
11	Köszönetnyilvánítás.....	112

Rövidítések

ACT	Asthma Control Test
ADAM33	A disintegrin and metalloproteinase domain 33
ADAMTS12	A disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin type motif 12
ADRB2	β 2 adrenergic receptor
ANKRD5	ankyrin repeat domain 5
ANOVA	analysis of variance
ARE	Adenylate-uridylate-rich elements
ASRGL1	asparaginase like 1
ATS	American Thoracic Society
BAL	bronchoalveolaris lavage
BDP	Beclomethason Dipropionate
BHR	bronchial hyperreactivity
BIR	Baculoviral IAP repeat
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BN-BMLA	Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance
CARD	caspase activation and recruitment domains
CCDC86	coiled-coil domain containing 86
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
CD	cluster of differentiation
CDE	cell cycle dependent element
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3
CGRRF1	cell growth regulator with ring finger domain 1
CHML	choroideremia-like
CHR	cell cycle homology region
CI	confidence interval
CLI	group with clinical data
CNIH	cornichon homolog
cNOS	constitutive NO synthase
CNV	copy number variation
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CYFIP2	cytoplasmic FMR1-interacting protein 2
CYSLTR2	cysteinyl leukotriene receptor 2
DDHD1	DDHD domain containing 1
DLGAP5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5
DPP10	dipeptidyl peptidase 10
EAACI	European Academy of Allergology and Clinical Immunology
ECP	eosinophil cationic protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMTU	epithelial mesenchymal tropic unit
eNOS	endothelial NO synthase
EP	eosinophil peroxidase
ERO1L	ERO1-like
ERS	European Respiratory Society

ESR1	estrogen receptor 1
ETT-TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásaitikai Bizottság
FcεRI	high affinity IgE receptor I
FcεRII	low affinity IgE receptor II
FENO	fractional exhaled nitric oxide
FERMT2	fermitin family homolog 2
FEV1	forced expiratory volume
FRMD6	FERM domain containing 6
GATA-3	GATA-binding factor 3
GCH1	guanosine triphosphate cyclohydrolase
GINA	Global Initiative for Asthma
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMFB	glia maturation factor, beta
GNG2	guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2
GPRA	gene protein receptor for asthma susceptibility
GPR	G protein-coupled receptor
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1
GWAS	genome-wide association study
HIV1	human immunodeficiency virus 1
HLA- DQB1	human leukocyte antigen DQ beta 1
HLA-G	human leukocyte antigen G
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
IAP	inhibitor of apoptosis protein family
ICS	inhaled corticosteroid
IFN-α	interferon- α
IFN-γ	interferon-γ
Ig	immunoglobulin
IIA	infection induced asthma
IL	interleukin
iNOS	induced NO synthase
IRAK-3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3
JAG1	jagged 1
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein-1
LATS1/2	large tumor suppressor, homolog 1/2
LHR	légúti hiperreaktivitás
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor
LGALS3	galectin-3
LOD	logarithm of odds
LOH	loss of heterozygosity
LPS	lypopolysaccharide
LTA	lymphotoxin-α
MAF	minor allele frequency
MAPK1IP1L	mitogen-activated protein kinase 1 interacting protein 1-like
MBP	major basic protein
MCP-4	macrophag chemotactic protein-4
MIP-1	macrophag inflammation protein-1
MP	Mycoplasma Pneumoniae

mRNS	messenger RNS
miRNS	microRNS
MST1/2	mammalian STE20-like protein kinase 1/2
MS4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A
NAT2	N-acetyltransferase 2
NDUFV1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein
NFE2L2	nuclear factor erythroid-derived 2-like-2
NID2	nidogen 2
nNOS	neuronal NO synthase
NO	nitrogen monoxide
NO ₂	nitrogen dioxide
NOS	nitrogen monoxide synthase
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
OOSP1	oocyte-secreted protein 1
OPN3	opsin 3
OR	odds ratio
ORMDL3	ORM1-like 3
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
PEF	peak expiratory flow
PHF11	plant homeodomain finger protein 11
PLAC1L	placenta-specific 1-like
PRPF19	Pre-mRNA-processing factor 19
PTGDR	Prostaglandin D receptor
PTGER4	Prostaglandin E4 receptor
RA	Rhinitis allergica
RANTES	regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
RFLP	restriction fragment length polymorphism
ROS	reactive oxygen species
rs#	reference SNP number
RSV	respiratory syncytial virus
RT	reverse transcription
SAMD4A	sterile alpha motif domain containing 4A
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SBE	single base extension
SCGB1	secretoglobin, family 1A, member 1
SD	standard deviation
SFRS8	splicing factor, arginine/serine-rich 8
SLC15A3	solute carrier family 15, member 3
SOCS4	suppressor of cytokine signaling 4
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4
STYX	serine/threonine/tyrosine interacting protein
TAMRA	6-karboxi-tetrametil-rodamin
TBX10	T-box-10
TCR	T cell receptor
TCRG	T cell receptor gamma
TGFB	transforming growth factor, beta

Th1	T-helper 1
Th2	T-helper 2
TLE4	transducin-like enhancer of split 4
TLR	toll-like receptor
TMEM	transmembrane protein
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TXNDC16	thioredoxin domain containing 16
VDR	1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor gene
vs.	versus
UTR	untranslated region
ZFR3	zinc finger RNA binding protein
ZP1	zona pellucida glycoprotein 1
WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1

1 Irodalmi áttekintés

1.1 Asztma és allergia

Az asztma a légutak krónikus gyulladós betegsége, melyet a kis légutak különböző stimulusokra adott, epizódokban jelentkező gyulladása és ennek következtében kialakuló szűkülete jellemez. Az asztma rohamok lehetnek enyhék és életveszélyesen súlyosak is. Kiváltásukért különböző allergének, bizonyos fertőzések, a fizikai munkavégzés, a hirtelen éghajlatváltozás, vagy egyes légszennyező anyagok is felelőssé tehetőek. Tünetei közé sorolható a légszomj, sípoló légzés, köhögés, mellkasi fájdalom és feszülés, zihálás, valamint ezek kombinációi, melyek kiterjedt, változó mértékű légúti áramlási nehezítettséggel kapcsolatosak. Az obstruktív ventilációs zavar spontán vagy gyógyszer (β_2 -mimetikum) hatására reverzibilis. A kórkép egyik kulcs tünete a különböző stimulusokkal szemben fennálló bronchiális/légúti hiperreaktivitás (BHR/LHR) [1].

Az immunológiai mechanizmusok által mediált, felismerten külső tényező által kiváltott asztmát korábban extrinsic asztmának, ma allergiás asztmának, míg ha nem ismerünk kiváltó külső tényezőt, azt intrinsic asztmának, vagy mostanában inkább nem-allergiás asztmának definiálják. Az extrinsic asztma általában már gyermekkorban kialakul és magas szérum immunglobulin E (IgE) szint jellemzi, míg az inkább felnőttkorban jellemző intrinsic asztma esetében a szérum IgE-szintje nem emelkedett. Mivel az asztma egy igen heterogén betegség, a kiváltó tényezők (pl. allergén-, vírus-, gyógyszer-, vagy terhelés-indukált), a kezelésre adott válasz (pl. szteroid érzékeny, nem-érzékeny, asztma kontrollálhatóságának mértéke), vagy a tünetek alapján (pl. súlyossági besorolások, eozinofil-, nem eozinofil-asztma) még számos asztma fenotípust, alcsoportot lehet, és szoktak megkülönböztetni.

Az allergia immunológiai mechanizmus által indított túlérzékenységi reakció (I-es típusú vagy azonnali túlérzékenységi reakció), mely lényegében a gazdaszervezet megváltozott reaktivitását jelenti egy adott ágenssel (allergénnel) való második vagy többszöri találkozás esetén. Régóta ismert, hogy az allergének csak ún. atópiás egyénekben váltanak ki túlérzékenységi reakciót. Az EAACI (European Academy of Allergology and Clinical Immunology) definíciója szerint az atópia egyéni, vagy családi hajlam arra, hogy az egyén alacsony dózisu allergén, általában fehérjék hatására IgE

ellenanyagot termeljen, és olyan jellegzetes tüneteket mutasson, mint az asztma, rhinoconjunctivitis, vagy az ekcéma/dermatitis [2]. A különféle allergiás állapotok megjelenésében a környezeti tényezők mellett tehát genetikai hajlamosító faktorok, továbbá egyes immun szabályozási zavarok is egyaránt szerepet játszanak.

Az asztma diagnózis felállítása az anamnézis, a fizikális és légzésfunkciós vizsgálat, az obstrukció reverzibilitásának vizsgálata (farmakodinámiás próba) és más diagnózisok lehetőség szerinti kizárása útján történik. Kérdéses esetekben a légúti hiperreaktivitás kimutatása megerősíti a kórismét. A legtöbb alkalmazott diagnosztikai eljárás azonban nem nyújt felvilágosítást a légutakban zajló gyulladás természetéről és súlyossági fokáról. A légúti gyulladás és az LHR pedig nem mutat olyan szoros korrelációt [3], mint azt korábban feltételezték [4]. A légutakban zajló folyamatokról biopszia és bronchoalveolaris lavage (BAL) végzésével, valamint bronchofiberoszkópos vizsgálattal, invazív módon, továbbá az indukált köpet és a kilégzett levegő kondenzátum analízisével, és a kilégzett nitrogén-monoxid (NO) koncentráció meghatározásával, non-invazív módon is valós képet nyerhetünk.

Az asztma kezelésében rendelkezésre álló gyógyszerkészítményeket alapvetően két csoportba soroljuk. A fenntartó terápiához használt szerek közé tartoznak többek között az inhalációs szteroidok (ICS), antileukotriének, hosszú hatású β 2-agonisták, és az anti-IgE, míg a tüneti kezelést leginkább a gyors hatású β 2-agonisták, szisztémás szteroidok, antikolinerg szerek, valamint a teofillin jelentik.

1.2 Az asztma epidemiológiája

Epidemiológiai vizsgálatok szerint a légúti allergiás megbetegedések gyakorisága 15-30%, míg az asztma 3,5-20%-os gyakorisággal van jelen a világ lakosságának körében [5]. Egy 2003-as felmérés alapján Magyarországon az asztma előfordulási gyakorisága 7,75%, a világon pedig becslések szerint kb. 300 millió asztmás beteg él [6, 7].

Az allergiás betegségek és az asztma kutatását kiemelt jelentőségűvé teszi, hogy a világ fejlett országaiban több ember szenved ezekben a kórképekben, mint a többi krónikus betegségben összesen. Az USA példáján szemléltetve az allergia és asztma 60 millió embert, míg a diabetes 17, a különböző rákfajták 10, koronáriás szívbetegség 7,

stroke 6, Alzheimer 5, a Parkinson kór pedig 3 millió embert érint (<http://www.aafa.org/display.cfm?id=9&sub=30>). Bár az asztmához kapcsolt mortalitás lényegesen alacsonyabb, mint az előbb felsorolt betegségek többségének esetében, a súlyos asztmások között előfordulhat a betegséggel kapcsolatos halál. Magyarországon évente kb. 200-an halnak meg a betegség következtében.

Az asztma és egyéb allergiás betegségek előfordulási gyakorisága az elmúlt évszázadban drasztikusan megemelkedett és ennek a növekvő tendenciának még napjainkban is tanúí lehetünk. A WHO becslései szerint 2025-re az asztma és a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) a harmadik vezető halálókká léphetnek elő [6]. Az asztmát ma a leggyakoribb krónikus gyermekkori betegségként tartjuk számon [8]. Ahogy már korábban említettem, a kórkép felnőttkorban is megjelenhet, viszont a két korcsoportban a kialakulás hátterében más folyamatok állnak. Az asztmában szenvedők mintegy felénél már 10 éves kor előtt kialakul a betegség, a legtöbb esetben pedig 30 éves kor előtt megjelenik. Fiatal gyermekek között a fiúk esetében kétszer olyan gyakori, mint lányoknál, a pubertást kísérő hormonális változások azonban fordítanak a képen.

Míndezek mellett fontosnak tartom megjegyezni, hogy a betegség incidenciájának és prevalenciájának pontos meghatározását nagymértékben befolyásolja az asztma nem egységes klinikai megjelenése, illetve a hasonló klinikai képet mutató kórfarmáktól (pl. krónikus obstruktív tüdőbetegség) történő elkülönítésének diagnosztikus nehézségei is.

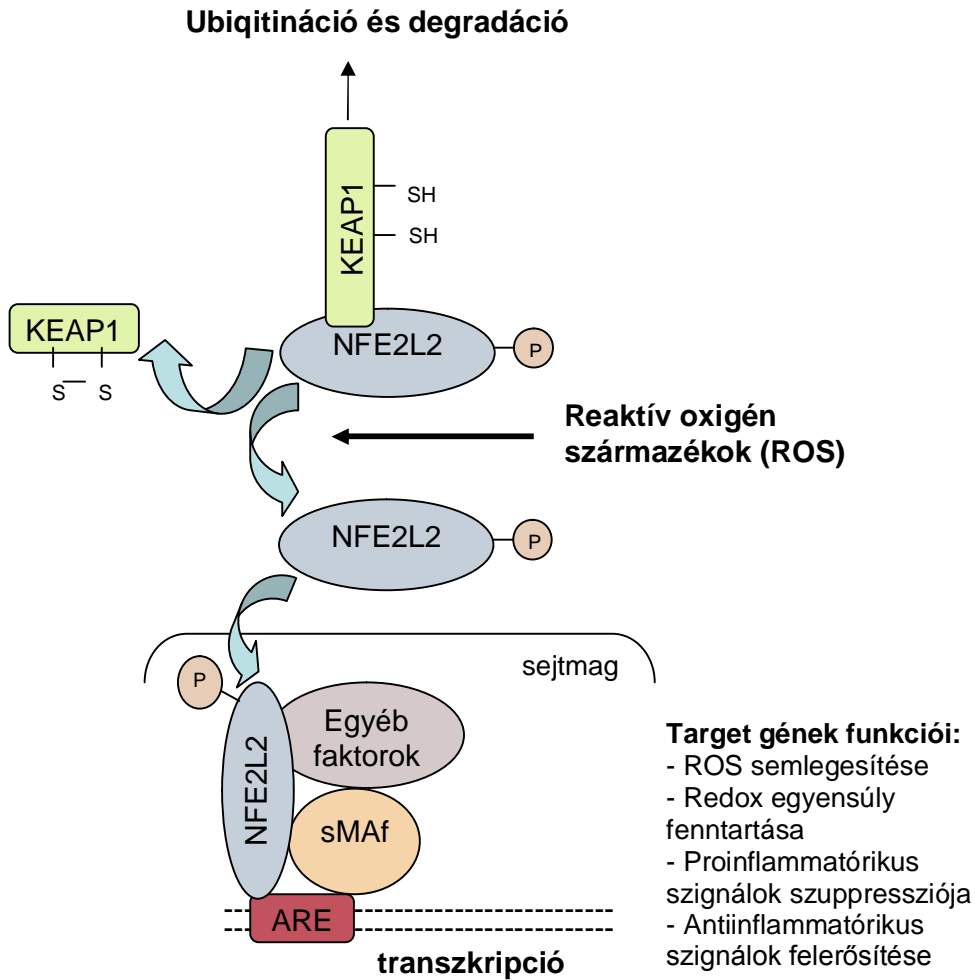
1.3 Környezeti tényezők szerepe az asztma kialakulásában

Az asztma etiológiáját tekintve egy multifaktoriális megbetegedés, kialakulását az egyéni genetikai variációk és a környezeti tényezők kölcsönhatásai határozzák meg. Egyre több kutatás támasztja alá, hogy az utóbbi évtizedekben megnövekedett asztma prevalencia és incidencia értékek javarészt környezeti és életvezetéssel kapcsolatos tényezőknek köszönhetőek. Bizonyos allergének (pl.: házipor-atka, parlagfű) [9, 10], környezetszennyező anyagok (pl.: dízel-üzemanyag égéstermékek) fokozott expozícióját [11]; táplálkozási szokások megváltozását (pl.: kevés probiotikum fogyasztását) [12]; túlzott antibiotikum-használatot [13] mind összefüggésbe hozták a kórkép megnövekedett gyakoriságával.

A légszennyezés légúti funkciókra gyakorolt kedvezőtlen hatásának vizsgálata az utóbbi időkben kiemelt figyelmet kapott. Kutatások igazolták, hogy a nitrogén-dioxid (NO₂), ózon, valamint a lebegő részecskék a szervezetbe kerülve szabad-gyök termelést és gyulladáshoz vezető választ indítanak el [14]. Poynter és munkatársai állatkísérleteik eredményeként közölték, hogy az ismételt, nagy dózisu NO₂ expozíció károsítja a tüdőt és különböző légzőszervi megbetegedésekhez vezet [15]. Linaker és munkatársai arról számoltak be, hogy már alacsony koncentrációjú NO₂ hatására megemelkedik a felső légúti infekciót követő asztma exacerbációk gyakorisága [16]. Ezzel párhuzamosan az is bizonyított, hogy a folyamatos NO₂ expozíció megnöveli a légúti fertőzések kockázatát [17].

Mára számos közlemény igazolta, hogy a légszennyező komponensek által kiváltott gyulladáshoz vezető válaszreakciót a redox jelátviteli folyamatok mediálják, ezáltal az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó molekulák különböző variánsai potenciális meghatározói a légszennyező anyagok légúti hatásait megszabó egyéni érzékenységnek.

Az oxidatív stresszválasz központi szabályozó elemei az NFE2L2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like-2) transzkripció faktor és a fehérje negatív regulátora, a KEAP1 protein (Kelch-like ECH-associated protein-1). A légszennyező anyaggal való találkozást követő alacsony szintű oxidatív stresszválasz során az NFE2L2 fehérje felszabadul a KEAP1 gátló hatása alól, és aktiválja több mint 200 antioxidáns vagy II-es fázisu detoxifikáló enzim, valamint stresszválasz fehérje átírását [18]. A folyamat sematikus rajzát az 1. ábra mutatja be.



1. ábra: Az NFE2L2 szerepe a reaktív oxigén származékok semlegesítésében

Az NFE2L2 védő szerepe nemcsak az oxidatív folyamatokban, hanem a gyulladásos megbetegedésekben is jól ismert [19]. Ovalbumin (OVA)-indukált egér asztma modellben megfigyelték, hogy az Nfe2l2-deficiens egerek nagyobb mértékű légúti gyulladással, légúti hiperreaktivitással és Th2 irányba eltolódott citokin profillal rendelkeztek OVA-indukciót követően, a vad típusú egerekkel összehasonlítva [20]. Egy másik vizsgálatban ezek az egerek fogékonyabbnak bizonyultak a cigaretta füst okozta emphysemára is [21].

Már számos tanulmány született a légszennyezés, az antioxidáns rendszer génjeinek genetikai/epigenetikai variációi és az asztma, valamint más légúti megbetegedések közötti komplex összefüggések vizsgálata nyomán. Az NO₂ expozíció által kiváltott

légtúti folyamatokban megmutatkozó egyedi eltérések genetikai meghatározottságára állatkísérletek és humán génasszociációs vizsgálatok szolgálnak bizonyítékkul [22-24]. Az utóbbi tanulmányok írták le, hogy a *GSTP1*, *NQO1*, *TNF α* , *TLR2* és *TLR4* gének polimorfizmusai jelentősen módosítják a NO₂ által meghatározott légszennyezés tüdőfunkciókra gyakorolt hatását [25, 26].

Az allergiás betegségek gyakoriságának megemelkedéséért a korai életévekben elszenvedett fertőzések számának és gyakoriságának, valamint bizonyos mikroorganizmusok által termelt anyagok (pl.: lipopoliszacharid – LPS) expozíciójának a csökkenését teszi felelőssé az ún. higiéné-hipotézis [27].

Számos vizsgálatban igazolták, hogy a korai baktérium és vírusfertőzéseken való átésés véd az asztmás fenotípus kialakulásától [28], feltehetően az immunrendszer Th1-Th2 (T-helper 1- T-helper 2) egyensúlyának Th1 irányba történő elbillentésével. Kimutatták azt is, hogy az alacsony jövedelmű családokban, illetve farmgazdaságokban élők, valamint a fejlődő országok elmaradott régióinak lakosai egyformán nagy baktériumexpozíciónak vannak kitéve, és ez a környezet csökkenti az allergiás megbetegedések kockázatát. A fertőzések védő hatása csak gyermekkorban igazolt. Feltételezik, hogy a védőoltások és antibiotikum terápia következtében ritkábbá váló (vagy kevésbé súlyos lefolyású) infekciók, a kismértékű bélféreg átfertőzöttség, valamint a csökkent környezeti mikrobaexpozíció (alacsony csíraszám) az immunrendszer szabályozási zavarát okozza [29], ami az allergiás betegségek előretörését eredményezheti.

Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a légúti vírus - (Rhinovirus, RSV) [30] és baktériumfertőzések (Chlamydia, Mycoplasma) [31] bizonyos esetekben fontos szerepet töltenek be az asztma kialakulásában, valamint az asztma exacerbációk fellépésében. Egy vizsgálatban kimutatták, hogy asztmával vagy más allergiás betegséggel szemben örökletesen fogékony (0-1 éves) gyermekek esetében az otthoni (házipor) LPS expozíció független rizikófaktora bármilyen (esetenként ismétlődő) nehézlégzésnek [32]. Már kialakult asztmában megfigyelték, hogy a betegség súlyossági foka egyenesen arányos a házipor LPS-tartalmával [33]. Egy másik közlemény pedig arról számol be, hogy a Th1 polarizációt serkentő influenza vírussal való fertőzés nemhogy enyhítette, hanem ellenkezőleg, egyenesen súlyosbította a légúti gyulladást kísérletesen előidézett egér asztma modellen [34]. Emellett megfigyelték, hogy az LPS dózisa is befolyásolja a

kiváltott immunválaszt: nagy dózisban Th1 irányú differenciációt (illetve allergizált állatokban a Th2 gyulladás csökkenését [35] eredményezi), míg kis dózisban hozzájárulhat a Th2 dominancia kialakulásához [36].

A természetes immunstimulánsok és az allergiás megbetegedések közti kapcsolatról kialakult képet tovább színezi, hogy az immunmodulációban szerepet játszó mintázatfelismerő receptorok számos polimorfizmusáról is kimutatták, hogy egyaránt lehetnek hajlamosító, vagy éppen védő hatásúak. Ennek legekleltársabb példáját a CD14-gyel kapcsolatos eredmények szolgáltatják. A molekula a bakteriális LPS (endotoxin) koreceptora és elsősorban makrofágokon fejeződik ki. A *CD14* génjének promóterében található -159T variánsát mind hajlamosító, mind pedig protektív faktorként is leírták már különböző tanulmányok [37, 38]. A legújabb kutatások szerint a polimorfizmus a környezeti LPS expozíció mértékének függvényében fejt ki védő, illetve hajlamosító hatását, vagyis a környezet befolyása csak meghatározott genetikai háttérrel párosulva érvényesül [39]. Az előzőekben bemutatott és ezekhez hasonló eredmények alapján a higiéné-hipotézis - bár számos érv szól mellette - kiegészítésre szorul, és egyre inkább egy új definíció, az ún. módosított higiéné-hipotézis van kialakulóban [40].

1.4 Az asztma patomechanizmusa

Az asztmás betegek szervezetében zajló komplex kóréletteni folyamatok ismertetése messze meghaladja ezen értekezés kereteit. Jelen dolgozatban csak egy átfogó képet szeretnék nyújtani az asztma patofiziológiájáról.

Az asztma egyik fő jellemzője a spontán, vagy gyógyszer (β_2 -mimetikum) hatására reverzibilis obstruktív ventilációs zavar. Ma már egyértelműen bizonyított, hogy az asztma hátterében a légutak gyulladással elváltozása, károsodása áll. A légúti epitél részleges lehámlása, a bronchusfal ödémás duzzanata, a fokozott mucos-eltválasztás és perivascularis valamint peribronchialis – főként limfociták és eozinofil granulociták alkotta – gyulladással sejtbeáramlás minden esetben megfigyelhető [41]. Az akut és krónikus gyulladással folyamatok végül irreverzibilis strukturális és funkcionális károsodáshoz, ún. *remodelling*-hez vezethetnek. Allergiás asztmában a folyamat hátterében egy vagy több antigén (allergén) hatására kialakuló, specifikus IgE

termelődéséhez kötött, túlzott mértékű immunaktiváció áll, amely krónikus légúti gyulladás formájában perzisztál. A betegek egy kisebb csoportját képező nem-allergiás asztmások betegsége általában idősebb korban jelentkezik és többnyire súlyosabb lefolyású.

A légúti hiperreaktivitás a hörgőrendszer simaizomzatának specifikus (pl. allergének) és aspecifikus provokáló ágensek (pl. hisztamin, metacholin) hatására fellépő fokozott mértékű görcse, mely jelentős mértékben hozzájárul a légúti obstrukció kialakulásához.

1.4.1 Gyulladásos sejtek

Az asztma patomechanizmusában számos különféle sejt vesz részt. Az asztmások bronchoalveoláris lavage folyadékában nagyszámú hízósejtet, limfocitát, eozinofilt és aktivált makrofágot tartalmaz a nem asztmás kontrollcsoportéhoz képest. A biopsziás szövetmintát is ezen sejtek akkumulációja jellemzi. A gyulladásos eltérések az enyhe asztmás csoportban tünetmentesség idején is fellelhetőek.

A *T - limfociták* központi szerepet töltenek be a légúti gyulladás kialakulásában. Az asztmás egyének légutai nagy mennyiségben tartalmaznak Th2 sejteket, melyek jellemző citokinjei az IL-4, IL-5, IL-9 és IL-13, valamint fokozottan expresszálják a GATA-3 transzkripciós faktort. A T-sejt citokinek hatásának következménye a légutak eozinofil infiltrációja, az eozinofil sejtek túlélése, a légúti hízósejtek jelenléte, és az IgE termelés. A Th1 és Th2 sejtek az általuk kifejezett citokinek révén kölcsönösen képesek egymás differenciálódását és működését gátolni. Részben ez a felismerés alapozta meg az ún. higiéne-hipotézis elméletét, melyről a korábbiakban már esett szó.

Allergiás betegségekben a *B - limfociták* izotípusváltás során IgE termelő plazmasejteké differenciálódnak. Az átalakulás beindításában az IL-4 játszik központi szerepet. Egyes újabb eredmények arra utalnak, hogy az IgE szisztémásan, illetve lokálisan megfigyelhető túltermelődése allergiás és nem-allergiás asztmában egyaránt kulcsfontosságú eleme a patomechanizmusnak [42].

A légúti kötőszövetben, a lamina propriában nagyszámú *hízósejt* található. Az allergiás reakció korai fázisában a hízósejtek krónikus aktivációja és felfokozott szekréciós tevékenysége, degranulációja figyelhető meg. A hízósejtben található

preformált bronchokonstriktor hatású mediátorok (pl. hisztamin), proteázok, citokinek kiszabadulását számos inger idézheti elő. Ilyen inger a hízósejt felszínén található nagy affinitású FcεRI-hez kötött IgE és az allergén kereszt kötése, amely az I-es típusú (azonnali) allergiás reakcióhoz vezet. A kiszabaduló mediátorok hatására akut bronchusgörcs és nyálkahártya ödéma jelentkezik, valamint fokozott mennyiségű nyák képződik. Egyes elképzelések szerint azonban a hízósejteknek a kórfolyamat korábbi fázisában, a Th2 sejtek dominanciájának kialakításában (IL-4 citokinmilió létrehozásában) is szerepe lehet [43]. Ezen korai aktiválódás elsődleges oka nem ismert, de a mikrobák konzervált struktúráit felismerő Toll-szerű receptorok (Toll-like receptor, TLR) sejt felszíni jelenléte felveti a veleszületett immunitás szerepét is ebben a folyamatban [44-46]. A hízósejtek citokintermelésük (IL-4, IL-13) révén feltehetően részt vesznek a krónikus légúti gyulladás fenntartásában is.

A *makrofágok* az alacsony affinitású FcεRII-n keresztül aktiválódnak allergének hatására. A légutakban található alveoláris makrofágok az őket ért stimulusoktól függően különböző mediátorokat képesek elválasztani, mellyel hozzájárulnak az asztmára jellemző citokinkörnyezet kialakításához és ezáltal az immunválasz irányának meghatározásához. Fiziológias körülmények között, IL-10 termelésük által gátolják az effektor limfociták működését (tolerogén hatás), de asztmásokban, allergén expozíciót követően ez jelentősen csökken [47]. A makrofágok IL-12 szintézise szintén mérséklődik asztmában, ami a Th2-irányú immunfolyamatok kialakulásának egyik eleme lehet [48].

A *dendritikus sejtek* T-sejt mediálta immunválasz indukálására képesek professzionális antigén-prezentáló sejtek. A dendritikus sejtek hálózatot képeznek a légúti epitélben, folyamatosan felveszik és feldolgozzák a belélegzett környezeti antigéneket, majd a mediastinális nyirokcsomókba vándorolva prezentálják azokat a naív T-sejteknek. Állatkísérletekben kimutatták, hogy a mieloid dendritikus sejtek kulcsfontosságúak a Th2-es immunválasz és az eozinofília kialakulásában [49].

Az *eozinofil-infiltráció* az allergiás gyulladás fő jellemzője. Az allergén inhalációt követő késői reakció idején megnő a BAL folyadék eozinofil-szintje, ami szoros korrelációban áll a légúti hiperreaktivitás mértékével. Az eozinofil granulociták számos mediátort (például fő bázikus proteint (MBP), eozinofil kationos proteint (ECP), eozinofil peroxidázt (EP)) termelnek, melyek hozzájárulnak az asztmában jellegzetes

légúti epiteliális károsodás létrehozásához és a gyulladás súlyosbításához [50]. Az eozinofil sejtek migrációját szabályozó folyamatban, mely során a sejtek a keringésből a légutak falába és a bronchoalveoláris térbe kerülnek, számos kemotaktikus hatású anyag vesz részt. Ilyen kemokinek például a RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), az eotaxin 1-3, és a makrofág kemotaktikus protein-4 (MCP 4) [51]. A légutakba jutott eozinofilek túléléséhez bizonyos növekedési és érési faktorok jelenléte szükséges. Az allergiás gyulladás során főként a GM-CSF és az IL-5 tölti be ezt a szerepet [52], ugyanis ezek jelenléte nélkül az eozinofilek apoptózis készsége fokozott [53]. Az eozinofilekkel szemben, a *neutrofil granulociták* felhalmozódása leginkább a súlyos asztmában szenvedő betegekben jellemző. A súlyos asztmások köpetében mért emelkedett IL-8 koncentráció a neutrofilek aktív toborzására utal [54], de az is elképzelhető, hogy a szteroid-kezelés neutrofil granulociták apoptózisát gátló hatása áll a neutrofil akkumuláció hátterében [55].

A légutakat alkotó szövetek - epiteliális mezenchimális trófikus egység (EMTU) - sejtjei, vagyis az az epiteliális és endoteliális sejtek, a fibroblasztok és a légúti simaizomsejtek is képesek gyulladásos mediátorok termelésére. A krónikus kórfolyamat során a *strukturális sejtek* száma messze meghaladja az inflammatorikus sejtek mennyiségét, és a krónikus légúti gyulladást eredményező mediátorok fő forrását képezik.

1.4.2 Gyulladásos mediátorok

Az asztmában szereplő sejtes és humorális immunfolyamatok szabályozásában résztvevő mediátorok sokaságából a következőkben csak az értekezés szempontjából fontos elemeket mutatom be.

1.4.2.1 Kemokinek az allergia és asztma patomechanizmusában

A szervezetünket számos gyulladást provokáló trigger éri (infekció, trauma, tumor, allergén, autoantigén, stb). A károsodás leküzdésére hivatott effektor immunsejtek helyszínre áramlását adhéziós molekulák, kemotaktikus anyagok segítik. Kemotaktikus hatásúak az IL-8, a vérlemezke aktiváló faktor, a neutrofil granulocitákból származó bizonyos peptidok, egyes bakteriális termékek (formil-metioninleucin-fenilalanin),

bizonyos enzimek (makrofág proteáz), és a különleges tulajdonságokkal bíró kemokin család is.

A kemokinek 8-10 kD súlyú, kb. 70-80 aminosavból álló heparinkötő polipeptidek. Nem csak kemotaxist indukálnak, hanem a fehérvérsejtek egy-egy alcsoportját specifikusan aktiválni is képesek. A citokinekhez hasonlóan kis koncentrációban is nagy hatás elérésére képesek. Rövid életidejűek, redundánsok és pleiotrópok. A legtöbb kemokin gén 2 intronból és 3 exonból áll. Legfontosabb konzervált csoportjaik azok a cisztein aminosavak, melyek hidrogén-hidak révén a molekula harmadlagos szerkezetének kialakításában vesznek részt. A cisztein csoportok elhelyezkedése szerint az alábbi típusokat különíthetjük el: CC, CXC, CXXC és CXXXC kemokinek [56].

Az allergiás folyamatokban leginkább a 17-es kromoszóma által kódolt CC-kemokinek (pl. Monocytic chemotactic protein-ek (MCP), Macrophage inflammatory protein -1 (MIP-1), RANTES, Eotaxin) vesznek részt. Monociták, fibroblasztok, epitél sejtek, simaizomsejtek, endotél sejtek, továbbá glióma és melanóma sejtek termelik őket. A CC-kemokinek olyan sejtekre hatnak, amelyek CCR receptorral rendelkeznek és az allergiás mechanizmusban fontos szerepet töltenek be.

A kemokinreceptorok (CCR) 7 transzmembrán doménből álló, úgynevezett szerpentinreceptor családba tartoznak. A receptor extracellulárisan elhelyezkedő aminoterminális szakasza köti a kemokinet. A jelátviteli folyamatra jellemző enzimatisz kaszkád végeredményeként a citoszkeleton átrendeződik, aktinja polimerizálódik, és a kemotaxisához szükséges elmozdulás létrejöhet.

A kemokinek fő funkciója az effektor sejtek transzendenteliális migrációjának előkészítése és végrehajtása részben az adhéziós molekulák kapcsolódásának elősegítése, részben a kemotaxisra bírt molekulák aktiválása révén. Így részt vesznek a patogének elleni küzdelemben, a leukociták aktiválásában, immunsejtek érésében, Th1/Th2 egyensúly alakításában, a gyulladós folyamatokban, sőt az angiogenezisben, sebgyógyulásban, a hemopoezisben, a metasztázis képzésben is. A krónikus allergiás gyulladásban, az allergiás asztmában az eozinofil sejtek peribronchiális felszaporodásáért az eozinofilekre kemoattraktáns RANTES, eotaxin, MCP-3, stb. tehetőek felelőssé. Ezeknek a kemokineknek vagy receptorainak mutációi, polimorfizmusai hatással lehetnek az asztma fenotípusára.

A *RANTES* promóterében két olyan polimorfizmust írtak le, melyekről sejtvonalakban igazolták, hogy befolyásolják a gén transzkripcióját. A -28C/G és a -403G/A polimorfizmus esetében is a ritka allélok növelik a promóter erősségét, így feltételezhetően a molekula szöveti szintjét is [57, 58]. Ezen promóter polimorfizmusok és az asztma, illetve atópiás megbetegedések közötti kapcsolatot vizsgálva ellentmondó eredmények születtek. Egy nemrég megjelent meta-analízisben Zhang és munkatársai azt találták, hogy egyik említett polimorfizmus sem befolyásolja az asztmára való hajlamot, bár szignifikáns eredményeket kaptak a -403 A allél kapcsán, ha csak az allergiás asztma alcsoportot vizsgálták [59].

A *RANTES* egyik receptora az egyik legtöbbet vizsgált kemokin receptor, a CCR5. Génjének 32 bázispárnai deléciós mutációja a receptor elégtelen működését, sőt annak hiányát is okozhatja. Mivel a CCR5 a HIV-1 (human immunodeficiency virus 1) koreceptora, a mutáns allél (CCR5 Δ 32) hordozása a HIV elleni részleges védettséghez vezet [60]. Már több tanulmányban vizsgálták, hogy a *RANTES* receptorának elégtelensége véd-e az asztma kialakulásával szemben. A témában megjelent közlemények azonban eltérő eredményeket mutatnak be. Hall és munkatársai a CCR5 Δ 32 mutációt szignifikánsan ritkábban tudták kimutatni skót gyermek asztmásokban, mint kontrollokból [61]. Ezzel szemben Mitchell és munkatársai nem találtak szignifikáns összefüggést ezen mutáció és az asztma/ atópia között, dél-angliai és kelet-ausztrál populációt vizsgálva [62].

1.4.2.2 Nitrogén-monoxid (NO)

A legszélesebb körben kutatott, élettani és kórélettani vonatkozásaiban leginkább ismert kilégzett gáz a nitrogén-monoxid (NO). Az NO egy rövid fél-életidejű, reaktív szabadgyök. A szervezetben az L-arginin aminosav L-citrullinná történő oxidációja során képződik, mely folyamatot a nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) enzim különböző izoformái katalizálják. A három ismert izoenzim a neuronális NOS (nNOS), az endotelialis NOS (eNOS) és az indukálható NOS (iNOS). Az nNOS a légúti simaizomzatot beidegző idegrostokban található meg [63], az eNOS pedig főként a bronchiális epitelsejtekben, a II. típusú alveoláris pneumocitákban, és az erek endotelisejtjeiben van jelen [64]. Az iNOS ugyanakkor számos strukturális sejtben (bronchiális epitél és simaizom sejtek, II. típusú pneumociták, fibroblasztok,

endotelsejtek) és gyulladásosejtekben (hízósejt, makrofág, eozinofil és neutrofil granulocita) is fellelhető [65]. Mindhárom izoenzim konstitutív módon expresszálódik az egészséges légutakban és bizonyos külső és belső hatásokra (pl. citokinek, bakteriális toxinok, fertőzések) expressziójuk és működésük egyaránt fokozódhat [66-68]. Egészséges személyekben a kilégzett levegőben mért NO-t főként az eNOS és nNOS (korábbi elnevezés szerint konstitutív – c-NOS) termeli, míg patológiás állapotokban (pl. a késői allergiás válasz során) az iNOS aktiválódik. Az NO egészségesekben főként az orr-garatüregből, illetve kis részben az alsó légutakból származik, míg az asztmásoknál mérhető emelkedett NO leginkább a mély légutakban termelődik. Egészségesekben a kilégzett levegőben az NO részaránya (FENO – a kilégzett NO frakcionális koncentrációja) 5-25 ppb (parts per billion). Az asztmásokban termelődő nagy mennyiségű NO további proinflammatorikus hatást fejt ki a légutakban: fokozza az érfal permeabilitását, kemokinek expressziójának növelésén át a gyulladásosejtes infiltrációt, valamint citotoxikus hatású. Mindez a természetes immunitás részeként hozzájárul a kórokozók elleni védelemhez, asztmában viszont a betegség progresszióját segíti elő. A kilégzett NO koncentráció asztmás betegekben korrelál az LHR mértékével, a vér és a köpet eozinofil sejtszámával, valamint az eozinofil kationos protein indukált köpetben mért szintjével [69, 70]. A kortikoszteroid [71, 72], illetve más gyulladáscsökkentő (leukotrién-receptor antagonistá [73], anti-IgE [74]) terápiák hatására jelentősen csökken a FENO értéke.

Jól ismert, hogy asztmában az NO mellett a reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species, ROS) mennyisége is megnő, melyek reakciójának eredményeképpen erősen oxidáló hatású úgynevezett reaktív nitrogén-származékok képződnek. Az NO és szuperoxid anion egyesüléséből keletkezik a peroxinitrit, egy rövid életidejű, rendkívül reaktív anyag, amely gyorsan kölcsönhatásba lép a keletkezés helyén található egyéb molekulákkal, és azok módosulását (nitrálását) okozza. Állatkísérletben kimutatták, hogy a peroxinitrit fokozza az LHR-t, és aktiválja az eozinofil granulocitákat [75]. Mivel a fokozott NO szintézis számos ponton kapcsolódik az asztma patomechanizmusához, az American Thoracic Society (ATS) és a European Respiratory Society (ERS) közös ajánlása alapján [76] – a FENO jól használható a betegek kezelésének nyomon követésére. Habár a megemelkedett FENO támogatja az asztma diagnózisát, más betegségekben, például a krónikus obstruktív tüdőbetegség akut

exacerbációban is magas értéket kaphatunk [77]. Fontos szem előtt tartani azt is, hogy a FENO abszolút számértékéből nem következtethetünk az asztma súlyossági fokára, mivel értéke (különösen szteroid-kezelt asztmásokban) rosszul korrelál a légzésfunkciós eltérésekkel, valamint számos tényező, például a dohányzás [78], infekciók [79, 80] és a légúti gyulladás minősége (pl.: eozinofil vagy neutrofil túlsúly) is befolyásolhatja [81].

1.5 Asztma és az apoptózis

Régóta ismert, hogy az apoptotikus folyamatok az asztma patomechanizmusában központi szerepet töltenek be [82]. Kimutatták, hogy rhinovírus fertőzést követően az asztmások tüdejének epitel sejtjei nem lépnek az apoptózisba, hanem az osztódó vírus direkt citopátiás hatásának köszönhetően pusztulnak el [83, 84]. Emellett több tanulmány igazolta, hogy az eozinofilek bronchiális szövetekben történő felhalmozódása az asztmás folyamat során, egyrészt az apoptózis, másrészt az eozinofilek makrofágok általi eltakarításának („eosinophil-clearance”) hibás működésének köszönhető [85-87]. Duncan és munkatársai azt is kimutatták, hogy az eozinofil sejtek apoptózisának mértéke korrelációt mutat az asztma súlyossági fokával [88].

A sejt túlélése és az apoptózis közötti egészséges egyensúly fenntartásában és kontrollálásában számos szabályozó molekula vesz részt. Az utóbbi évek kutatásai nyilvánvalóvá tették, hogy ezen szabályozó fehérjék funkciói gyakran sokkal összetettebbek, mint azt eleinte gondoltuk [89]. Erra talán a legjobb példát nyújtják az apoptózis inhibitor fehérjecsald (inhibitor of apoptosis protein family, IAP) tagjai, melyekről bebizonyosodott, hogy a kaspáz-függő apoptotikus útvonalak gátlásán túl fontos szerepet töltenek be a sejtciklus és sejtosztódás szabályozásában is. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a fehérjecsald tagjainak rendellenes expressziója a sejtek kóros működéséhez és kontrollálatlan sejtosztódáshoz vezethet.

A BIRC5 (Baculoviral IAP repeat containing 5), másnéven survivin, az apoptózis inhibitor fehérjecsald egyik fontos tagja. A 16,5 kDa méretű fehérjét egy 14,7 kb hosszúságú, 4 exont és 3 intront tartalmazó gén kódolja, amely a 17. kromoszómán lokalizálódik. Az IAP család többi tagjával szemben a BIRC5 csak egy darab N-terminálisan elhelyezkedő BIR (baculovirus IAP repeat) domént tartalmaz, és nem

rendelkezik a család többi tagjára jellemző RING vagy CARD doménnel, melyek a terminális effektor kaszpáz-3 és kaszpáz-7 megkötéséért és direkt inaktiválásáért felelősek [90]. A BIRC5 apoptózis-gátló hatását egyéb IAP fehérjékkel és más interakciós partnerekkel való kapcsolódás útján fejti ki.

A *BIRC5* gén terméke sejtciklus-függő módon expresszálódik és legnagyobb mennyiségben a G2/M fázisban, a mitotikus apparátushoz kapcsolódva van jelen [91]. A gén promóterének proximális szakaszán egy sejtciklus homológ régió (CHR, cell cycle homology region) és sejtciklus-függő elemek (CDE, cell cycle dependent element) helyezkednek el, melyek a fehérje transzkripció szintű szabályozását mediálják [92]. Az interfázisban a fehérje szintje gyorsan lecsökken, degradációjáért az ubiquitin-függő lebontó folyamatok a felelősek [93].

Sokáig úgy tartottuk, hogy a BIRC5 leginkább a magzati szövetekben expresszálódik, és csak elhanyagolható mértékben van jelen a terminálisan differenciálódott felnőtt szövetekben. Kivételt képeznek ez alól a tumoros szövetek, melyekben a BIRC5 expresszió jelentős megemelkedését figyelhetjük meg. Ennek következtében a BIRC5 az utóbbi évek daganatok ellen irányuló terápiáinak kiemelt célpontjává vált [94]. Újabb tanulmányok azonban kimutatták, hogy a BIRC5 tumorfejlődésben és tumorprogresszióban betöltött szerepén túl fontos résztvevője lehet különböző gyulladási folyamatoknak, és az asztma patogenezisében betöltött szerepére utaló adatok is megjelentek [95-97].

A munkacsoportunk által korábban létrehozott ovalbumin-indukált egér asztma modellben, microarray elemzés során azt találtuk, hogy a Birc5 mRNS szintje az OVA-indukciót követően jelentősen megemelkedett (fold change érték: 5,94, $p = 0.001$) [98]. A mi eredményeinkkel egybecsengő adatokat közöltek Tumes és munkatársai is [99]. Tanulmányukban továbbá leírták azt is, hogy a bronchoalveoláris folyadékból kinyert eozinofil sejtekben a Birc5 mRNS és fehérje szintje erős korrelációt mutat az eozinofil sejtszámmal.

1.6 Az asztma genetikai háttere; a fontosabb genetikai/genomikai vizsgálati módszerek áttekintése

Az utóbbi évtizedekben megfigyelhető, a molekuláris biológia és bioinformatika területén zajló rohammértékű fejlődés ellenére a multifaktoriális betegségek genetikai hátteréről és patomechanizmusáról szóló ismereteink még mindig nagyon korlátozottak. Nemcsak azért, mert ezeket a kórképeket számos gén, illetve azok módosulásai befolyásolják, hanem számolni kell azok komplex kölcsönhatásaival, valamint a genetikai és környezeti faktorok sajátos egymásra hatásával is.

Az asztmára való hajlam genetikai meghatározottságára az első bizonyítékokat iker-vizsgálatok szolgáltatották, melyek a jelleg örökölhetőségének mértékét 36% és 77% között becsülték (konkordancia értékek) [100-103]. Leírták továbbá, hogy ha egyik szülő sem allergiás, akkor az allergiás betegség előfordulási gyakorisága gyermekeikben csak 11-13%, míg ha mindkét szülő érintett, akkor ez 50-70%-ra nő [104].

Napjainkban alapvetően háromféle vizsgálati mód létezik, amit a komplex betegségek genetikai hátterének felfedésére rutinszerűen alkalmaznak a kutatók. Ezek a jelölt gén-asszociációs vizsgálatok, a teljes genomszűrések és a teljes genom asszociációs vizsgálatok (GWAS).

A betegségek genetikai hátterének felfedésére alkalmazott módszerek közül a legnépszerűbbek az ún. *jelölt gén-asszociációs vizsgálatok*, melyek során előre meghatározott génekben vagy azok közelében található genetikai variációk gyakoriságát hasonlítjuk össze egészséges és beteg populációkban. Napjainkra több mint 1000 génasszociációs tanulmány látott már napvilágot, melyek több mint 120 gént hoztak kapcsolatba az asztmával, illetve az asztmához és atópiához köthető fenotípusokkal [105]. Eddig azonban mindössze 54 olyan gént találtak, amelyet sikerült 2-5 független vizsgálatban igazolni, 15 gént, amelyet 6-10 vizsgálatban, és 10 gént, amelyet több mint 10 vizsgálatban. Ez utóbbiakban található genetikai variációkról jelenthető ki, hogy nagy valószínűséggel befolyásolják az asztmára, allergiára való hajlamot, bár természetesen a többi gén és variációinak szerepe sem zárható ki. Ezek a gének a következők: interleukin-4 (*IL4*), interleukin-13 (*IL13*), β 2 adrenergic receptor (*ADRB2*), fő hisztokompatibilitási komplex, class II, DQ β 1 (*HLA-DQB1*), tumor necrosis factor-

α (*TNF*), lymphotoxin- α (*LTA*), nagy affinitású IgE receptor (*Fc ϵ RIA* és *MS4A2*), IL-4 receptor (*IL4R*), *CD14* és *ADAM33* [106-120].

A jelölt gén asszociációs vizsgálatok legnagyobb hátránya, hogy prekonceptióra épülnek és nem képesek átfogó képet adni az ún. multifaktoriális, vagy gyakori betegségekről (pl. cukorbetegség, atherosclerosis, magas vérnyomás, asztma stb.), ahol több száz genetikai variáció egymásra hatásából alakul ki az a genetikai hajlam, amely a környezeti faktorok hatására végül betegséghez vezet. A problémára egyfajta megoldást jelentenek a *teljes genomszűrések*, ahol beteg testvérpárral rendelkező családokban több száz mikroszatellita-marker eloszlását vizsgálják. Ezen vizsgálatok eredményeképpen számos olyan genomterület került azonosításra, melyek asztmára/atópiára hajlamosító géneket tartalmaznak. Mivel ezek a genomterületek általában 10-20 millió bázispár nagyságúak, egyenként több száz jelölt gént is tartalmazhatnak. 1999-ben publikálták az első olyan tanulmányt, amelyben az asztma és egy konkrét genetikai lókus (11q13) közti kapcsoltságról számolnak be a szerzők [121]. További kapcsoltsági elemzések eredményeképpen, pontosabban az azokat követő pozicionális klónozás során azonosították a következő asztmához köthető géneket: *ADAM33* (A disintegrin and metalloproteinase domain 33) [107], *DPP10* (dipeptidyl peptidase 10) [122], *GPRA* (gene protein receptor for asztma susceptibility) [123], *HLA-G* (human leukocyte antigen G) [124], *CYFIP2* (cytoplasmic FMR1-interacting protein 2) [125], *ORMDL3* (ORM1-like 3) [126].

Bár a kapcsoltsági vizsgálatok sok értékes eredményt hoztak [127], a módszer számos gyakorlati nehézséget rejtett magában. Ezen problémák orvosolásának igénye és a rohamértékű technikai fejlődés végül a ma leghatékonyabbnak tartott genomikai vizsgálati mód, a *teljes genom asszociációs analízis* (*GWAS*) megjelenéséhez vezettek. Az egyszerre több százezer SNP-t (single nucleotid polymorphism) és CNV-t (copy number variation) vizsgáló nagy áteresztőképességű módszer alkalmazásával már több asztmára hajlamosító gént/genomterületet írtak le. Az asztmához köthető legfontosabb genomterületeket és az ott lokalizálódó kandidáns géneket foglalja össze az 1. táblázat.

1. táblázat: Az asztmához vagy asztmához-kapcsolt fenotípusokhoz köthető fontosabb kromoszómális régiók és gének.

Kromoszóma	Lókusz	Kandidáns gének
1	1p36,1qter,1q23	<i>FCERIA,OPN3,CHML, IL10</i>
2	2q14,2q32,2q33,2p	<i>DPP10,IL18R1,CTLA4, CD28</i>
3	3q21-q22,3q21.3,3p	<i>TLR9</i>
5	5q31-q33,5q31,5p13,5p15,5q23.3	<i>IL4,IL9,ZFR3,LIFR, PTGER4,ADAMTS12,IL7R</i>
6	6p21,6q24-q25,6q25.3	<i>HLAG, ESRI,TNF</i>
7	7p14-p15,7q	<i>TCRG, GPR154</i>
8	8p23.3-23.2	<i>NAT2</i>
9	9p1,9p21,9p22	<i>TLE4,IFNA</i>
11	11q13,11q21,11q,11p14	<i>MS4A2,GSTP1</i>
12	12q13.12-q23.3,12q13-12q24,12q21,12q24.31,12q24.33	<i>SFRS8,CD45,IFNG, IRAK3,VDR</i>
13	13q14,13q	<i>PHF11,CYSLTR2</i>
14	14q11.2,14q13-q23,14q24,14q23	<i>TCR,ACT</i>
17	17q21	<i>ORMDL3</i>
19	19q13,19q13.3	<i>FCER2</i>
20	20q13,20p12	<i>ADAM33,JAG1,ANKRD5</i>
21	21p21	-
x	Xp,Xq	-

A táblázat Gu és Zhao cikke nyomán készült [128].

A funkcionális genomika egyik ágát képező *microarray vizsgálatok* a betegekben és egészségesekben eltérően expresszálódó géneket tárják fel, melyek nagy valószínűséggel szerepet játszanak a betegség kialakulásában. A humán tüdőszövetből származó minta korlátozott hozzáférhetősége miatt azonban gyakran csak állatkísérletek eredményei állnak rendelkezésünkre, melyek humán érvényessége korlátozott.

A GWAS-ok, a teljes genom szekvenálás, vagy a *microarray vizsgálatok* során keletkező óriási adathalmazok, valamint az egyre komplexebb képet mutató genomikai hálózatok elemzéséhez a technikai fejlődéssel párhuzamosan új, integrált elemzéseket lehetővé tevő statisztikai, bioinformatikai módszerek széles palettája jelent meg. A grafikus valószínűségi modellek egyik nagy előnye a hagyományos statisztikákkal szemben, hogy a génasszociációs tanulmányokat gyakran jellemző, itt nem részletezett torzító hatásoktól mintegy függetlenül, hatékonyan és pontosan reprezentálnak komplex hálózatokat. Az ilyen modellek egyik legelterjedtebb változatát a *Bayes-*

hálózatok jelentik, melyek egyértelmű grafikus modelleken keresztül jelenítik meg és különítik el a célváltozóra ható direkt és indirekt hatásokat, és a vizsgált változók közötti potenciális kapcsolatokat. Ezáltal a bayesi statisztikán alapuló elemzések több releváns változót képesek detektálni, mint a genetikai vizsgálatok során általánosan alkalmazott, gyakoriságon alapuló statisztikai elemzések, melyek esetében a nem közvetlenül vagy nem önmagában ható változók általában rejtve maradnak.

2 Célkitűzés

Kutatásaink során az asztma patomechanizmusának genetikai - genomikai hátterét vizsgáltuk.

Munkám célkitűzései az alábbiakban foglalhatóak össze:

1. A genetikai és környezeti tényezők interakciójának vizsgálata az asztma kialakulásában
 - Annak vizsgálata, hogy az asztma patomechanizmusában fontos szerepet játszó *CCR5* valamint *RANTES* gének gyakori polimorfizmusai módosítják-e a *Mycoplasma pneumoniae* fertőzésre, illetve az asztmára való hajlamot.
 - Az oxidatív stresszválaszban központi mediátor szerepet betöltő *NFE2L2* és a *KEAP1* gének szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok és a légszennyezettségi markerként használt NO₂ koncentráció közötti összefüggések feltárása az asztma kialakulásában betöltött szerepükre nézve.
2. Asztmára hajlamosító genetikai tényezők vizsgálata olyan, korábbi kapcsoltsági elemzések alapján azonosított ún. asztma-régiókon, mint a 11q13 illetve a 14q22.
 - Mivel a sok SNP-t nagyszámú mintán vizsgáló elemzésekből származó adatmennyiség a klasszikus statisztikai eljárásokon túl az interakciós elemzéseket is lehetővé teszi, célunk az adatainkat a többszintű elemzésre is alkalmas Bayesi statisztika eszközeivel is megvizsgálni.
 - A betegségasszociációt mutató polimorfizmusokat hordozó gének expressziós szintjének meghatározása és összehasonlítása egészséges és asztmás populációban.
3. A munkacsoportunk által korábban előállított ovalbumin-indukált egér asztma modell eredményei alapján az antiapoptotikus *BIRC5* gén asztma-asszociációjának vizsgálata humán mintákon.
 - A gén szabályozó régióiban található polimorfizmusainak asszociációs vizsgálata.

- A gén expressziós szintjének megállapítása és összevetése egészséges és asztmás populációban.

3 Módszerek

3.1 A biobank ismertetése: betegek és kontrollok

3.1.1 A genotípus asszociációs vizsgálatokban résztvevő személyek jellemzői

Az asszociációs vizsgálatokba bevont beteg és kontroll populációk mérete a folyamatosan bővülő biobankunkban aktuálisan rendelkezésünkre álló mintaszám, az alkalmazott genotipizálási módszerek korlátai és a felmerülő költségek következtében vizsgálatonként eltérő. Az egyes mérésekben résztvevő beteg és kontroll csoportok jellemzőit a 2., 3., 4. és 5. táblázatok foglalják össze. Mivel az egyes vizsgálatokban más-más klinikai, illetve egyéb jellemző tekintetében vizsgáltuk a mintapopulációt, a feltüntetett paraméterek táblázatonként kismértékben eltérnek.

2. táblázat: A *CCR5* és *RANTES* gének polimorfizmusainak, valamint a *M. pneumoniae* fertőzés asztmára hajlamosító együttes hatásának tanulmányozásához felhasznált vizsgálati populáció jellemzői.

	Betegek n (%)	Kontrollok n (%)	p-érték^b
Esetszám	254	260	-
Életkor (átlag ± SD, év)	10,4 ± 4,6	11,1 ± 5,1	-
Nem (férfi/nő)	130/124	124/136	-
Atópia	202 (79,5%)	48 (23,8%)	*
Asztma súlyossága^a			
enyhe asztma	72 (28,4%)	–	-
mérsékelt asztma	182 (71,6%)	–	-
súlyos asztma	0 (0%)	–	-
Szérum abszolút eozinofil szám (átlag±SD, G/L)^a	0,33±1,47	0,23 ± 1,2	*
IgE (átlag±SD, kU/L)^a	260,0 ± 281,1	108,1 ± 206,0	*
<i>M. pneumoniae</i> pozitívitas	79 (31,1%)	47 (18,1%)	*

^a: Az asztma súlyossági fokok meghatározása a GINA (Global Initiative for Asthma) kritériumok alapján történt.

^b: A csoportok közötti eltérés szignifikancia szintje, ahol értelmezhető.

* jelzi, hogy az adott paraméter szintjében mérhető eltérés a vizsgált csoportok között statisztikailag szignifikáns, $p < 0,05$.

n: esetszám

3. táblázat: az *NFE2L2* és *KEAP1* gének polimorfizmusainak és a légszennyezettség asztmára hajlamosító együttes hatásának tanulmányozásához felhasznált vizsgálati populáció jellemzői.

	Betegek n (%)	Kontrollok n (%)	p-érték^b
Esetszám	307	344	-
Életkor (átlag ± SD, év)	10,5 ± 4,7	21,8 ± 13,9	*
Nem (férfi/nő)	200/107	173/171	*
Endofenotípusok			
Atópia	191 (62,2%)	–	-
Terheléses asztma	63 (20,5%)	–	-
Infekciós asztma	88 (28,7%)	–	-
Nem-allergiás asztma	59 (19,2%)	–	-
Asztma súlyossága^a			
enyhe asztma	117 (38,1%)	–	-
mérsékelt asztma	165 (53,7%)	–	-
súlyos asztma	25 (8,1%)	–	-
NO₂ koncentráció alapján a lakóhely légszennyezettsége			
Magas (≥32 µg/m ³)	116 (37,8%)	285 (82,8%)	*
Alacsony (≤32 µg/m ³)	191 (62,2%)	59 (17,2%)	*

^a : Az asztma súlyossági fokok meghatározása a GINA kritériumok alapján történt.

^b : A csoportok közötti eltérés szignifikancia szintje.

* jelzi, hogy az adott paraméter szintjében mérhető eltérés a vizsgált csoportok között statisztikailag szignifikáns, $p < 0,05$.

n: esetszám

A légköri NO₂ koncentráció adatokat az Országos Légszennyezettségi Mérőhálózat mérőállomásain detektálták.

4. táblázat: A *BIRC5* gén polimorfizmusainak asztmára hajlamosító hatásának tanulmányozásához felhasznált vizsgálati populáció jellemzői.

	Betegek n (%)	Kontrollok n (%)	p-érték^b
Esetszám	307	344	-
Életkor (átlag ± SD, év)	10,6 ± 4,7	21,8 ± 13,9	*
Nem (férfi/nő)	200/107	173/171	*
Endofenotípusok			
Atópia	191 (62,2%)	–	-
Terheléses asztma	63 (20,5%)	–	-
Infekciós asztma	88 (28,7%)	–	-
Nem-allergiás asztma	59 (19,2%)	–	-
Asztma társbetegséggel (allergiás rhinitis vagy allergiás conjunctivitis)	110 (35,8%)	–	-
Szérum abszolút eozinofil szám (átlag±SD, G/L)^a	0,37±0,27	0,25±0,21	*
Normális/magas abszolút eozinofil sejtszámmal rendelkezők^a	33/78	34/21	*
Szérum relatív eozinofil szám (átlag±SD, %)^a	5,5 ± 4,2	3,7 ± 2,6	*
Normális/magas relatív eozinofil sejtszámmal rendelkezők^a	68/49	53/5	*
IgE (átlag±SD, kU/L)^a	288,1 ± 317,1	83,5 ± 165,8	*
Normális/magas IgE szinttel rendelkezők^a	43/73	70/20	*

^a : Az adatok a mintapopuláció egy részében álltak rendelkezésünkre

^b : A csoportok közötti eltérés szignifikancia szintje.

* jelzi, hogy az adott paraméter szintjében mérhető eltérés a vizsgált csoportok között statisztikailag szignifikáns, $p < 0,05$.

A 11q13 és 14q22 kromoszómaregiók parciális genomszűrése során a bayesi elemzéseket a vizsgálati populáció három részhalmazán végeztük el. Jellemzőiket az 5. táblázat foglalja össze.

Az 1. halmaz az összes, vizsgálatba bevont személyt tartalmazta („A” halmaz).

A 2. halmazba azokat a személyeket vontuk be, akik esetében az allergiás rhinitis státusz ismert volt. Ez a populáció magába foglalta az összes asztmást (436 fő) és 664 kontrollt.

A 3. halmazba azok a vizsgálati személyek kerültek be, akiknél olyan klinikai paraméterek, mint a szérum IgE, illetve szérum eozinofil sejtszám is elérhetőek voltak.

5. táblázat: A parciális genomszűrésben résztvevő mintapopulációk jellemzői.

Teljes ("A") mintapopuláció			
	Betegek n (%)	Kontrollok n (%)	p-érték^b
Esetszám	436	765	-
Életkor (átlag ± SD, év)	11,7 ± 6,3	19,0 ± 12,1	*
Nem (férfi/nő)	278/158	405/360	*
Allergiás rhinitis ("RA") mintapopuláció			
Esetszám	436	664	-
Életkor (átlag ± SD, év)	11,7 ± 6,3	17,8 ± 11,2	*
Nem (férfi/nő)	278/158	365/299	*
Rhinitis (%)	278 (64,0)	233 (35,1)	*
Klinikai („CLP”) mintapopuláció			
Esetszám	106	94	-
Életkor (átlag ± SD, év)	11,5 ± 6,1	16 ± 8,2	*
Nem (férfi/nő)	63/43	55/39	-
Rhinitis (%)	70 (66,0)	30 (31,9)	*
IgE (átlag±SD, kU/L)	260,4 ± 111	94,6 ± 63	*
Szérum abszolút eozinofil szám (átlag±SD, G/L)	0,34 ± 0,25	0,14 ± 0,07	*

Az asszociációs vizsgálatokban résztvevő asztmás gyermekek a Budai Gyermekkorház Allergológiai szakambulanciáján jelentkeztek. Mindegyik gyermeknek szakorvos által diagnosztizált asztmája volt, melyet az alábbiak jellemeztek: (1) visszatérő, kezelést igénylő légszomj és kilégzési nehezítettség (dyspnoe); (2) orvos által diagnosztizált fulladás/fulladásos roham sípoló légzéssel; (3) bronchodilatátor kezelés hatására reverzibilis fulladás (sípoló légzés) és dyspnoe, melyet a FEV1 (1 másodperc alatti forszírozott kilégzési levegőtérfogat) segítségével határoztak meg. Az asztmás gyermekeket (vagy szüleiket) megtanították arra, hogy pontosan jegyezzék föl két héten keresztül tüneteiket és kezelésüket, valamint egy nap kétszer (este és reggel) mérjék meg PEF (kilégzési csúcsáramlás) értékeiket. Az 5-évesnél fiatalabb gyermekeknél – akiknél általában nem volt lehetséges se a PEF, se a FEV1 mérése – a betegség diagnózisát az egyéb tünetek alapján végezték el.

Az asztma klasszifikációt, vagyis a különböző szub/endofenotípusokhoz való tartozás megállapítását a szakorvos a következő kritériumok alapján végezte:

- Az atópiás állapotot egy vagy több antigénre adott pozitív prick bőrpróba (legalább 3 mm átmérőjű csalángöb) vagy emelkedett teljes vagy specifikus IgE szint, illetve ezek együttes előfordulása jelezte.
- Ha az asztma kialakulása vagy az asztma rohamok megjelenése valamilyen fertőzés eredetű akut felső légúti megbetegéssel társult, a beteg az infekciós asztma alcsoportba került.
- Azon páciensek esetében, akiknél jelentős fizikai terhelés során asztma rohamok léptek fel és a FEV értékük a terhelés előttihez képest legalább 10%-os csökkenést mutatott, terheléses asztmáról beszéltünk.

Fontos megjegyezni, hogy az említett szubfenotípusok számos esetben átfednek egymással, így a terheléses illetve infekciós alcsoportba tartozó páciensek számos esetben allergiás fenotípust is mutatnak. A korábban intrinsic névvel jelzett nem allergiás alcsoportot így csak azok a terheléses vagy infekciós asztmás alcsoportokba tartozó személyek jelentették, akiknél a fent leírt módokon atópiás reakció nem volt kimutatható.

Az allergiás rhinitis diagnózisát szakorvos végezte el a fennálló tünetek (orrduugulás, vizes orrfolyás, általános közérzetromlás, kimutatható megfázás vagy influenza fennállása nélkül) alapján.

A páciensek egy részénél nem történt meg az asztma klasszifikációja, így az endofenotípusokat érintő vizsgálatokban ők nem vehettek részt.

A kontroll gyermekeket véletlenszerűen választottuk ki a Budai Gyermekkorház Ortopédiai Osztályáról illetve a Heim Pál Gyermekkorház Urológiai Osztályáról. A felnőtt kontrollok egészséges véradók közül kerültek ki.

A *Mycoplasma* fertőzés és asztma közti asszociációt vizsgáló munkánkban (a dolgozat 4.1 pontja) kizártuk a kontroll populációból azokat a személyeket, akik a vizsgálatot megelőző 6 hétben bármilyen gyógyszeres kezelés alatt álltak, illetve akiknek akut *Mycoplasma Pneumoniae* vagy egyéb kimutatható bakteriális vagy virális fertőzésük volt.

3.1.2 Az indukált köpet vizsgálatban résztvevő személyek jellemzői

Az indukált köpet génexpressziós vizsgálatába 34 személyt vontunk be, de néhány esetben a produkált köpet mennyiségi vagy minőségi szempontok alapján nem bizonyult mérésre alkalmasnak. A BIRC5 mRNS szintjét 13 asztmás (6 férfi, 7 nő, életkor: 19-56 év, átlag 34,6, SD: 10,1) és 10 egészséges (5 férfi és 5 nő, életkor: 22-40 év, átlag 30,1 év, SD: 4,1) egyénből származó köpetmintában hasonlítottuk össze. Az FRDM6, PRPF19, AHNAK, PTGER és PTGDR mRNS szintjét 12 asztmás (5 férfi, 7 nő; életkor: 19-61 év, átlag 36,3 év, SD: 13,0) és 9 kontroll (4 férfi, 5 nő, életkor: 22-40 év, átlag 29,3 év, SD: 4,9) mintában vizsgáltuk.

Az asztmás pácienseknél a diagnózist a GINA nemzetközi útmutató, a Global Initiative for Asthma guidelines (<http://www.ginasthma.org/>) alapján szakorvos állította fel. Légzésfunkció adataik alapján enyhe (n = 4), illetve középestől súlyosig terjedő (n = 9) asztma stádiumba sorolta őket. Tíz beteg rendszeres inhalatív kortikoszteroid kezelés alatt állt, a következő dózisokban: <500 µg/nap Beclomethason Dipropionate (BDP) vagy annak megfelelő dózis (n = 4), 500–1000 µg/nap BDP vagy annak megfelelő dózis (n = 4) és >1000 µg/nap BDP vagy annak megfelelő dózis (n = 2). A páciensek asztma kontroll értékeit a nemzetközi Asthma Control Test™ (ACT; QualityMetric, Inc., Lincoln, RI, USA) hitelesített magyar fordítása alapján vettük fel.

Az egészséges kontrollok budapesti egyetemek dolgozói és hallgatói közül kerültek ki. Légzésfunkció értékeik normális tartományba estek, és esetükben semmilyen légzőszervi betegség nem állt fenn.

Az egészséges és asztmás kohortok között nem, kor, dohányzási szokások és allergiás státusz tekintetében statisztikai eltérést nem mutattunk ki. A vizsgálatban résztvevő személyek egyike sem esett át légúti fertőzésen a vizsgálatot megelőző 4 hétben.

6. táblázat: A köpetindukcióban résztvevő személyek jellemzői.

	Betegek n (%)	Kontrollok n (%)	p-érték^b
Esetszám	13	10	-
Életkor (átlag \pm SD, év)	34.6 \pm 10.1	30.1 \pm 4.1	-
Nem (férfi/nő)	6/7	5/5	-
Dohányzási szokás (igen/nem)	7/6	6/4	-
Asztma súlyossága ^a			
Enyhe	4 (30)	-	-
Mérsékelt és súlyos	9 (70)	-	-
Allergia (igen/nem)	10/3	5/5	-
Köpet eozinofil%	12.2 \pm 11.3	0 \pm 0	*
Köpet neutrophil %	25.1 \pm 17.7	20.0 \pm 10.0	-
Köpet makrofág %	61.7 \pm 15.0	74.4 \pm 8.4	-
Köpet bronchialis epithél sejt %	1.3 \pm 1.7	5.6 \pm 5.3	*

^a : Az asztma súlyossági fokok meghatározása a GINA kritériumok alapján történt

^b: A csoportok közötti eltérés szignifikancia szintje.

* jelzi, hogy az adott paraméter szintjében mérhető eltérés a vizsgált csoportok között statisztikailag szignifikáns, $p < 0,05$.

n: esetszám

A dolgozat során bemutatott humán vizsgálatokba bevont személyek minden esetben a magyar (kaukázusi) populációhoz tartoztak, viszont a magyarországi statisztikai adatok alapján roma származást feltételezhetünk az általunk vizsgált populáció mintegy 5%-ánál.

A vizsgált személyek - vagy kiskorúságuk esetén szüleik – írásos beleegyezésüket adták a kutatásokban való részvételhez. A vizsgálatokat a Magyar Etikai bizottság (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság, azaz ETT TUKEB) hagyta jóvá, és azok minden esetben megfeleltek a Helsink Deklarátumban megfogalmazott alapelveknek.

3.2 Genomiális DNS szeparálás

Humán molekuláris genetikai vizsgálataink során a genomiális DNS-t a perifériás vérből származó mononukleáris sejtekből *Qiagen DNA Blood Mini kit* (Qiagen GmbH,

Germany, Hilden), illetve *iPrep PureLink gDNA Blood Kit* (Invitrogen, US) segítségével izoláltuk a gyártók utasításainak megfelelően.

3.3 Genotipizálási módszerek

Az egyes technikák kiválasztásánál az adott kutatási időszakban rendelkezésre álló technikai lehetőségek és a költséghatékonyság jelentette a döntő szempontot. A 7. táblázatban az adott mérések során alkalmazott módszerek láthatók. A vizsgált polimorfizmusok jellemzőinek részletes bemutatására az eredmények részben kerül sor.

7. táblázat: A használt genotipizálási módszerek.

Alkalmazott módszer	Vizsgált SNP
PCR	<i>CCR5Δ32</i>
PCR-RFLP	<i>RANTES</i>
GenomeLab SNPstream rendszer	11q13 és 14q22 genomrégiók SNP-i
TaqMan	rs545659
Sequenom iPLEX Gold MassARRAY	<i>BIRC5</i> , <i>NFE2L2</i> és <i>KEAP1</i> SNP-k

A nagy-áteresztő-képességű (ún. high-throughput) technikák esetében a genotipizálást előzetes bioinformatikai szűrés előzte meg, melynek részleteit a módszerek fejezet végén, a 3.12 pontban írom le.

3.3.1 *RANTES* -403 G/A és *CCR5Δ32* polimorfizmusok genotipizálása

A *RANTES* -403 G/A polimorfizmusának meghatározásához PCR-RFLP módszert alkalmaztunk. Megfelelő restrikciós endonukleáz hasítóhely hiányában a PCR-t olyan mismatch primerrel végeztük, amely segítségével sikerült enzim hasítóhelyet bevinni. A hasítás során kapott termékeket hagyományos gélelektroforézis segítségével választottuk szét, amelyhez 1 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó, 3%-os töménységű agaróz gélt használtunk fel.

A *CCR5Δ32* esetében a 32 bázispárnyi deléciónak kimutatása hasítás nélkül, 2%-os töménységű agaróz gélelektroforézissel történt. A szétválasztott DNS-EtBr fragmentumokat mindkét esetben UV-fénnyel megvilágítva, KODAK DC290

géldokumentációs eszközzel detektáltuk. Az alkalmazott PCR-ek paramétereit a 8. táblázat tartalmazza.

Minden genotípust legalább kétszer határoztunk meg, és csak azokat a genotípus adatokat fogadtuk el ahol a két genotipizálás megegyező eredményt hozott.

8. táblázat: *CCR5Δ32* és *RANTES* -403G/A polimorfizmusok meghatározásához használt PCR illetve PCR-RFLP módszerek paramétereit.

	<i>CCR5Δ32</i>	<i>RANTES</i> -403 G/A
Szekvenca specifikus primerek	Forward: 5'-CTT CAT TAC ACC TGC AGC TCT CA-3'; Reverse: 5'-CAC AGC CCT GTG CCT CTT CTT CTC A-3'	Forward: 5' - CAC AAG AGG ACT CAT TCC AAC TCA-3' Reverse: 5'-GTT CCT GCT TAT TCA TTA CAG ATC GTA-3'
PCR elegy összetétele	20 ng/μl DNS templát, 200 μM dNTP, 0,5 μM primer, 0,5 U/μl Taq DNS polimeráz	20 ng/μl DNS templát, 200 μM dNTP, 0,5 μM primer, 0,5 U/μl Taq DNS polimeráz
Polimeráz láncreakció	I. denaturáció 94°C-on 4 perc	I. denaturáció 94°C-on 4 perc
	II. 35 ciklus 1. denaturáció 95°C-on 30 mp 2. primer bekötődés 65 °C-on 60 mp 3. lánchosszabbítás 72 °C-on 30 mp	II. 35 ciklus 1. denaturáció 95°C-on 30 mp 2. primer bekötődés 60 °C-on 60 mp 3. lánchosszabbítás 72 °C-on 30 mp
	III. végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 perc	III. végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 perc
Restrikciós endonukleáz	-	Rsa I (8U/ul)
Restrikciós fragmentumok	-	180 bp + 26 bp

3.3.2 Genotipizálás GenomeLab SNPstream rendszerrel

A 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-q22.3 genomterületeken kiválasztott 145 polimorfizmusból 144-et az intézetünkben korábban működő SNP Core Facility keretein belül, egy nagy áteresztő-képességű GenomeLab SNPstream® Genotyping System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) segítségével genotipizáltuk.

A GenomeLab SNPstream (Beckman Coulter) genotipizáló rendszer működésének alapja egy multiplex PCR-t követő egy bázispárnyi primer extenzió, fluoreszcensen jelölt nukleotidok felhasználásával. A mérés során az SNP-ket tartalmazó génszakaszokat polimeráz láncreakcióval amplifikáljuk, majd a terméket megtisztítjuk a feleslegben maradt nukleotidoktól, primerektől. A második PCR reakció egy ún. extenziós primer jelenlétében történik. Ez a primer pontosan a vizsgálni kívánt SNP előtti nukleotidig illeszkedik az első PCR-ben keletkezett termékhez. A reakció során fluoreszcens festékkel (TAMRA: 6-karboxi-tetrametil-rodamin ill. Bodipy-fluoreszcein) jelölt dideoxi-nukleotidok épülnek be a primer 3' végére a polimorf helyen levő allélnak megfelelően. Mivel egyszerre csak két festék alkalmazható, egy mérés során - vagyis egy 384 mintát tartalmazó plate-en - csak egyféle nukleotid csere és ennek komplementere vizsgálható. Egy mintán egyszerre 48 SNP lemérését végezzük, ehhez 48-plex PCR beállítása szükséges. Mivel az alkalmazott extenziós primerek 5' vége komplementer egy előre gyártott oligonukleotidokat tartalmazó 384 lyukú plate megfelelő helyével, a hibridizáció a plate előre meghatározott helyein történik meg. A hibridizációt követő lézeres leolvasás után a két festék aránya szolgál a genotípusok megállapításának alapjául.

A mérést a gyártó utasításai alapján, az alábbiak szerint végeztük:

PCR reakció, tisztítás, primer extenzió

A PCR reakciót 5 µl végtérfogatban végeztük, amiben 20 ng genomi DNS, 5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 90-90 µM a négyféle dNTP-ből (Invitrogen), 50-50 nM a két PCR primerből, 0,5 unit AmpliTaq Gold polimeráz (Applied Biosystems) és 1x koncentrációban PCR puffer II (Applied Biosystems) volt. A következő reakció körülményeket használtuk: kezdeti denaturáció 94 °C 1 min, majd 40 ciklus 94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec és 72 °C 1 min.

Ezt követően megtisztítottuk a kapott terméket a be nem épült deoxi-nukleotidoktól és primerektől 3 µl of SBE Cleanup Reagent (USB, Cleveland, OH, USA) hozzáadásával, ami exonukleáz I -et és garnéla alkalikus foszfatázt tartalmazott. A reakciót 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd inaktívtuk az enzimeket (96 °C 10 min).

Az egy bázispárnyi primer extenzió elvégzéséhez 7 µl extenziós reakcióelegyet adtunk minden mintához. Ez tartalmaz 3,76 µl SNPware extenziós puffert (Beckman Coulter), 0,2 µl SNPware extenziós mixet (ebben vannak a jelölt dideoxi-nukleotidok)

(SNPware Extension Mix, Beckman Coulter), 2,97 µl Ultrapure DNáz/RNáz mentes desztillált vizet (Invitrogen), 0,02 µl SNPware DNS polimerázt (Beckman Coulter) és az extenziós primereket (5-5 µM). A PCR körülmények: 96 °C 3 min, majd 46 ciklus 94 °C 20 sec, 40 °C 11 sec.

A felsorolt PCR reakciókat 384-es plate-eken (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a PKGD PTC 0220 DNA Engine Dyad (Bio-Rad) PCR készülékben végeztük.

Hibridizáció és plate leolvasás

Az extenziós primerek 5' végével komplementer oligonukleotidokat tartalmazó 384-lyukú ún. SNPware tag array plate-eket (Beckman Coulter) aktiváltuk 1x koncentrációban SNPware mosó puffer 1-gyel (Beckman Coulter) történő előmosással.

A primer extenzió után keletkezett termékhez 8µl hibridizációs mixet adtunk, amiben 7,56 µl hibridizációs oldat (SNPware Hybridization Solution, Beckman Coulter) és 0,44 µl SNPware Hybridization Additive, Beckman Coulter) volt. A PCR-termék és hibridizációs mix keverékéből 20 µl-t vittünk át az SNPware plate-re. Ezt lezárt kamrában 100%-os páratartalom mellett inkubáltuk 42 °C-on 2 óráig (±15 perc). A jelölt extenziós primerek ekkor hibridizálnak a plate-eken levő komplementer oligonukleotidokhoz. Ezután a nem kötődött primereket lemostuk 1x koncentrációban SNPware mosó puffer 2-vel (Beckman Coulter).

A munkafolyamatot Biomek FX Dual Arm system (Beckman Coulter) pipettázó robotokkal tudtuk teljesen automatizálni. Tíz random mintát mértünk három párhuzamos futtatásban a technikai hibák tesztelése érdekében.

A plate-eket GenomeLab SNPStream Imager (Beckman Coulter) készülékkel olvastuk le. A plate-ről készült képet a rendszer saját szoftverével értékeltük ki.

3.3.3 Rs545659 genotipizálása 5'nukleáz TaqMan allél-specifikus PCR módszerrel

A 11q13 genomrégióban található rs545659 egy pontos nukleotid polimorfizmus nem volt alkalmas a GenomeLab SNPstream rendszerrel történő genotipizálásra, ezért ennek genotípusát TaqMan 5' nukleáz allélspecifikus PCR módszerrel határoztuk meg (az assay katalógus száma: C_7512539_10). A TaqMan PCR reakcióhoz szükséges összes komponens az Applied Biosystems-től származott. A reakcióelegy kb. 10-50 ng

genomiális DNS mintát, 200 nM TaqMan próbát, 900 nM forward és reverse primer párt, 1x végkoncentrációban PCR „master mixet” tartalmazott. A reakciót 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies) készülékben végeztük. A műveletek során alkalmazott összes lépés a gyártó utasításainak megfelelően történt.

3.3.4 Genotipizálás Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technológiával

A *BIRC5*, *NFE2L2* és *KEAPI* gének szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok genotipizálása Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technológiával történt egy kanadai kutatóközpontban (McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Québec, Canada, <http://www.sequenom.com>).

Az egy bázispárnyi primer extenzió alapuló módszer nagyban hasonlít a GenomeLab SNPstream módszerhez, de az eltérő detektálási mód és a multiplex PCR magasabb hatékonysága miatt itt kevesebb technikai szempontot kell figyelembe venni a mérés tervezésekor. A genotípusok detektálása MALDI-TOF tömegspektrométerrel történik.

3.4 Mycoplasma pneumoniae specifikus IgG és IgA antitestek meghatározása

A *Mycoplasma pneumoniae* (MP) specifikus antitestek meghatározása szérumból történt Sero MP-IgA, IgG protein ELISA kitek (Savyon Diagnostic Ltd.) segítségével a gyártó utasításai szerint. A krónikus vagy visszatérő Mycoplasma-fertőzöttség vizsgálatához csak azokat a pácienseket tekintettük MP pozitívnak, akiknél az IgG pozitivitáshoz IgA pozitívítás is társult.

3.5 Laboratóriumi paraméterek meghatározása

A szérum teljes, valamint több mint 100 allergénre specifikus IgE szintjét *Pharmacia CAP System* műszerrel határoztuk meg. A teljes IgE szintet akkor tekintettük kórosnak, ha az alábbi, kor-specifikus referencia tartományokon kívül esett:

0-1 év: <15 kU/L; 1-5 év: < 60 kU/L; 5-10 év: < 90 kU/L; felnőttek: < 100 kU/L. Az allergén specifikus IgE-t 0,35 kU/L-t meghaladva vettük pozitívnak.

A vér eozinofil granulocita koncentrációkat Coulter MAXM Analyser műszerrel határoztuk meg. A relatív értékeket 1-6% közötti tartományban, az abszolút eozinofil sejt szám értékét 0,05 és 0,200 G/l között tekintettük normálisnak.

3.6 Köpetindukció

Az indukciót 10 perces időközönként, háromszor végeztük el és azt minden alkalommal légzésfunkció mérése követte.

A vizsgált személyek 400 µg salbutamol inhalációt követően a De Vilbiss Nebulizer (Ultra-Neb™ 2000 model 200HI) által porlasztott hipertóniás (4,5 %-os) nátrium klorid oldatot lélegeztek be 5 percen keresztül. Ezt követően a felköhögött köpetet (alsó légúti szekrétumot) steril tartályban gyűjtöttük, majd kiválogattuk a nagyobb plakkokat. A mintákat 0,1% dithiotreitol-tartalmú PBS-sel hígítottuk (Sigma, St Louis, MO, USA), megkevertük, és 30 percig rázóra helyeztük. Ezt követően a mintákat 40 µm nylonhálón (BD Biosciences, Falcon cell strainer) szűrtük át, és 1500 rpm-en centrifugáltuk 10 percen keresztül. A sejteket 1 ml PBS-ben vettük fel, majd a sejtuszpenzió egy részét azonos mennyiségű 0,4%-os tripánkék festékkel (Sigma) kevertük össze. A sejteket Bürker kamrában számoltuk meg. A maradék sejtuszpenziót tovább hígítottuk PBS-sel és citocentrifugával (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Németország) tárgylemezre centrifugáltuk. A preparátumokat Quick Panoptic (Cypress, Langdorp, Belgium) hematológiai festékkel festettük, és a sejtes összetételt fénymikroszkóp alatt határoztuk meg minimum 300 sejt azonosításával. A sejtösszetétel megállapítását követően a sejteket lízis pufferben vettük fel, és -80°C-on tároltuk.

3.7 Légzésfunkció, FENO mérés

Az FVC és FEV1 értékeket spirométerrel mértük (PDD-301/s, Piston Inc, Budapest, Hungary), a kilélegzett levegő nitrogén monoxid (FENO) szintjét NO szenzorral detektáltuk (NIOX MINO, Aerocrine, Solna, Sweden).

3. 8 Légszennyezettségi értékek megállapítása

A légszennyezettség markereként az ilyen jellegű kutatásokban leggyakrabban alkalmazott légköri NO₂ koncentráció adatokat használtuk fel. A vizsgálatba olyan személyeket vontunk be, akiknél az asztma kialakulása (a kezelésre történő jelentkezés) 2003 és 2006 közötti intervallumban történt. Ezen periódust megelőző évek részletes légszennyezettségi adatait az Országos Légszennyezettségi Mérőhálózat munkatársai közreműködésével gyűjtöttük be és elemeztük. A vizsgálatban olyan személyek szerepeltek, akik lakóhelyének közelében volt NO₂ koncentrációt is detektáló automata mérőállomás. Elemzéseink során a NO₂ koncentrációt diszkrétizáltuk, és a 32 µg/m³ alatti átlagértéket mutató területeket alacsony légszennyezettségűnek, az e feletti átlagértékkel rendelkező területeket magas légszennyezettségűnek tekintettük. A 32 µg/m³-es határt a vizsgált geográfiai területeken mért átlagolt NO₂ koncentrációk mediánjánál húztuk meg.

3. 9 Egér allergizálás

A munkacsoportunkban korábban előállítottunk egy ovalbumin-indukált egér-asztma modellt, ahol microarray génexpresszió analízis segítségével hasonlítottuk össze a kontroll és allergizált állatok tüdőszövetére jellemző génexpressziós profilt. A munka egy korábbi, nyilvánosan elérhető doktori dolgozatban részletes leírásra került (http://phd.sote.hu/mwp/phd_live/vedes/export/tolgyesigergely.d.pdf), így itt csak az idetartozó méréseket és eredményeket mutatom be.

3. 10 RNS szeparálás, koncentrációmérés és minőség-ellenőrzés

Az RNS izolálása az indukált köpet mintákból RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) szeparáló oszlopok felhasználásával történt, a gyártó utasításai szerint. A kinyert RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) mértük meg, minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) készülék segítségével határoztuk meg. A továbbiakban csak azokat a mintákat használtuk fel a különböző microarray valamint valós idejű PCR

mérésekhez, melyek RNS integritás száma meghaladta a 8,0-as értéket, tiszta gélszerű képet mutattak, nem tartalmaztak DNS kontaminációt, valamint a NanoDrop készüléken mért 260/280 és a 260/230 arányuk nagyobb volt, mint 1,8.

3. 11 Reverz transzkripció és mRNA expresszió mérés TaqMan valósídejű PCR módszerrel

Az indukált köpet minták esetében a cDNS átírást a High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük. A valósídejű PCR reakciókat ABI 7900HT Fast Real-Time PCR készüléken végeztük a gyártó utasításai szerint (Applied Biosystems) 1,5 µl cDNS/lyuk felhasználásával 25 µl-es végtérfogatban. Háztartási kontrollként a *β-actin* génjét használtuk. A háztartási génhez normalizált szignálértékeket az összehasonlító Ct (delta Ct) módszer felhasználásával határoztuk meg.

3. 12 Asszociációs vizsgálatokat megelőző bioinformatikai szűrés

A jelölt régió asszociációs vizsgálatokban célunk az irodalmi adatok alapján kiválasztott régiók (11q13 és 14q22) egy pontos nukleotid polimorfizmusokkal történő teljes lefedése volt a kapcsoltsági adatok figyelembe vétele mellett. A tanulmányozott régiókat az NCBI Genome Build 36.3 alapján a 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-q22.3 genomterületek jelentették.

A vizsgálni kívánt régiók már leírt polimorfizmusait letöltöttük a HapMap adatbázisból (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) és innen kiválasztottuk a gyakoribb SNP-eket. A minor allél frekvencia (MAF) legalsó határát 5%-nál (0,05) határoztuk meg. Ennek oka az, hogy a rendelkezésünkre álló betegpopulációban ilyen gyakoriságminimummal várhatóan lesz annyi ritka homozigóta és heterozigóta egyén, amennyivel a statisztikai elemzést még el lehet végezni.

Ezután a vizsgált kromoszóma szakasz kapcsoltsági adatait, haplotípus blokkjait a HapMap adatbázisa alapján dolgozó Haploview 4.1 program (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) segítségével határoztuk meg. A haplotípus blokkok megállapítására azért volt szükség, mert a genomot jellemző kapcsoltsági

viszonyok felhasználásával néhány, jól megválasztott SNP genotipizálása elegendő lehet nagyobb genomterületek feltérképezéséhez. Kapcsoltsági paraméterekként a következő értékeket vettük figyelembe: $r^2 \geq 0,08$, $D' = 1$.

Az alkalmazott módszer multiplex jellegéből adódóan az SNP-k kiválasztásánál az elméleti megfontolásokon túl számos technikai szempontot is figyelembe kellett vennünk. Egyrészt figyelni kellett arra, hogy az amplifikálni kívánt DNS szakaszok GC aránya minden mérendő SNP esetén 40 és 65% közé essen. A szekvenciákon belüli ismétlődések esetleges előfordulását a RepeatMasker on-line programmal ellenőriztük (<http://www.repeatmasker.org/>), a genomban fellelhető, nagyfokú hasonlóságot mutató szekvenciák létét pedig az NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) programjával zártuk ki. A primerek (két PCR primer és egy extenziós primer) tervezéséhez az Autoprimer szoftvert (<http://www.autoprimer.com>) (Beckman Coulter) használtuk a gyártó utasításai szerint. A technikai szűréseken átesett SNP-eket leírt vagy feltételezett funkcionális sorrendjük alapján rangsoroltuk és választottuk ki az adott haplotípus blokkot reprezentáló SNP-eket. A sorrend a következő: nem-szinoním (azaz aminosavcsere okozó) SNP, promóter vagy 3' UTR régióban levő SNP, szinoním (azaz aminosavcsere nem okozó) és intronban levő SNP. A fent leírt módon a 11q12.2-q13.1 régióban 68, a 14q22.1-q22.3 régióban 77, együttesen 145 SNP került kiválasztásra és genotipizálásra.

3. 13 Asszociációs vizsgálatok során alkalmazott statisztikai módszerek

Az allélfrekvenciát allélszámolással határoztuk meg. A Hardy-Weinberg egyenlőség (HWE) meglétét az on-line elérhető <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> szoftverrel számoltuk ki, a HWE-től való szignifikáns eltérést $p < 0,01$ érték esetén állapítottunk meg.

A kategorikus változók (genotípusok, haplotípusok, diszkrétizált szérum IgE érték) és az asztma, illetve annak endofenotípusai közötti asszociációt logisztikus regressziós analízissel vizsgáltuk, 95%-os konfidencia intervallum (CI 95%) alkalmazásával. Az elemzéseket minden esetben korrigáltuk nemre és korra. A haplotípusra vonatkozó odds ratio (OR) értéket feltételes logisztikus regressziós modellel határoztuk meg. A

haplotípusokat és ezek frekvenciáját a Haploview 4.1 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) programmal becsültük meg.

A szérum, és köpet eozinofil szintek, valamint az IgE értékek - mint folytonos változók - esetében a fenotípusok genetikai hátterének meghatározásához lineáris regressziós modellt használtunk.

A normalizált génexpresszió szinteket Mann-Whitney U teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével hasonlítottuk össze. A kontingencia táblákat Fisher exact teszttel elemeztük. A korrelációk mérésére a Spearman-féle rangkorrelációt alkalmaztuk.

Többszörös hipotézis tesztelés esetén a p értékeket a Bonferroni-korrekciónak megfelelően korrigáltuk az összehasonlítások számával. Az így alkalmazott p értékeket az adott vizsgálat eredményeinek bemutatásánál tüntettem fel.

Az elemzéseket SPSS 17.0 (Armonk, NY, USA) illetve MedCalc 10.0.2 (MedCalc Software) szoftverekkel végeztük.

A bayesi statisztikai számításokat a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén, dr. Antal Péter kutatócsoportja végezte a két csoport által közösen kidolgozott BN-BMLA (Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance) módszerrel [129, 130].

4 Eredmények

4.1 *Mycoplasma pneumoniae* fertőzés, *RANTES -403G/A* és *CCR5Δ32* polimorfizmusok hatása az asztma kialakulására

A *Mycoplasma p.* (MP) ellenes IgG antitest szérumbeli jelenléte arra utal, hogy az illető a múltban átesett egy *Mycoplasma p.* fertőzésen, míg IgA jelenléte mind akut, mind krónikus fertőzöttségre utalhat. Amennyiben az IgG pozitívítás IgA pozitívítással egyszerre fordul elő, az krónikus, vagy ismétlődő fertőzöttség meglétét bizonyítja.

Vizsgálataink során 254 asztmás és 260 egészséges gyermekben hasonlítottuk össze a *Mycoplasma p.* fertőzöttséget. Az asztmás gyermekek között szignifikánsan nagyobb arányban találtunk *Mycoplasma p.* pozitívítást, mint a kontroll populációban (31,1% vs. 18,1 %, $p = 0,0009$).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a *RANTES -403G/A* polimorfizmusa, illetőleg a *CCR5Δ32*-es variációja befolyásolja-e az asztmára való hajlamot. A két csoport nem mutatott szignifikáns különbséget egyik vizsgált genetikai variáció tekintetében sem. A két polimorfizmus genotípus- és alléloszlását a két csoport között a 9. táblázat mutatja be.

9. táblázat: A *RANTES -403G/A* és *CCR5Δ32* polimorfizmusok allél- és genotípus eloszlása a kontroll és asztmás populációban.

	Polimorfizmus			
	<i>RANTES -403G/A</i>		<i>CCR5Δ32</i>	
	Kontroll	Asztma	Kontroll	Asztma
Genotípus n 11 (%)¹	199 (76,5)	188 (74)	203 (78,1)	207 (81,5)
Genotípus n 12 (%)¹	56 (21,5)	59 (23,2)	54 (20,8)	42 (16,5)
Genotípus n 22 (%)¹	5 (1,9)	7 (2,8)	3 (1,2)	5 (2,0)
MAF	0,13	0,14	0,12	0,10
p-érték²	0,7		0,7	

¹ 11: gyakori allélra homozigóta, 12: heterozigóta; 22: ritka allélra homozigóta

² A 2 csoport allélfrekvenciája közti eltérés p-értéke

Rövidítések: MAF: minor allél frekvencia.

A *Mycoplasma p.* fertőzöttség és a két genetikai variáns közötti kapcsolat elemzése során azt találtuk, hogy a *CCR5Δ32* allélja szignifikánsan gyakrabban fordult elő a MP szeropozitív gyermekekben a MP szeronegatív gyermekekhez képest (18% vs. 8,6%, $p = 0,006$). Hasonló eredményt kaptunk mikor a *CCR5Δ32* allélját homozigóta formában hordozó gyermekek arányát hasonlítottuk össze a MP szeropozitív és MP szeronegatív csoportok között (2,4% vs. 1,3%).

A *RANTES -403A* allélja és a *Mycoplasma p.* fertőzöttség között nem találtunk összefüggést.

Ezt követően többszörös logisztikus regresszióval teszteltük, hogy a MP fertőzöttség, a vizsgált polimorfizmusok vagy ezek interakciója asszociál-e az asztmára/atópiára való hajlammal, vagy az asztma súlyossági fokával. Eredményeinket a 10. táblázat foglalja össze.

10. táblázat: A MP infekció, a *RANTES -403A*, a *CCR5Δ32* és ezek interakcióinak asztma/atópia kockázatra és asztma súlyosságra gyakorolt hatását vizsgáló elemzés eredményei.

	Asztma		Atópia		Asztma súlyossága	
	p-érték	OR (95% CI)	p-érték	OR (95% CI)	p-érték	OR (95% CI)
MP infekció	0,001	2,0 (1,3-3,1)	0,01	1,7 (1,1-2,6)	0,6	0,7 (0,3-1,9)
RANTES -403A	0,6	1,1 (0,7-1,7)	0,08	1,4 (0,9-2,2)	0,8	1,1 (0,4-3,0)
CCR5Δ32	0,4	0,8 (0,5-1,3)	0,7	0,9 (0,6-1,4)	0,2	0,3 (0,03-2,2)
RANTES -403A + MP infekció	0,07	2,2 (0,9-5,3)	0,2	1,6 (0,8-3,5)	0,8	0,8 (0,2-3,3)
CCR5Δ32 + MP infekció	0,003	0,4 (0,2-0,7)	0,5	0,8 (0,4-1,5)	1	NA

Rövidítések: NA: nincs adat, a túl alacsony mintaszám miatt
95% CI: 95%-os konfidencia intervallum, OR: odds ratio

Elemzésünk során azt találtuk, hogy a MP fertőzöttség szignifikáns asszociációt mutat az asztmára (OR = 2,0, 95% CI = 1,3-3,1, $p = 0,001$), illetőleg az atópiára (OR = 1,7, 95% CI = 1,1-2,6, $p = 0,01$) való megnövekedett hajlammal. Azonban, mikor a MP fertőzöttség és az atópia közti asszociációt nem az összes atópiás betegnek vizsgáltunk,

hanem külön-külön az asztmás és kontroll populáció atópiás csoportjain, az előbb tapasztalt szignifikáns asszociáció eltűnt. Mivel ezek az eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy az atópiás státusz befolyásolja a MP fertőzés asztma kockázatra gyakorolt hatását, a nem és kor mellett az atópiás státuszt is bevontuk kofaktorként az elemzésbe. Eredményeink ebben az esetben is szignifikánsak maradtak: a MP infekció asztmára hajlamosító hatása: OR = 1,8, 95% CI = 1,2-3,0, p = 0,005.

Amikor azt vizsgáltuk, hogy a *Mycoplasma p.* fertőzés és a polimorfizmusok ritka genotípusainak interakciója befolyásolja-e az asztmára való hajlamot, azt találtuk, hogy a MP szeropozitivitás és a *CCR5Δ32* ritka alléljának együttes előfordulása véd az asztmával szemben (OR = 0,4, 95% CI = 0,2-0,7, p = 0,003). Ez az eredmény abban is megmutatkozik, hogy szignifikánsan kevesebb MP fertőzött asztmás, mint MP fertőzött kontroll személy hordozza a *CCR5Δ32* ritka allélját (3,9% MP(+) asztmás vs. 12,7% MP (+) kontroll). Az MP szeropozitivitás és a *RANTES* -403A alléljának együttes előfordulása esetén nem találtunk hasonló asszociációt.

4.2 NFE2L2 és KEAP1 gének polimorfizmusai és a légköri nitrogén-dioxid szennyezés hatása az asztma kialakulására

Az *NFE2L2* és *KEAP1* gének polimorfizmusainak gyermekkori asztma kialakulásában betöltött szerepét a vizsgált személyek lakóhelyére jellemző légszennyezettségi adatok függvényében vizsgáltuk meg. Mivel az *NFE2L2* és *KEAP1* gének kontroll és asztmás csoport közötti genotípus megoszlásáról ezidáig nem született adat, először megvizsgáltuk, hogy a gének szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok mutatnak-e asszociációt az asztmára, vagy annak endofenotípusaira való hajlammal. A vizsgált SNP-k jellemzőit a 11. táblázatban mutatom be.

11. táblázat: Az *KEAPI* és *NFE2L2* gének polimorfizmusainak jellemzői és allélfrekvenciái a vizsgált populáción.

SNP	Pozíció ^a	Allélek (1/2) ^b	Génhez viszonyított elhelyezkedés	MAF a kontroll csoportban	MAF a beteg csoportban	p-érték ^c	HWE ^d
	<i>Chr:19</i>						
rs11085735	10602180	C/A	Intron	0,07	0,06	0,50	0,94
rs8113472	10608064	C/A	Intron	0,07	0,08	0,37	0,55
rs11668429	10616303	T/G	Promoter	0,34	0,33	0,68	0,24
rs7246953	10621108	G/A	Promoter	0,19	0,18	0,68	0,03
	<i>Chr:2</i>						
rs2588882	178087165	T/G	3' régió	0,08	0,11	0,06	0,28
rs2706110	178092162	C/T	3' régió	0,15	0,18	0,23	0,53
rs10183914	178097666	C/T	Intron	0,29	0,28	0,79	0,12
rs1806649	178118152	C/T	Intron	0,22	0,20	0,50	0,88
rs6721961	178130037	G/T	Promoter (-617)	0,13	0,14	0,70	0,45
rs6706649	178130071	C/T	Promoter (-651)	0,12	0,11	0,71	0,52
rs35652124	178130073	T/C	Promoter(-653)	0,34	0,36	0,35	0,58
rs2364725	178132988	T/G	Promoter	0,45	0,43	0,49	0,97

^a : Genomiális pozíció az NCBI Genome Build 37.1 alapján.

^b : Allélek a forward szálon (1: gyakori, 2: ritka allél).

^c : A beteg és kontroll csoportok allélfrekvenciája közötti eltérés p értéke.

^d : eltérés a Hardy-Weinberg egyenlőségtől a kontroll populációban.

Rövidítések: MAF: minor allél frekvencia, Chr: kromoszóma

4.2.1 SNP asszociációs elemzések

A genotípus csoportok megoszlása mindenhol Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. Az elemzéseinket az additív (11 genotípus vs. 12 genotípus vs. 22 genotípus), domináns (11 vs. 12/22), illetve recesszív (11/12 vs. 22) modelleket alkalmazva is elvégeztük. A többszörös összehasonlítás miatt a p értéket az SNP-k számával (12) és az alkalmazott modellek számával (3) is korrigáltuk, így a $p < 0,0033$ értékeket tekintettük szignifikánsnak. Az asszociációs elemzések eredményei a 12. táblázatban láthatóak.

Az asztma - kontroll összehasonlításban egyetlen SNP sem érte el a Bonferroni-korrigált szignifikancia határt, bár az *NFE2L2* 3' régiójában elhelyezkedő rs2588882 nominálisan szignifikánsnak bizonyult ($p = 0,05$).

A legerősebb asszociációt az infekció-indukált asztma (IIA) fenotípus és az rs2588882 között találtuk, mely SNP ritka allélja (G) szignifikánsan ritkábban fordult elő az IIA csoportban a nem IIA csoporthoz képest (9% vs. 26%, OR = 0,28, 95% CI = 0,13-0,60, $p = 0,0005$). A ritka allélt hordozó genotípusok (12 és 22) mind a domináns (OR = 0,28 95% CI = 0,12-0,62, $p = 0,002$), mind az additív modellt (OR = 0,29, 95% CI = 0,13-0,62, $p = 0,002$) alkalmazva ritkábbnak bizonyultak az IIA csoportban, ami a G allél (mintsem a G allélt hordozó genotípusok) infekció-indukált asztma fenotípus elleni védő hatására utal.

A -617G/T promóter SNP (rs6721961) kismértékű asszociációt mutatott az IIA-val, de ennek szignifikancia szintje ($p = 0,007$) nem érte el a Bonferroni-korrigált határt. Az atópiás asztma fenotípus is csak gyenge asszociációt mutatott az rs6721961 ($p = 0,035$) és rs7246953 ($p = 0,016$) SNP-k ritka genotípusaival.

A *KEAPI* gén SNP-i esetében nem találtunk szignifikáns különbséget az allélgyakoriságokban és a genotípusok megoszlásában a vizsgált csoportok között.

Az *NFE2L2* gén polimorfizmusai által alkotott haplotípusok frekvenciái közötti különbségek a vizsgált csoportok között – bár némely esetben szignifikánsnak bizonyultak -, nem mutattak erősebb asszociációt az asztmára, illetve endofenotípusaira való hajlammal, mint amit a genotípus-elemzések során tapasztaltunk.

12. táblázat: Az *NFE2L2* és *KEAP1* gének polimorfizmusai és az asztma endofenotípusok közötti asszociációs vizsgálatok eredményei.

SNP	Gén	Modell	Asztma		Atópiás asztma		Infekciós asztma	
			p-érték	OR (95% CI)	p-érték	OR (95% CI)	p-érték	OR (95% CI)
rs2588882	NFE2L2	Domináns	0,11	1,45 (0,91-2,31)	0,71	0,89 (0,49-1,61)	0,002*	0,28 (0,12-0,62)
		Recesszív	0,06	7,43 (0,85-64,57)	0,58	0,65 (0,14- 3,03)	0,99	NA
		Additív	0,05	1,53 (1,00-2,33)	0,62	0,88 (0,53- 1,46)	0,002*	0,29 (0,13-0,62)
rs2706110	NFE2L2	Domináns	0,27	1,24 (0,83-1,85)	0,63	1,13 (0,67- 1,92)	0,16	0,66 (0,37-1,18)
		Recesszív	0,06	2,72 (0,94-7,86)	0,34	1,78 (0,53- 5,89)	0,07	0,15 (0,02-1,21)
		Additív	0,11	1,31 (0,93-1,83)	0,45	1,17 (0,76- 1,80)	0,06	0,63 (0,38-1,02)
rs10183914	NFE2L2	Domináns	0,73	1,06 (0,73- 1,53)	0,46	1,19 (0,73- 1,94)	0,14	1,47 (0,87-2,47)
		Recesszív	0,94	1,02 (0,49- 2,10)	0,18	2,17 (0,68-6,94)	0,01	3,49 (1,32-9,12)
		Additív	0,76	1,04 (0,77-1,40)	0,25	1,26 (0,84-1,89)	0,02	1,61 (1,06-2,45)
rs1806649	NFE2L2	Domináns	0,98	0,99 (0,68- 1,44)	0,64	1,12 (0,68-1,85)	0,48	1,20 (0,71-2,02)
		Recesszív	0,68	0,83 (0,35- 1,98)	0,95	1,04 (0,29-3,67)	0,22	2,10 (0,63-6,97)
		Additív	0,86	0,97 (0,71-1,33)	0,67	1,09 (0,71-1,68)	0,30	1,25 (0,81-1,95)
rs6721961	NFE2L2	Domináns	0,68	1,09 (0,72-1,64)	0,17	0,68 (0,40-1,18)	0,01	0,43 (0,23-0,83)
		Recesszív	0,92	1,06 (0,31- 3,62)	0,04	0,09 (0,01-0,84)	0,99	NA
		Additív	0,69	1,07 (0,74- 1,54)	0,05	0,62 (0,38-1,00)	0,007	0,44 (0,28-0,80)
rs6706649	NFE2L2	Domináns	0,58	0,88 (0,57-1,36)	0,93	1,02 (0,57-1,81)	0,63	1,15 (0,63-2,07)
		Recesszív	0,20	0,28(0,04- 1,98)	0,74	1,63 (0,08-31,14)	0,99	NA
		Additív	0,42	0,84 (0,56-1,27)	0,88	1,04 (0,60-1,79)	0,83	1,06 (0,60-1,86)
rs35652124	NFE2L2	Domináns	0,55	1,11 (0,77- 1,61)	0,89	0,96 (0,59-1,58)	0,38	1,26 (0,74-2,15)
		Recesszív	0,73	0,91 (0,52- 1,56)	0,25	1,54 (0,73-3,25)	0,25	0,61 (0,26-1,42)
		Additív	0,79	1,03 (0,79- 1,35)	0,62	1,09 (0,76-1,56)	0,94	1,01 (0,69-1,48)
rs2364725	NFE2L2	Domináns	0,78	1,05 (0,71-1,56)	0,48	0,82 (0,49-1,39)	0,72	0,90 (0,52-1,55)
		Recesszív	0,71	0,91 (0,58- 1,44)	0,58	0,84 (0,44-1,57)	0,19	0,61 (0,29-1,27)
		Additív	0,97	0,99 (0,77- 1,28)	0,43	0,87 (0,61-1,23)	0,33	0,83 (0,57-1,21)

rs11085735	KEAP1	Domináns	0,28	0,75 (0,44-1,27)	0,80	1,09 (0,52-2,31)	0,29	1,48 (0,70-3,10)
		Recesszív	0,54	0,47 (0,04-5,33)	0,99	NA	0,99	NA
		Additív	0,26	0,75 (0,45- 1,23)	0,75	1,12 (0,54-2,32)	0,18	1,60 (0,79-3,25)
rs8113472	KEAP1	Domináns	0,91	1,02 (0,61-1,72)	0,44	1,30 (0,66-2,56)	0,49	0,77 (0,37-1,60)
		Recesszív	0,28	5,70 (0,23-137,4)	0,39	0,33 (0,02-4,20)	0,93	1,10 (0,09-13,48)
		Additív	0,75	1,08 (0,66- 1,77)	0,62	1,16 (0,63-2,14)	0,54	0,81 (0,42-1,58)
rs11668429	KEAP1	Domináns	0,98	0,96 (0,68-1,43)	0,99	1,00 (0,61-1,63)	0,22	1,38 (0,81-2,33)
		Recesszív	0,82	0,93 (0,51-1,69)	0,73	0,87 (0,40-1,90)	0,72	0,85 (0,36-2,01)
		Additív	0,90	0,98 (0,74- 1,29)	0,87	0,97 (0,67-1,40)	0,45	1,15 (0,78-1,706)
rs7246953	KEAP1	Domináns	0,89	0,97 (0,67-1,42)	0,80	1,06 (0,64-1,77)	0,05	1,68 (0,99-2,85)
		Recesszív	0,97	1,02 (0,28-3,64)	0,02	0,07 (0,01-0,61)	0,50	1,65 (0,37-7,27)
		Additív	0,91	0,98 (0,69-1,38)	0,51	0,86 (0,54-1,34)	0,05	1,56 (0,99- 2,48)

A logisztikus regresszió elemzést additív (11 vs. 12 vs. 22 genotípusok), recesszív (11/12 vs. 22) és domináns (11 vs. 12/22) modelleken hajtottuk végre, a vad genotípust az 11 jelöli.

* : Bonferroni korrekció utáni szignifikáns p-értékek

Rövidítések: NA: nincs adat, a 22 genotípus hiányából adódóan, 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum, OR: odds ratio

4.2.2 Gén-környezet interakciók vizsgálata

A vizsgált személyek lakóhelyére jellemző átlagos NO₂ koncentráció értékeket megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a relatíve magas légszennyezettsgű területről szignifikánsan több kontroll (83%) és szignifikánsan kevesebb asztmás (38%) személy került ki, mint az alacsony NO₂ koncentrációval jellemezhető régiókból. Mivel a vizsgált (beteg és kontroll) személyek nem egyenletesen oszlanak meg a magas illetve alacsony légszennyezettsgű területek között, a továbbiakban az asztmás csoporton belül elemeztük a genotípusok és NO₂ koncentráció közötti összefüggéseket.

A gén-környezet interakciós vizsgálatok ún. “case-only”, vagyis csak betegcsoportot felhasználó elemzési módjának széles szakirodalma van. Számításainkat Botto és Khoury munkája nyomán végeztük [131]. A “case-only” megközelítési mód alkalmazhatóságának egyetlen kritériuma, hogy a környezeti és genetikai faktorok egymástól függetlenül legyenek jelen a kontroll populációban [132]. Az általunk elemzett kontroll populációban nem találtunk kapcsolatot a vizsgált markerek között ($p > 0,54$). Az asztmás csoporton belül kettő SNP esetében találtunk különbséget az eltérő légszennyezettsgű területről származó minták genotípus eloszlása között. Szignifikáns eredményeinket a 13. táblázatban tüntettem fel.

Eredményeink azt mutatják, hogy az rs2588882 és rs6721961 SNP-k ritka alléljai, pontosabban a ritka allélt hordozó 12 (heterozigóta) és 22 (ritka homozigóta) genotípusok egybevéve szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő azokban a gyermekekben, akik lakóhelye kisebb légszennyezettsgű régióban helyezkedik el (a ritka homozigóta genotípusú egyénekről mintabeli alulreprezentáltságuk következtében nem tudunk megbízható statisztikát készíteni). Az alacsony vs. magas légszennyezettsgű területeken a heterozigóta és ritka homozigóta genotípusok összevont frekvenciája az rs2588882 esetében 25,8% vs. 13,9%, (OR = 0,43, 95% CI = 0,23-0,82, $p = 0,01$); az rs6721961 esetében 30,5% vs. 20,0%, (OR = 0,51, 95% CI = 0,29-0,90, $p = 0,02$). Az atópiás és infekciós-asztmás alcsoportot vizsgálva nem találtunk hasonló összefüggést.

Az egymarkeres SNP vizsgálat eredményeihez hasonlóan, az *NFE2L2* gén 8 vizsgált SNP-je által létrehozott haplotípusok gyakoriságát megvizsgálva is azt találtuk, hogy az rs2588882 és rs6721961 ritka allélját is hordozó haplotípus (GTCCCTCTG)

szignifikánsan gyakoribb az alacsony légszennyezettségű területeken (5,6% a magas, 12,3% az alacsony légszennyezettség esetén, OR (95% CI) = 0,42 (0,30-0,59), $p = 0,007$). Mivel ezen haplotípus frekvenciái közötti eltérés enyhén szignifikánsabb, mint az egyedi SNP-k genotípus frekvenciái közti eltérések, feltételezhetjük, hogy az említett polimorfizmusok ritka alléljai szinergista módon vesznek részt az allélt hordozó egyének légszennyezettségre adott eltérő válaszkészségében.

13. táblázat: Genotípusok és légszennyezettség interakciója az asztmás betegcsoportban.

rs2588882	NO₂ magas (n)	NO₂ alacsony (n)	ORi (95% CI)	p-érték
TT	99 (86,1%)	141 (74,2%)	1	-
TG	13 (11,3%)	45 (23,7%)	0,38 (0,19-0,76)	0,006
GG	3 (2,6%)	4 (2,1%)	1,20 (0,26-5,58)	0,82
GG+TG	16 (13,9%)	49 (25,8%)	0,43 (0,23-0,82)	0,01
rs6721961	NO₂ magas (n)	NO₂ alacsony (n)	ORi (95% CI)	p-érték
GG	92 (80%)	132 (69,5%)	1	-
GT	21 (18,3%)	54 (28,4%)	0,51 (0,29-0,91)	0,02
TT	2 (1,7%)	4 (2,1%)	0,75 (0,13-4,23)	0,74
TT+GT	23 (20%)	58 (30,5%)	0,51 (0,29-0,90)	0,02

NO₂ magas: NO₂ koncentráció $\geq 32 \mu\text{g}/\text{m}^3$, NO₂ alacsony: NO₂ koncentráció $\leq 32 \mu\text{g}/\text{m}^3$

Rövidítések: ORi: interakciós odds ratio, a genotípusok és a légszennyezettség együttes hatásának elemzésére, 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum, n: esetszám

4.3 11q13 és 14q22 kromoszómarégiók parciális genomszűrése

A 145 genotipizált SNP közül 5 monomorfnak bizonyult (MAF = 0), 5 eltérést mutatott a HWE-től a kontroll populációban, 28 SNP esetében pedig a genotipizálás alacsony sikerességi rátája nem tette lehetővé a további elemzéseket. Ennek következtében összesen 102 SNP (53 a 11q12.2-q13.1 és 59 a 14q22.1-22.3 genomterületeken) eloszlását elemeztük, frekventista és BN-BMLA (Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance) statisztikai módszerrel. A BN-BMLA módszert a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem munkatársa, Dr. Antal Péter és kollégái segítségével alkalmaztuk az adatainkra. Az ily módon kapott eredményeinket a mérési eljárások részletes statisztikai háttérének tárgyalása nélkül mutatom be. Az SNP-k általános jellemzése a 14. táblázatban található meg.

14. táblázat: A parciális genomszűrés során vizsgált SNP-k jellemzői.

SNP	Allélek (1/2) ^a	Pozíció ^b	Gén	Génhez viszonyított elhelyezkedés/ aminosav csere	Kizárt SNP-k ^c
		<i>Chr: 14</i>			
rs3751464	C/T	52117892	<i>FRMD6</i>	promoter	
rs735265	C/T	52120264	<i>FRMD6</i>	intron	*
rs17666653	C/T	52122477	<i>FRMD6</i>	intron	
rs17666689	C/T	52122619	<i>FRMD6</i>	intron	
rs941703	C/T	52124421	<i>FRMD6</i>	intron	*
rs9671722	G/A	52127059	<i>FRMD6</i>	intron	
rs10141001	G/A	52132201	<i>FRMD6</i>	intron	
rs2277495	C/T	52186966	<i>FRMD6</i>	T398T	
rs2277494	T/C	52186972	<i>FRMD6</i>	P400P	
rs7150275	A/G	52195290	<i>FRMD6</i>	3' UTR	
rs7149810	A/G	52195320	<i>FRMD6</i>	3' UTR	
rs12895034	T/C	52344768	<i>GNG2</i>	intron	
rs1953861	G/A	52345317	<i>GNG2</i>	intron	
rs12889199	A/G	52346962	<i>GNG2</i>	intron	
rs3825596	C/T	52434883	<i>GNG2</i>	3' UTR	
rs1051069	C/T	52478315	<i>NID2</i>	A1169A	

rs946615	G/A	52481917	<i>NID2</i>	R1035R	
rs2273431	T/C	52496407	<i>NID2</i>	E753E	
rs3742536	C/T	52507429	<i>NID2</i>	S656P	
rs3818186	T/C	52509501	<i>NID2</i>	E526E	
rs1874569	G/A	52519555	<i>NID2</i>	intron	
rs2101919	A/G	52520368	<i>NID2</i>	G453D	
rs984050	T/C	52535415	<i>NID2</i>	intron	*
rs2357311	T/C	52536159	<i>NID2</i>	Promoter	*
rs1497082	G/A	52536512	<i>NID2</i>	Promoter	
rs4901200	A/G	52584357	-	-	
rs803012	T/C	52732723	<i>PTGDR</i>	promoter	
rs11157906	A/G	52733030	<i>PTGDR</i>	promoter	*
rs708486	T/C	52740971	<i>PTGDR</i>	intron	
rs17125273	G/A	52741646	<i>PTGDR</i>	R348R	
rs17831675	G/A	52742151	<i>PTGDR</i>	3' UTR	
rs17831682	T/C	52742180	<i>PTGDR</i>	3' UTR	
rs1254602	A/G	52779333	<i>PTGER2</i>	promoter	**
rs1254601	T/C	52779545	<i>PTGER2</i>	promoter	
rs1254600	C/T	52780453	<i>PTGER2</i>	promoter	
rs1254595	A/G	52787934	<i>PTGER2</i>	intron	
rs12587410	C/T	52790535	<i>PTGER2</i>	intron	
rs708498	G/A	52792500	<i>PTGER2</i>	intron	
rs708502	G/A	52794234	<i>PTGER2</i>	3' UTR	
rs17197	T/C	52794381	<i>PTGER2</i>	3' UTR	
rs1565970	A/G	52898076	<i>TXNDC16</i>	3' UTR	
rs762063	A/G	53098902	<i>GPR137C</i>	I247V	
rs8013756	G/A	53107682	<i>ERO1L</i>	3' régió	
rs4898762	C/T	53110384	<i>ERO1L</i>	intron	
rs8004624	G/A	53197711	<i>STYX</i>	intron	
rs6572868	T/C	53325090	<i>FERMT2</i>	3' UTR	
rs17694496	T/C	53331679	<i>FERMT2</i>	intron	
rs2357947	A/G	53345378	<i>FERMT2</i>	Y294Y	
rs17126074	T/C	53510734	<i>DDHD1</i>	3' régió	
rs7145029	C/T	53516409	<i>DDHD1</i>	intron	
rs17563	C/T	54417522	<i>BMP4,LOC100286880</i>	A151V	*
rs1957844	T/C	54458078	-	-	
rs2235961	A/G	54863577	<i>CDKN3</i>	promoter	*
rs1803843	T/C	54884593	<i>CDKN3</i>	S156F	**
rs10151361	C/T	54895766	<i>CNIH</i>	intron	*

rs17127595	G/A	54945681	<i>GMFB</i>	intron	
rs17127622	G/A	54996630	<i>CGRRF1</i>	intron	
rs3742558	C/T	55034879	<i>LOC645602,SAMD4A</i>	intron	*
rs1307289	A/G	55042615	<i>SAMD4A</i>	intron	
rs11431	T/C	55255673	<i>SAMD4A</i>	3' UTR	
rs841	C/T	55310492	<i>GCHI</i>	Intron	*
rs10143089	T/C	55315675	<i>GCHI</i>	intron	
rs17253619	T/C	55411744	<i>WDHD1</i>	intron	
rs11846854	A/G	55493025	<i>SOCS4</i>	Promoter	**
rs1209087	A/G	55493220	<i>SOCS4</i>	Promoter	
rs1187878	G/A	55493350	<i>SOCS4</i>	Promoter	*
rs1201378	G/A	55493408	<i>SOCS4</i>	Promoter	
rs17128136	G/A	55510110	<i>SOCS4</i>	P116P	
rs2340943	C/T	55518007	<i>MAPK1IP1L</i>	promoter	*
rs2251366	T/C	55518156	<i>MAPK1IP1L</i>	promoter	*
rs2075598	C/T	55604353	<i>LGALS3</i>	intron	
rs10148371	G/A	55609418	<i>LGALS3</i>	K183R	**
rs10498475	C/T	55612480	<i>LGALS3</i>	3' régió	
rs11622740	G/A	55617844	<i>LGALS3</i>	3' régió	
rs10144326	A/G	55643908	<i>DLGAP5</i>	F307F	
rs2274271	G/A	55655692	<i>DLGAP5</i>	G69E	*
rs3759666	G/A	55658259	<i>DLGAP5</i>	5' UTR	
		<i>Chr: 11</i>			
rs7935186	C/T	59748663	<i>OOSP1</i>	intron	
rs563748	T/C	59766499	<i>OOSP1</i>	intron	
rs1144744	T/C	59798348	<i>PLAC1L</i>	Promoter	
rs2276044	A/G	59814287	<i>PLAC1L</i>	intron	*
rs528823	C/T	59837097	<i>MS4A3</i>	T188T	
rs569108	T/C	59863104	<i>MS4A2</i>	E237G	
rs540170	G/A	59880038	-	-	
rs646924	C/T	59950417	<i>MS4A6A</i>	Intron	***
rs607639	G/A	59978172	<i>MS4A4E</i>	-	
rs7127662	C/T	60013117	-	-	
rs11230221	C/T	60035236	-	-	
rs10750931	A/G	60059810	<i>MS4A4A</i>	K52E	
rs12792791	G/A	60082497	<i>MS4A4A</i>	3' régió	
rs2304934	T/C	60102396	<i>MS4A6E</i>	T10A	*
rs10792269	A/G	60117126	<i>MS4A6E</i>	3' régió	
rs3829247	C/T	60138201	<i>MS4A7</i>	Promoter	

rs2233253	T/C	60157166	<i>MS4A7</i>	intron	
rs4939353	G/A	60173554	<i>MS4A14</i>	intron	
rs11230311	T/C	60197765	<i>MS4A5</i>	intron	*
rs1941030	T/C	60225758	<i>MS4A1</i>	intron	
rs7925087	C/T	60250397	<i>MS4A12</i>	Promoter	
rs2298553	C/T	60265002	<i>MS4A12</i>	Q71X	
rs2298559	T/C	60274640	<i>MS4A12</i>	3' UTR	
rs2847204	C/T	60326521	-	-	
rs4939426	C/T	60375128	<i>C11orf64</i>	Promoter	
rs1552474	T/C	60388078	<i>C11orf64</i>	Intron	
rs586571	G/A	60454333	<i>C11orf64</i>	Intron	
rs1567083	G/A	60473821	<i>MS4A8B</i>	intron	
rs4939452	C/T	60537578	<i>MS4A15</i>	intron	*
rs751026	C/T	60561613	<i>MS4A10</i>	intron	
rs12419635	C/T	60565921	<i>MS4A10</i>	P219L	
rs6591625	A/G	60566362	<i>MS4A10</i>	intron	**
rs7935803	C/T	60566458	<i>MS4A10</i>	intron	
rs1032936	T/C	60566750	<i>MS4A10</i>	intron	
rs488483	C/T	60592227	-	-	
rs2074422	T/C	60609972	<i>CCDC86</i>	P126P	
rs493176	T/C	60617942	<i>GPR44</i>	3' régió	*
rs7167	T/C	60618134	<i>GPR44</i>	3' régió	
rs545659	G/A	60619657	<i>GPR44</i>	3' UTR	
rs12807053	T/C	60620267	<i>GPR44</i>	D309G	*
rs2467642	C/T	60620585	<i>GPR44</i>	V203A	*
rs514524	T/C	60645214	<i>ZP1</i>	3' régió	
rs3763840	C/T	60666341	<i>PRPF19</i>	S348S	
rs7928208	A/G	60667907	<i>PRPF19</i>	intron	
rs555835	C/T	60689445	<i>TMEM109</i>	P179P	
rs3794042	A/G	60696884	<i>TMEM132A</i>	intron	
rs525574	T/C	60703260	<i>TMEM132A</i>	intron	
rs2469887	G/A	60704213	<i>TMEM132A</i>	A969V	*
rs12422200	C/T	60728850	<i>SLC15A3</i>	Promoter	
rs2905506	C/T	60750048	<i>CD6</i>	intron	
rs2237997	T/C	60772090	<i>CD6</i>	intron	
rs954237	C/T	62064715	<i>SCGB1D4</i>	intron	
rs2513081	T/C	62092267	-	-	
rs2302360	A/G	62158068	<i>ASRGL1</i>	intron	
rs3741240	G/A	62186542	<i>SCGB1A1</i>	5' UTR	

rs2259606	T/C	62201131	<i>AHNAK</i>	3' UTR	***
rs7118247	T/C	62213758	<i>AHNAK</i>	intron	
rs2513044	C/T	62237317	<i>AHNAK</i>	intron	
rs11827029	C/T	62255617	<i>AHNAK</i>	intron	
rs11231128	A/G	62290719	<i>AHNAK</i>	S3724P	
rs2509961	A/G	62310909	<i>AHNAK</i>	intron	*
rs7941395	A/G	67347417	<i>GSTPI</i>	Promoter	
rs1695	A/G	67352689	<i>GSTPI</i>	I105V	
rs1138272	C/T	67353579	<i>GSTPI</i>	A114V	
rs1871043	A/G	67374581	<i>NDUFV1</i>	intron	*
rs3765088	T/C	67399970	<i>TBX10</i>	intron	*
rs1993839	A/G	67406829	<i>TBX10</i>	intron	
rs2509712	A/G	67408090	<i>TBX10</i>	Promoter	

^a : Allélek a forward szálon (1: gyakori, 2: ritka allél).

^b : Genomiális pozíció az NCBI Genome Build 37.1 alapján.

^c : Kizárás oka:

* sikertelen genotipizálás

** MAF = 0

*** HWE-től való szignifikáns eltérés a kontroll csoportban

Rövidítések: MAF: minor allél frekvencia, Chr: kromoszóma, UTR: untranslated (nem átiródó) régió

4.3.1 A frekventista statisztikai módszer eredményei

Az SNP-k allél és genotípus gyakoriságainak értékeit a 15. táblázatban, a frekvencia adatokkal számolt HWE, OR és az azokra vonatkozó p értékeket azok terjedelmére való tekintettel a Melléklet 1. táblázatában mutatom be. A Bonferroni-korrigált szignifikancia szint határát a vizsgált SNP-k számának megfelelően $p = 0,0005$ értéknél húztuk meg.

Az alléleloszlást megvizsgálva egyedül az *FRMD6* (FERM domain containing 6) gén promóterében elhelyezkedő rs3751464 SNP ritka (T) allélja esetében találtunk szignifikáns asszociációt az asztmával (OR = 1,43, 95% CI = 1,18-1,75, $p = 0,0003$).

A genotípus eloszlás tekintetében a *PTGDR* (Prostaglandin D receptor gén) 3' UTR régiójában elhelyezkedő rs17831682 ritka genotípusa (CC) mutatott szignifikáns asszociációt az asztma fenotípussal (OR = 27,23, 95 % CI = 1,55-478,07, $p = 0,00039$).

Ezt követően meghatároztuk a vizsgált SNP-k által alkotott haplotípusokat, és gyakoriságukat összehasonlítottuk a kontroll és beteg populációban. Az *FRMD6* génben található két SNP, az rs3751464 és rs17666653 által alkotott haplotípusok eloszlásában szignifikáns különbséget találtunk a kontroll és asztmás csoport között. Míg a TC haplotípus (gyakorisága kontrollokban 19%, betegekben 25%) növelte (OR = 1,41, 95% CI = 1,07-1,87, p = 0,048), a CC haplotípus (61% vs. 53%) csökkentette az asztmára való hajlamot (OR = 0,73, 95% CI = 0,57-0,92, p = 0,02). Meg kell jegyezni azonban, hogy a haplotípus-asszociációk szignifikancia szintje jóval alatta marad az SNP-asszociációk szignifikancia szintjének, és meglepte valószínűleg csak az rs3751464 önálló hatásának tulajdonítható.

15. táblázat: A parciális genomszűrés során vizsgált SNP-k allél- és genotípus eloszlása.

SNP	MAF a kontroll csoportban (%)	MAF a beteg csoportban (%)	Genotípus frekvencia a kontroll csoportban (%)*			Genotípus frekvencia a beteg csoportban (%)*		
			0	1	2	0	1	2
rs2513081	19,35	19,38	65,10	31,11	3,79	64,91	31,42	3,67
rs7118247	19,74	16,97	65,23	30,07	4,71	69,27	27,52	3,21
rs10750931	15,10	16,17	71,90	26,01	2,09	69,95	27,75	2,29
rs528823	32,68	30,73	45,36	43,92	10,72	48,85	40,83	10,32
rs2302360	21,24	20,87	63,27	30,98	5,75	62,61	33,03	4,36
rs540170	45,75	48,97	29,02	50,46	20,52	24,54	52,98	22,48
rs7127662	22,16	19,15	60,92	33,86	5,23	65,60	30,50	3,90
rs2847204	13,07	11,12	76,21	21,44	2,35	78,90	19,95	1,15
rs1567083	14,51	12,50	73,33	24,31	2,35	76,61	21,79	1,61
rs7925087	7,52	5,96	85,36	14,25	0,39	88,30	11,47	0,23
rs2074422	19,61	21,22	64,31	32,16	3,53	61,70	34,17	4,13
rs488483	20,26	19,50	62,88	33,73	3,40	65,14	30,73	4,13
rs7935803	35,75	39,91	42,61	43,27	14,12	38,76	42,66	18,58
rs12422200	23,07	24,20	58,95	35,95	5,10	57,80	36,01	6,19
rs7928208	2,03	3,56	96,21	3,53	0,26	92,89	7,11	0,00
rs2237997	36,14	33,37	40,26	47,19	12,55	43,35	46,56	10,09
rs3741240	35,23	35,21	43,01	43,53	13,46	40,60	48,39	11,01
rs11827029	4,38	2,87	91,90	7,45	0,65	94,27	5,73	0,00
rs11231128	3,07	2,06	93,99	5,88	0,13	95,87	4,13	0,00
rs954237	37,25	37,50	40,13	45,23	14,64	39,22	46,56	14,22
rs2905506	23,01	24,20	60,26	33,46	6,27	58,26	35,09	6,65
rs563748	10,92	9,40	79,61	18,95	1,44	82,11	16,97	0,92
rs10792269	36,60	34,52	40,52	45,75	13,73	44,50	41,97	13,53

rs12792791	30,39	28,33	47,71	43,79	8,50	51,61	40,14	8,26
rs7935186	24,25	26,49	59,08	33,33	7,58	53,90	39,22	6,88
rs2513044	37,52	36,81	36,60	51,76	11,63	38,53	49,31	12,16
rs2298553	48,63	48,51	25,62	51,50	22,88	27,98	47,02	25,00
rs569108	3,01	2,18	94,51	4,97	0,52	0,23	3,90	95,87
rs514524	34,05	31,31	43,27	45,36	11,37	47,02	43,35	9,63
rs4939426	12,35	10,67	77,78	19,74	2,48	79,82	19,04	1,15
rs1941030	37,84	36,35	38,43	47,45	14,12	39,45	48,39	12,16
rs4939353	28,10	27,18	52,81	38,17	9,02	53,67	38,30	8,03
rs3829247	27,39	26,49	52,94	39,35	7,71	53,67	39,68	6,65
rs708498	17,58	18,00	67,71	29,41	2,88	66,51	30,96	2,52
rs3818186	26,08	25,92	53,59	40,65	5,75	55,28	37,61	7,11
rs3759666	1,18	1,26	97,65	2,35	0,00	97,48	2,52	0,00
rs751026	46,80	49,54	28,50	49,41	22,09	27,75	45,41	26,83
rs2101919	25,62	25,00	54,38	40,00	5,62	6,65	36,70	56,65
rs17197	14,18	13,65	73,33	24,97	1,70	73,85	25,00	1,15
rs2273431	8,17	9,52	84,31	15,03	0,65	82,80	15,37	1,83
rs1307289	16,27	14,68	70,59	26,27	3,14	72,94	24,77	2,29
rs1138272	9,35	7,45	82,35	16,60	1,05	86,24	12,61	1,15
rs1254600	16,54	17,55	69,80	27,32	2,88	67,43	30,05	2,52
rs12419635	9,22	9,86	82,22	17,12	0,65	80,96	18,35	0,69
rs7941395	37,25	38,19	38,82	47,84	13,33	38,99	45,64	15,37
rs2277494	24,05	23,97	58,69	34,51	6,80	58,94	34,17	6,88
rs1051069	46,80	48,05	27,32	51,76	20,92	25,69	52,52	21,79
rs3763840	34,64	35,55	42,88	44,97	12,16	41,74	45,41	12,84
rs8013756	12,16	11,47	77,78	20,13	2,09	77,52	22,02	0,46
rs1032936	31,44	28,56	46,93	43,27	9,80	52,29	38,30	9,40
rs1254601	43,20	41,86	31,50	50,59	17,91	34,86	46,56	18,58
rs7145029	16,47	17,66	69,80	27,45	2,75	67,43	29,82	2,75
rs10498475	6,93	6,42	86,54	13,07	0,39	87,39	12,39	0,23
rs17126074	1,05	0,57	97,91	2,09	0,00	98,85	1,15	0,00
rs8004624	49,02	48,74	26,27	49,41	24,31	25,46	46,56	27,98
rs6572868	10,33	10,32	80,13	19,08	0,78	80,73	17,89	1,38
rs3825596	7,78	8,49	84,84	14,77	0,39	83,72	15,60	0,69
rs17127622	6,21	4,24	87,97	11,63	0,39	91,97	7,57	0,46
rs762063	43,46	39,91	32,42	48,24	19,35	34,40	51,38	14,22
rs12889199	7,65	7,00	85,36	13,99	0,65	86,70	12,61	0,69
rs17253619	10,85	11,93	79,74	18,82	1,44	77,06	22,02	0,92
rs2357947	10,07	10,67	80,78	18,30	0,92	80,05	18,58	1,38
rs11622740	35,69	32,91	41,57	45,49	12,94	46,33	41,51	12,16
rs946615	26,27	24,31	53,59	40,26	6,14	58,03	35,32	6,65
rs2277495	31,63	29,13	47,45	41,83	10,72	50,92	39,91	9,17
rs3751464	19,61	25,92	64,71	31,37	3,92	55,05	38,07	6,88
rs17127595	13,66	15,02	74,25	24,18	1,57	72,48	25,00	2,52
rs1695	30,72	31,42	48,50	41,57	9,93	46,56	44,04	9,40
rs11431	48,56	48,05	24,58	53,73	21,70	24,77	54,36	20,87

rs2075598	1,76	1,03	96,47	3,53	0,00	97,94	2,06	0,00
rs4901200	13,07	11,93	75,82	22,22	1,96	77,29	21,56	1,15
rs7150275	22,81	23,39	59,87	34,64	5,49	60,09	33,03	6,88
rs10141001	14,18	12,96	73,73	24,18	2,09	75,46	23,17	1,38
rs3794042	39,41	39,68	37,78	45,62	16,60	36,47	47,71	15,83
rs1874569	25,29	24,43	54,90	39,61	5,49	58,03	35,09	6,88
rs2509712	18,43	20,30	66,14	30,85	3,01	62,16	35,09	2,75
rs7149810	23,14	23,97	59,74	34,25	6,01	59,40	33,26	7,34
rs7167	22,81	23,05	60,39	33,59	6,01	59,17	35,55	5,28
rs3742536	22,29	21,33	59,87	35,69	4,44	61,24	34,86	3,90
rs12895034	33,86	33,94	44,31	43,66	12,03	44,95	42,20	12,84
rs17694496	21,63	18,12	60,52	35,69	3,79	67,66	28,44	3,90
rs1201378	40,33	39,91	34,90	49,54	15,56	38,30	43,58	18,12
rs803012	22,68	21,67	59,61	35,42	4,97	60,78	35,09	4,13
rs708502	14,12	13,88	73,59	24,58	1,83	73,39	25,46	1,15
rs1209087	40,33	40,71	35,03	49,28	15,69	37,84	42,89	19,27
rs17125273	15,36	17,20	71,63	26,01	2,35	70,18	25,23	4,59
rs1565970	7,12	6,19	86,14	13,46	0,39	87,84	11,93	0,23
rs1957844	20,52	22,02	63,01	32,94	4,05	61,01	33,94	5,05
rs17666653	20,33	22,13	63,66	32,03	4,31	59,40	36,93	3,67
rs17128136	9,22	10,32	82,88	15,82	1,31	81,42	16,51	2,06
rs12587410	3,27	3,78	93,73	6,01	0,26	92,66	7,11	0,23
rs17831682	7,39	9,63	85,23	14,77	0,00	82,34	16,06	1,61
rs17666689	16,08	17,43	70,46	26,93	2,61	68,58	27,98	3,44
rs708486	45,82	48,62	28,63	51,11	20,26	28,21	46,33	25,46
rs9671722	16,01	17,09	71,24	25,49	3,27	69,50	26,83	3,67
rs1953861	38,24	41,28	37,78	47,97	14,25	34,63	48,17	17,20
rs17831675	7,25	9,63	85,62	14,25	0,13	82,11	16,51	1,38
rs1993839	19,67	80,85	64,31	32,03	3,66	65,60	30,50	3,90
rs555835	42,22	39,91	33,33	48,89	17,78	36,24	47,71	16,06
rs545659	23,46	23,17	59,48	34,12	6,41	59,40	34,86	5,73

*: 0 a vad/gyakori homozigóta, 1 a heterozigóta, 2 a ritka homozigóta genotípusokat jelöli.

Rövidítések: MAF: minor allél frekvencia

4.3.2 A bayesi-elemzés során kapott eredmények

4.3.2.1 Egyváltozós vizsgálatok

A bayesi elemzés legelemibb feladata a célváltozó Markov-takarójának meghatározása, és ennek révén a célváltozóval szoros kapcsolatban álló, releváns elemek feltárása. Munkánk során először azt vizsgáltuk, hogy az asztmával, mint célváltozóval milyen egyéb változók, SNP-k állnak direkt kapcsolatban. A legrelevánsabbnak bizonyuló SNP-eket a 16. táblázatban mutatom be. Az „a posteriori”

értékek a célváltozó és a vizsgált változó közötti kapcsolat valószínűségét adják meg, melyet matematikailag 0,5 érték felett inkább tartunk valószínűnek, mint elvetendőnek. Az összehasonlítás könnyebbsége érdekében a táblázat utolsó kettő oszlopában a frekventista elemzés (logisztikus regresszió) során kapott eredményeket is feltüntettem.

16. táblázat: A bayesi elemzés során legjelentősebbnek bizonyuló SNP-k „a posteriori” értékei.

SNP	Gén	Befolyásolt jelleg	Kromoszóma	A posteriori érték	OR (95%CI)	p-érték
rs7928208	<i>PRPF19</i>	asztma	11q12.2	0,73	1,78 (1,08- 2,95)	0,02
rs3751464	<i>FRMD6</i>	asztma	14q22.1	0,86	1,43 (1,18-1,75)	0,0003
rs17831682	<i>PTGDR</i>	asztma	14q22.1	0,51	1,38 (1,00-1,80)	0,05
rs708502	<i>PTGER2</i>	asztma	14q22	0,85	0,98 (0,77-1,25)	0,9
rs17197	<i>PTGER2</i>	asztma	14q22	0,82	1,05 (0,82-1,33)	0,7
rs7928208	<i>PRPF19</i>	asztma 6 éves korban	11q12.2	0,91	4,38 (1,89-10,14)	0,0005

Rövidítések: OR: odds ratio, 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum

Az asztma, mint önálló célváltozó vizsgálatokor összesen 5 SNP bizonyult relevánsnak. Ez az 5 SNP 4 különböző génben helyezkedik el: a *PRPF19* (Pre-mRNA-processing factor 19) gén a 11-es, az *FRMD6*, *PTDGR* és *PTGER2* (Prostaglandin E2 receptor) gének a 14-es kromoszómákon. A *PRPF19* génben található rs7928208 az asztma fiatalkori kialakulásával/diagnózisával mutatott kapcsolatot.

Az SNP-eket megvizsgáltuk az RA (allergiás rhinitis) és a CLI (klinikai paraméterekkel rendelkező) adathalmazokon is, melyek esetében az allergiás rhinitis és asztma (RA mintapopuláció), illetve az IgE szint, eozinofil szint, allergiás rhinitis és asztma (CLI mintapopuláció) többszörös célváltozókat alkottak.

Jelentősebb eredményeinket („a posteriori” értékeiket) a 17. táblázatban foglalom össze.

17. táblázat: A célváltozókkal asszociációt mutató releváns SNP-k és „a posteriori” értékeik az RA és CLI adathalmazokon mérve.

Gén	SNP	RA		CLI	
		Asztma, mint egyedüli célváltozó	Több célváltozó	Asztma, mint egyedüli célváltozó	Több célváltozó
<i>AHNAK</i>	rs11231128	0,801	0,826	0,394	0,684
<i>AHNAK</i>	rs11827029	0,798	0,810	0,426	0,774
<i>FRMD6</i>	rs3751464	0,324	0,280	0,039	0,267
<i>MS4A2</i>	rs569108	0,098	0,151	0,441	0,787
<i>PRPF19</i>	rs7928208	0,801	0,781	0,145	0,449
<i>PTGDR</i>	rs17831675	0,371	0,365	0,424	0,669
<i>PTGDR</i>	rs17831682	0,542	0,598	0,466	0,703
<i>PTGER2</i>	rs12587410	0,367	0,348	0,772	0,922
<i>PTGER2</i>	rs17197	0,380	0,371	0,596	0,881
<i>PTGER2</i>	rs708498	0,248	0,206	0,557	0,688
<i>TXNDC16</i>	rs1565970	0,754	0,717	0,235	0,484

Rövidítések: RA: allergiás rhinitis, CLI: klinikai paraméterekkel bíró mintapopuláció

Az eredmények közül a 11q13-as kromoszóma terület legtöbbet tanulmányozott, a nagy affinitású IgE receptor β -láncát kódoló *MS4A2* gént emelném ki, melynek SNP-je, rs569108 a klinikai paraméterek (IgE-, eozinofil szint, allergiás rhinitis és asztma), mint többszörös célváltozók alkalmazáskor mutatott erős asszociációt (magas „a posteriori” értéket) az asztmával. Az RA mintapopulációban pedig az *AHNAK* (desmoyokin) gén két SNP-je (rs11231128 és rs11827029) mutatta a legerősebb asszociációt az asztmával, mégpedig rhinitis fennállása esetében.

4.3.2.2 SNP-SNP és gén-gén interakciók

A 16. táblázat utolsó oszlopaiban jól látható, hogy a *PTGER2* génjében vizsgált 2 SNP eloszlása nem különbözik a kontroll és az asztmás csoportban (1 körüli OR érték). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az SNP-k nem önmagukban, hanem más SNP-vel való interakciójukban befolyásolják az asztmára való hajlamot.

A 18. táblázatban mutatom be azokat az asztma esetében leginkább kiemelkedő gén-gén és SNP-SNP kölcsönhatásokat, melyeket a bayesi elemzések valószínűsítettek. A

táblázat tartalmazza a genotípus-kölcsönhatásokra számolt legkisebb p és OR értékeket is (khi-négyzet teszt alapján).

18. táblázat: A gének illetve SNP-k kölcsönhatásaira számolt valószínűségi értékek.

#	Kölcsönható gének	Kölcsönható SNP-k	Kölcsönható genotípusok*	A posteriori értékek	OR (95% CI)	p-érték
1	<i>PTGER2</i>	rs17197	0	0,81	3,06 (1,98-7,84)	0,02
	<i>PTGER2</i>	rs708502	1			
2	<i>FRMD6</i>	rs3751464	2	0,80	3,52 (1,78-6,95)	0,0002
	<i>PTGER2</i>	rs708502	0			
3	<i>PTGER2</i>	rs17197	2	0,79	3,52 (1,78-6,95)	0,0002
	<i>FRMD6</i>	rs3751464	0			
4	<i>PRPF19</i>	rs7928208	0	0,61	0,65 (0,51-0,82)	0,0005
	<i>FRMD6</i>	rs3751464	0			
5	<i>PRPF19</i>	rs7928208	1	0,59	4,01 (1,23-13,10)	0,03
	<i>PTGER2</i>	rs708502	1			
6	<i>PRPF19</i>	rs7928208	1	0,58	2,97 (1,07-8,23)	0,05
	<i>PTGER2</i>	rs17197	1			
7	<i>PTGER2</i>	rs17197	0	0,78	3,52 (1,78-6,95)	0,0003
	<i>FRMD6</i>	rs3751464	2			
	<i>PTGER2</i>	rs708502	0			
8	<i>PRPF19</i>	rs7928208	1	0,58	2,80 (1,08-7,28)	0,05
	<i>PTGER2</i>	rs17197	0			
	<i>PTGER2</i>	rs708502	1			
9	<i>PRPF19</i>	rs7928208	2	0,56	0,66 (0,52-0,84)	0,0008
	<i>FRMD6</i>	rs3751464	0			
	<i>PTGER2</i>	rs708502	0			
10	<i>PRPF19</i>	rs7928208	0	0,55	3,22 (1,61-6,43)	0,0009
	<i>PTGER2</i>	rs17197	0			
	<i>FRMD6</i>	rs3751464	2			

*: 0 a vad/gyakori homozigóta, 1 a heterozigóta, 2 a ritka homozigóta genotípusokat jelöli.

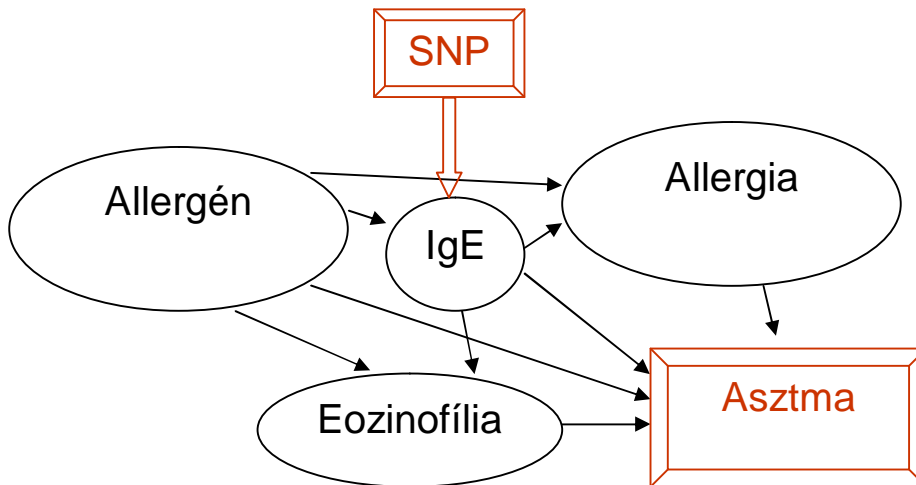
Rövidítések: 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum, OR: odds ratio

Statisztikailag releváns interakciókat találtunk génen belül (*PTGER2*-ben elhelyezkedő rs17197 és rs708502), gének között (pl. rs17197 a *PTGER2*-ben és rs3751464 az *FRMD6* génben), és kromoszómák között is (pl. rs7928208 a *PRPF19* génben a 11-es kromoszómán és rs3751464 az *FRMD6*-ban a 14-es kromoszómán).

Eredményeink alapján az *FRMD6* génjében elhelyezkedő rs3751464 bizonyult a legjelentősebb polimorfizmusnak az általunk vizsgált SNP-k közül. Az asztmára való hajlamot önmagában, és más SNP-vel kölcsönhatásban is befolyásolja. Az SNP ritka genotípusával (TT) való interakció minden esetben megnöveli az asztma kockázatát (3,22 és 3,52 közötti OR értékek), míg a gyakori genotípus (CC) csökkenti azt (0,65 és 0,66 OR értékek).

4.3.2.3 A megfigyelt asszociációk típusainak meghatározása

Egy genetikai variáció és a vizsgált fenotípus közti asszociáció többféle lehet. Az asszociációs vizsgálatok során talált SNP-k, az SNP-k között fennálló kapcsoltsági viszonyok -linkage disequilibrium, LD- következtében, gyakran egy másik SNP hatását tükrözik, és nem játszanak közvetlen szerepet a fenotípus kialakulásában. Ezekben az esetekben tranzitív, áttételes asszociációról beszélünk. Ezen túlmenően, többszörös célváltozók alkalmazása esetén a megfigyelt asszociációk származhatnak a fenotípus változók közötti kapcsolatból is. Például egy, az IgE szintet befolyásoló SNP és az asztma közti kapcsolat megvalósulhat közvetlen módon, valamint tranzitív hatás eredményeként is. Ezt szemlélteti az 2. ábra.



2. ábra: Egy SNP és az asztma között megfigyelt asszociáció lehetséges módjainak sematikus modellje

Ez alapján tovább karakterizáltuk az RA adathalmaz vizsgálata kapcsán megfigyelt, a 17. táblázatban korábban bemutatott asszociációkat. Minden SNP esetében meghatároztuk a valószínűségi értékeket azokra az esetekre, amikor az SNP közvetlenül vagy tranzitív módon, vagy mással kölcsönhatásban (interakcióban) befolyásolja az asztma fenotípust. A legmagasabb valószínűségi értékkel bíró SNP-kre vonatkozó adatokat a 19. táblázat mutatom be. Az erősen releváns oszlopban található „a posteriori” értékek megfelelnek a 17. táblázatban, RA adathalmaz és asztma mint egyedüli célváltozó esetében számolt „a posteriori” értékeknek. Az eredmények részletes elemzése nélkül arra hívnám fel a figyelmet, hogy a számított valószínűségi értékek alapján a megfigyelt asszociációk nagy része inkább tranzitív, mintsem közvetlen hatásnak tulajdonítható, vagyis az SNP és az asztma közti kapcsolat egy másik fenotípus-változó, jelen esetben a rhinitis státusz ismeretétől függ.

19. táblázat. Az asszociációk egyes típusaira számolt valószínűségi értékek. A táblázatban csak a magas “a posteriori” értékkel rendelkező SNP-k kerülnek bemutatásra.

GÉN	SNP	Asszociáció	Erősen releváns	Közvetlen hatás	Tranzitív hatás	Interakció
<i>AHNAK</i>	rs11231128	0,643	0,736	0,029	0,535	0,708
<i>AHNAK</i>	rs11827029	0,868	0,728	0,021	0,399	0,707
<i>FRMD6</i>	rs3751464	0,862	0,300	0,284	0,331	0,016
<i>MS4A2</i>	rs569108	0,653	0,111	0,087	0,633	0,024
<i>PRPF19</i>	rs7928208	0,878	0,843	0,718	0,822	0,125
<i>PTGDR</i>	rs17831675	0,923	0,362	0,326	0,747	0,035
<i>PTGDR</i>	rs17831682	0,923	0,524	0,578	0,863	0,000
<i>PTGDR</i>	rs803012	0,973	0,002	0,000	0,539	0,002
<i>PTGER2</i>	rs1254600	0,970	0,088	0,090	0,353	0,000
<i>PTGER2</i>	rs1254601	0,989	0,046	0,013	0,126	0,033
<i>PTGER2</i>	rs12587410	0,618	0,405	0,157	0,522	0,248
<i>PTGER2</i>	rs17197	0,970	0,354	0,350	0,604	0,004
<i>PTGER2</i>	rs708498	0,983	0,227	0,002	0,108	0,225
<i>TXNDC16</i>	rs1565970	0,309	0,722	0,008	0,189	0,713

4.3.3 GÉNEXPRESSZIÓ MÉRÉS

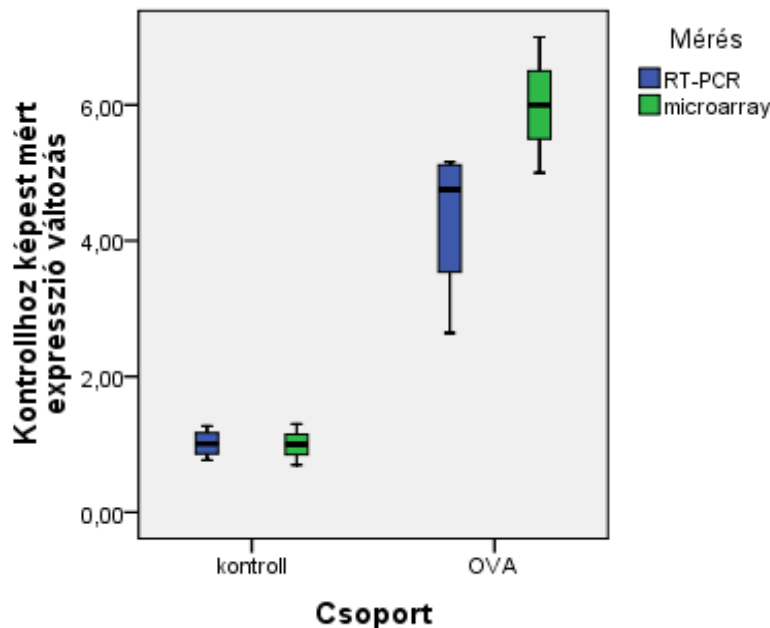
Az SNP elemzések során az asztmával, vagy annak valamely endofenotípusával asszociációt mutató gének expresszióját egészséges és asztmás személyekből származó indukált köpet mintákban hasonlítottuk össze. Az összesen 31, köpetindukción átesett személy mintáiból az asztmások közül 12, a kontrollok közül 9 esetben tudunk expressziós elemzéshez megfelelő minőségű RNS-t izolálni. A vizsgált gének közül egyedül az *FRMD6* esetében találtunk szignifikáns eltérést, a kontroll mintákban átlagosan 2,73-szor magasabb értékkel a beteg mintákhoz viszonyítva ($p = 10^{-6}$). A többi vizsgált gén (*PTGDR*, *PTGER2*, *MS4A2*, *AHNAK*, *PRPF19*, *TXNDC16*) esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget az asztmás és a kontroll csoport mintáiban mérhető mRNS szintek között. Az *FRMD6* expressziójának hasonló csökkenését figyeltük meg a csoportunkban korábban allergizált egérmodellben is az OVA indukciót követően (fold change= 1,53).

4.4 A survivin szerepe az asztmában

4.4.1 A *BIRC5* expressziójának meghatározása ovalbuminnal allergizált egérben és humán indukált köpet mintákban

Ahogy már a bevezetőben említettem, a munkacsoportunkban korábban létrehozott ovalbumin-indukált allergiás asztma egér modellben a *BIRC5* expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult az allergizált állatok tüdőszövetében a kontroll állatokéhoz képest (fold change érték: 5,94, $p = 0.001$) [98].

Jelen vizsgálatunk első lépéseként az egér tüdőszövetek génexpressziós szintjét detektáló microarray elemzésből származó adatainkat real-time PCR technikával validáltuk. Az eredmények a 3. ábrán láthatóak.



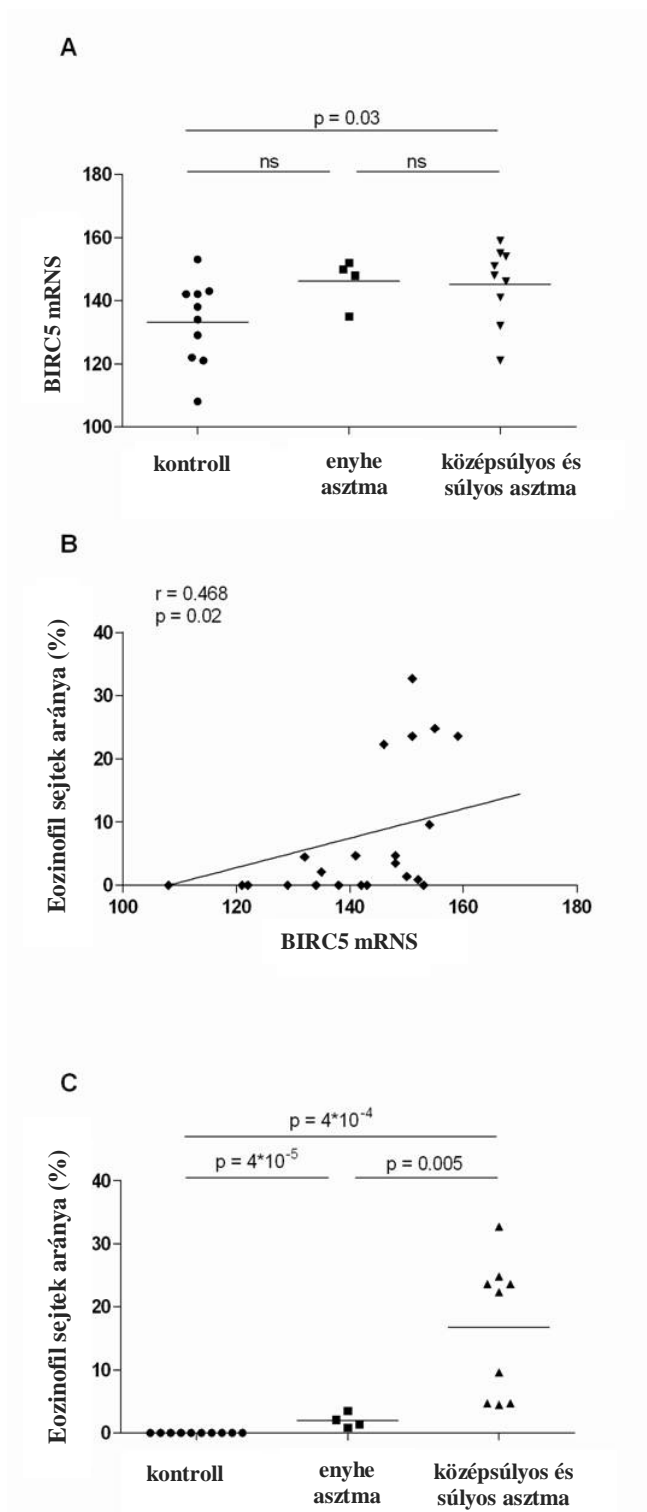
3. ábra: A *BIRC5* gén expressziójának változása ovalbumin (OVA)-indukció hatására microarray és RT-PCR rendszerekben mérve

A molekula humán asztmában betöltött szerepének alátámasztása céljából a *BIRC5* mRNS szintjét 13 asztmás és 10 egészséges kontroll személytől gyűjtött indukált köpet mintában hasonlítottuk össze.

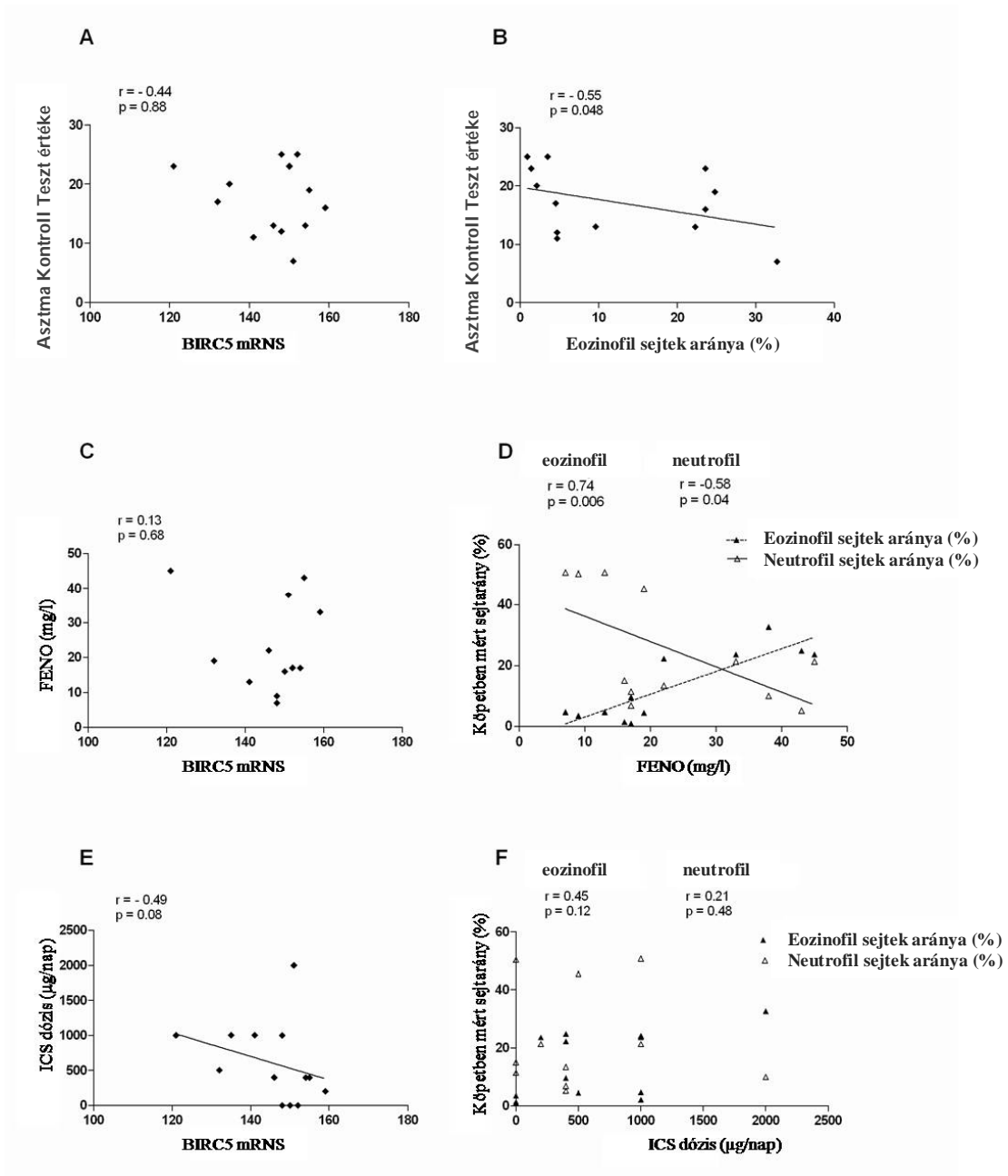
A 4/A ábrán látható, hogy az átlagos gén-expresszió szint szignifikánsan magasabb volt az asztmás személyek mintáiban a kontroll mintákban mért mRNS szinthez képest

($p = 0,03$). Az asztma súlyossági foka (GINA stádiumok) és a köpet *BIRC5* mRNS szintje között nem találtunk összefüggést.

A *BIRC5* mRNS szint szignifikáns korrelációt mutatott a köpetben jelenlévő eozinofil sejtek arányával ($r = 0,468$, $p = 0,02$, 4/B ábra). A nem, életkor és a dohányzási szokások nem mutattak összefüggést a köpetben kimutatható *BIRC5* mRNS szintjével.



4. ábra: *BIRC5* mRNS szint, a köpet relatív eozinofil szintje és az asztma súlyossági fokok közötti kapcsolatok. A *BIRC5* mRNS szintet a β -actin expresszióhoz viszonyítva ábrázoltuk, az adatok százalékban vannak feltüntetve.



5. ábra: A köpetben mért *BIRC5* mRNS szintek és a betegek klinikai paramétereinek közötti korrelációk (A, C, E ábrák), valamint a köpet relatív eozinofil/neutrofil sejtszámai és a betegek klinikai paramétereinek közötti korrelációk mértéke (B, D, F ábrák). A korrelációs görbét csak szignifikáns értékek esetében ábrázoltuk. Rövidítések: FENO: exhaled nitric oxide level, ICS: inhaled corticosteroids

Érdemes megemlíteni, hogy a köpet eozinofil sejtaránya a súlyosabb asztma stádiumokban lévő vizsgálati személyek esetében szignifikánsan magasabb, mint a kontroll, illetve az enyhébb asztma stádiumba sorolható személyek esetében ($p = 4 \cdot 10^{-4}$, 4/C ábra). A köpet neutrofil sejtarányával kapcsolatban hasonló korrelációt nem tapasztaltunk ($p = 0,75$).

A BIRC5 mRNS szintje nem mutatott összefüggést az Asztma Kontroll Teszt, a kilélegzett nitrogén-monoxid (FENO), és az alkalmazott kortikoszteroid dózis (ICS) értékeivel sem (5/A, 5/C, 5/E ábrák).

Statisztikailag szignifikáns, ám eltérő irányú korrelációt tapasztaltunk a FENO értékek és a köpet relatív eozinofil ($p = 0,006$, $r = 0,742$) illetve neutrofil ($p = 0,048$, $r = -0,58$) sejtszáma között (5/D ábra). Gyenge korrelációt figyeltünk meg a köpet relatív eozinofil sejtszáma és az Asztma Kontroll Teszt értékek között ($p = 0,048$, $r = -0,55$, 5/B ábra), míg az ICS dózis nem állt összefüggésben a köpet sejtarányokkal (5/F ábra).

4.4.2 BIRC5 szabályozó régióiban lévő SNP-k vizsgálata

A genotipizált SNP-k jellemzői a 20. táblázatban láthatóak. A hat vizsgált polimorfizmus közül az rs3764384 genotípus eloszlása a kontroll populáción belül jelentős eltérést mutatott a Hardy-Weinberg egyenlőségtől, így ezt az SNP-t kizártuk a további vizsgálatokból.

A logisztikus regressziós elemzések eredményeként azt találtuk, hogy az rs8073903 és az rs8073069 SNP-k ritka alléljai (C) szignifikáns asszociációt mutatnak az asztmára való megnövekedett hajlammal, bár az utóbbi SNP esetében az asszociáció mértéke nem érte el a Bonferroni-korrigált szignifikancia szintet (OR = 1,458, 95% CI = 1,126-1,889, $p = 0,004$ az rs8073903 esetében és OR = 1,393, 95% CI = 1,061-1,830, $p = 0,017$ az rs8073069 esetében). A nemeket külön vizsgálva mindkét SNP esetében azt tapasztaltuk, hogy az asszociáció a nők körében még kifejezettebb.

Az eredmények a 21. táblázatban kerülnek bemutatásra.

20. táblázat: A *BIRC5* gén polimorfizmusainak jellemzői és allélfrekvenciái a vizsgált populáción.

SNP	Pozíció ^a	Relatív pozíció a start kodontól	Allélek (1/2) ^b	Génhez viszonyított elhelyezkedés	MAF a kontroll csoportban	MAF a beteg csoportban	p-érték ^c	HWE ^d
rs3764384	chr17:76207728	-2670	C/T	5' régió	0,39	0,36	0,77	0,00005
rs8073903	chr17:76209754	-644	T/C	5' régió	0,34	0,42	0,30	0,16
rs8073069	chr17:76209773	-625	G/C	5' régió	0,25	0,32	0,34	0,05
rs17878467	chr17:76210157	-241	C/T	5' régió	0,09	0,10	1	0,88
rs9904341	chr17:76210367	-31	G/C	5' UTR	0,35	0,34	1	0,55
rs1508147	chr17:76222588	12190	G/A	3' régió	0,42	0,44	0,88	0,06

^a : Genomiális pozíció az NCBI Genome Build 37.1 alapján.

^b : Allélek a forward szálon (1: gyakori, 2: ritka allél).

^c : A beteg és kontroll csoportok allélfrekvenciája közötti eltérés p értéke.

^d : eltérés a Hardy-Weinberg egyenlőségtől a kontroll populációban.

Rövidítések: MAF: minor allél frekvencia.

21. táblázat: A *BIRC5* génben vizsgált SNP-k és az asztma közötti asszociációs elemzések eredményei.

	rs8073903		rs8073069		rs17878467		rs9904341		rs1508147	
	p- érték	OR (95% CI)	p- érték	OR (95% CI)	p- érték	OR (95% CI)	p- érték	OR (95% CI)	p- érték	OR (95% CI)
Asztma	0,004	1,46 (1,13–1,89)	0,017	1,39 (1,06–1,83)	0,263	1,28 (0,83–1,96)	0,373	0,89 (0,68–1,15)	0,080	1,27 (0,97–1,65)
Nők	0,003	1,87 (1,23–2,84)	0,003	1,89 (1,24–2,88)	0,918	1,03 (0,55–1,95)	0,585	0,89 (0,60–1,34)	0,017	1,68 (1,10–2,59)
Férfiak	0,195	1,25 (0,89–1,73)	0,553	1,12 (0,78–1,60)	0,163	1,52 (0,85–2,72)	0,491	0,89 (0,63–1,25)	0,756	1,06 (0,75–1,48)
Allergiás asztma	0,927	1,02 (0,72–1,43)	0,813	0,96 (0,66–1,39)	0,576	1,17 (0,67–2,06)	0,818	0,96 (0,68–1,36)	0,618	1,10 (0,77–1,57)
Nők	0,089	1,74 (0,92–3,22)	0,339	1,38 (0,71–2,69)	0,387	1,50 (0,60–3,78)	0,11	0,62 (0,35–1,11)	0,210	1,51 (0,79–2,89)
Férfiak	0,449	0,85 (0,55–1,31)	0,421	0,83 (0,52–1,32)	0,783	1,11 (0,53–2,31)	0,488	1,18 (0,74–1,88)	0,853	1,04 (0,66–1,65)
Infekciós asztma	0,792	0,95 (0,66–1,37)	0,500	0,87 (0,58–1,30)	0,365	1,30 (0,74–2,30)	0,220	0,79 (0,54–1,15)	0,870	0,97 (0,66–1,417)
Nők	0,518	0,81 (0,42–1,55)	0,528	0,82 (0,45–1,51)	0,920	0,95 (0,38–2,42)	0,528	0,82 (0,45–1,51)	0,670	0,87 (0,45–1,68)
Férfiak	0,852	1,04 (0,67–1,62)	0,634	0,89 (0,54–1,45)	0,190	1,62 (0,79–3,33)	0,260	0,75 (0,46–1,23)	0,906	1,03 (0,64–1,64)
Nem-allergiás asztma	0,022	1,62 (1,07–2,46)	0,001	2,01 (1,34–3,02)	0,347	0,70 (0,33–1,47)	0,099	1,43 (0,94–2,18)	0,101	1,43 (0,93–2,20)
Nők	0,005	2,81 (1,37–5,75)	0,001	3,10 (1,57–6,11)	0,440	0,65 (0,22–1,95)	0,141	1,61 (0,86–3,02)	0,003	3,06 (1,46–6,47)

Férfiak	0,708	1,11 (0,64–1,92)	0,172	1,46 (0,85–2,53)	0,461	0,68 (0,25–1,90)	0,242	1,42 (0,79–2,56)	0,081	1,70 (0,94–3,09)
Terheléses asztma	0,588	0,89 (0,59–1,34)	0,169	0,72 (0,45–1,15)	0,181	1,51 (0,83–2,79)	0,381	1,20 (0,80–1,81)	0,892	1,03 (0,67–1,58)
Nők	0,921	1,04 (0,51–2,11)	0,696	0,86 (0,40–1,84)	0,538	1,34 (0,53–3,43)	0,729	0,89 (0,46–1,73)	0,500	1,30 (0,61–2,78)
Férfiak	0,445	0,82 (0,50–1,36)	0,159	0,65 (0,35–1,19)	0,241	1,62 (0,73–3,63)	0,154	1,46 (0,87–2,45)	0,663	0,89 (0,52–1,51)
Abszolút eozinofil szám	0,232	1,04 (- 0,02–0,09)	0,506	1,02 (- 0,04–0,09)	0,366	1,04 (-0,05–0,14)	0,004	0,92 (-0,15–-0,03)	0,384	1,03 (-0,04–0,09)
Relatív eozinofil szint	0,140	1,84 (- 0,20–1,42)	0,436	1,41 (- 0,53–1,22)	0,193	2,44 (-0,46–2,24)	0,002	0,27 (-2,13–-0,47)	0,247	1,70 (-0,37–1,41)
IgE szint	0,917	0,98 (0,65–1,48)	0,471	1,17 (0,76–1,81)	0,175	0,62 (0,32–1,23)	0,135	1,38 (0,90–2,11)	0,853	1,04 (0,66–1,64)

A félkövér karakterek a Bonferroni-korrekció szerinti ($p < 0,01$) szignifikáns eredményeket jelölik.

Rövidítések: 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum, OR: odds ratio

Az asztma endofenotípusok tekintetében az rs8073903 és az rs8073069 SNP-k ritka alléljai a nem-allergiás asztmára való fokozott hajlammal asszociáltak szignifikáns mértékben (OR = 1,887, 95% CI = 1,238-2,878, $p = 0,003$ az rs8073069, és OR = 1,872, 95% CI = 1,232-2,843, $p = 0,003$ az rs8073903 esetében). Hasonlóan a kontroll-asztma vizsgálatokhoz, a kontroll és a nem allergiás asztma csoportok között megfigyelhető genotípus eloszlás a két említett SNP esetében szignifikánsan erősebb asszociációt mutatott a nők alpopulációjában.

Az infekció- valamint a terhelés által indukált asztma endofenotípusokkal egyik vizsgált SNP sem mutatott szignifikáns asszociációt.

Az SNP-k és a szérumban lévő eozinofil, valamint a szérumban lévő IgE szintek közötti korreláció meghatározására lineáris regressziót alkalmaztunk.

Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az rs9904341 SNP és a szérumban lévő eozinofil szintek között, mind a relatív, mind pedig az abszolút sejtszám értékek tekintetében. Adataink alapján az rs9904341 SNP vad genotípusát hordozó vizsgálati személyek szignifikánsan magasabb szérumban lévő eozinofil szinttel rendelkeznek, mint azok a személyek, akik a ritka allélt is hordozzák (66,2% vs. 58,9%, $p = 0,004$ az abszolút, 43,6% vs. 24,2%, $p = 0,002$ a relatív eozinofil szint esetében).

Az IgE szint és a vizsgált SNP-k között nem találtunk szignifikáns korrelációt.

Ezt követően meghatároztuk a polimorfizmusok által alkotott becsült haplotípusokat és összehasonlítottuk a becsült haplotípus frekvenciákat a különböző vizsgálati csoportok között. A szignifikáns különbséget mutató haplotípusok adatait az 22. táblázatban foglaltam össze. A legmarkánsabb különbségeket az rs8073903 és az rs8073069 által alkotott haplotípusok mutatták. Az asztmás és kontroll populáció között erősen szignifikáns különbséget találtunk a két polimorfizmus vad alléljai által alkotott haplotípus (TG) megoszlásában (57% vs. 65%, a beteg vs. kontroll csoportban, $p = 0,004$), ami a vad haplotípus asztmában betöltött védő szerepére utal. A két ritka alléljai által alkotott haplotípus nominálisan szignifikáns, azaz kevésbé erős különbséget mutatott a vizsgált populációk között (31% vs. 25%, $p = 0,019$).

A nem-allergiás asztmás és az egyéb asztmás alpopulációkat összehasonlítva ugyanezen haplotípusok gyakoriságában még kifejezettebb eltéréseket tapasztaltunk. A ritka allélek kombinációjából létrejövő haplotípus (CC) szignifikánsan gyakrabban fordult elő a nem-

allergiás asztmás alpopulációban az egyéb asztmás alpopulációhoz képest (47% vs. 27%, $p = 5 \cdot 10^{-5}$).

A szérumban eozinofil szintet vizsgálva azt találtuk, hogy az rs9904341 ritka alléját hordozó haplotípusok gyakrabban fordulnak elő az alacsony relatív eozinofil számmal rendelkező beteg egyénekben, mint azokban, akik szérumban relatív eozinofil szintje magas (pl. az 5 vizsgált SNP-t magába foglaló, TGCCG haplotípus esetében: 34% vs. 21%, $p = 0,015$). Mivel ennek a különbségnek a szignifikancia szintje alacsonyabb, mint amit az rs9904341 és a szérumban eozinofil szintek vizsgálatánál tapasztaltunk, arra következtethetünk, hogy ebben az esetben a haplotípusok szintjén megfigyelhető statisztikai szignifikancia kizárólag az rs9904341 hatásának tulajdonítható.

22. táblázat: A *BIRC5* gén polimorfizmusai által alkotott haplotípusok gyakorisága és asszociációjának mértéke a különböző asztma endofenotípusokkal.

Haplotípus	Gyakoriság		OR (95% CI)	p-érték
ASZTMA				
rs8073903-rs8073069				
	Kontroll	Asztma		
TG	0,651	0,574	0,721 (0,576-0,902)	0,004
CC	0,253	0,311	1,336 (1,048-1,703)	0,019
CG	0,096	0,111	1,182 (0,862-1,690)	0,379
NEM-ALLERGIÁS ASZTMA				
rs8073903-rs8073069				
	Egyéb asztma	Nem-allergiás asztma		
TG	0,606	0,440	0,512 (0,341-0,769)	0,001
CC	0,274	0,466	2,308 (1,528-3,486)	0,00005
CG	0,120	0,077	0,606 (0,291-1,260)	0,182
SZÉRUM EOZINOFIL SZINT				
rs8073903-rs8073069-rs17878467-rs9904341-rs1508147				
	Alacsony	Magas		
TGCCG	0,335	0,207	0,508 (0,296-0,871)	0,015
TGCGG	0,235	0,318	1,491 (0,901-2,466)	0,1017
CCCGA	0,252	0,228	0,893 (0,524-1,523)	0,6219
CGTGA	0,087	0,148	1,830 (0,914-3,665)	0,0846

A félkövér karakterek a Bonferroni-korrekció szerinti szignifikáns eredményeket jelölik.

Rövidítések: OR: odds ratio, 95% CI: 95%-os konfidencia intervallum

5 Megbeszélés

Munkánk célja az intézetben létrehozott, folyamatosan bővülő asztma biobank vizsgálata volt a rendelkezésre álló klinikai adatok kiértékelésével. A *CCR5Δ32*, *RANTES* -403G/A polimorfizmusok és a *Mycoplasma pneumoniae* fertőzöttség, valamint az *NFE2L2* és *KEAPI* gének egy pontos nukleotid polimorfizmusai és a légköri nitrogén-dioxid koncentráció között fennálló, az asztma kialakulását, patomechanizmusát befolyásoló gén-környezet kölcsönhatásokat interakciós modellben vizsgáltuk. Jelölt régió és jelölt gén asszociációs vizsgálatokkal tanulmányoztuk az asztmára és annak endofenotípusaira való hajlam genetikai hátterét. A kandidáns gének expressziójának mértékét allergizált egér modellben, valamint humán asztmás és egészséges személyektől származó indukált köpet mintákban hasonlítottuk össze.

5.1 Vizsgálatok a bakteriális fertőzés - genetikai háttér - asztma hajlam háromszögében

A *CCR5* és *RANTES* gének gyakori polimorfizmusainak vizsgálata során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ezen genetikai variációk vajon mennyiben befolyásolják az asztma kockázatát, és jelenlétük hatással van-e a *M. pneumoniae* fertőzés és az asztma közötti kapcsolat kialakulására. A *M. pneumoniae* és az asztma közötti asszociációról már korábbi tanulmányokban is beszámoltak, melyet jelen munkánkkal is megerősítettünk. A fertőzés és az asztma közötti ok-okozati kapcsolat iránya azonban a mai napig nem tisztázott, hiszen egyaránt lehetséges az is, hogy a légutak gyulladása kedvez a MP fertőzésnek, valamint az is, hogy az infekció valamilyen módon befolyásolja az asztma patomechanizmusát.

Habár az epidemiológiai vizsgálatok bizonyos populációkban magas *Mycoplasma pneumoniae* fertőzés rátát mutattak ki, úgy tűnik, hogy egyes emberek fogékonyabbak a MP fertőzésre, mint mások. Számos adat támasztja alá, hogy a genetikai faktoroknak nagy szerepe van a fertőzésre való eltérő fogékonyságban, és befolyásolják az alsó légutak infekcióra adott válaszkészségét is. Eredményeink alapján elmondható, hogy a *CCR5Δ32* variáns allél hordozása megnöveli a krónikus MP fertőzésre való hajlamot, azonban a MP fertőzött gyermekekben az allél jelenléte csökkenti az asztma

kialakulásának kockázatát. A CCR5 Δ 32, illetve a RANTES -403A allélek és az asztma kialakulása között az általunk vizsgált populációban nem találtunk kapcsolatot.

Jól ismert, hogy a gazdaszervezet intracelluláris patogénekkal szemben kialakuló védelmi reakciója a hatékony sejtes immunválaszra épül, melynek lefolyásában jelentős szerepet játszanak a sejtek által kibocsátott szolubilis fehérjék (pl. citokinek és kemokinek). Az alsó légutak *M. pneumoniae* fertőzésének hatására makrofágok és T limfociták aktiválódnak, és kemotaktikus szignálokat követve a fertőzés helyére vándorolnak. A makrofágok és a T-sejtek is hordozzák a CCR5 molekulát, ami alapján feltételezhető, hogy a molekula szerepet játszik a leukocitáknak a fertőzött egyének tüdejébe történő migrációjában és ezáltal a patogén eliminálásában. Ezek alapján elképzelhető, hogy a CCR5 hibás változatának hordozása a *M. pneumoniae* elleni védelem csökkent hatásfokával párosul, ami a MP fertőzött személyeket fogékonyabbá teszi a krónikus MP kialakulására. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint CCR5 génkiütött (KO) egerekben megemelkedik az IFN- γ termelés, ami Th1-dominanciájú immunválaszra utal [133]. Ennek alapján a CCR5 receptor génjének deléciós mutációja, ami a receptor funkcióképességének elvesztéséhez vezet, jótékony, védő hatással bírhat az asztmával vagy más atópiás megbetegedéssel szemben. A CCR5 funkcióvesztésének együttjárása a fertőzésekkel szembeni védelem gyengülésével új megvilágításba helyezi a HIV/AIDS, vagy egyes gyulladásos megbetegedések (pl. rheumatoid arthritis) kezelésére fejlesztett CCR5-blokkolók használatát.

5.2 *NFE2L2* és *KEAPI* gének polimorfizmusainak asztmára hajlamosító hatásának vizsgálata a légszennyezettség tükrében

Az *NFE2L2* és *KEAPI* gének az oxidatív stresszválaszban központi mediátor szerepet töltenek be. Promóter régióikban elhelyezkedő polimorfizmusaik asszociációját az akut tüdőkárosodás és a Parkinson-kór kialakulásával már korábban leírták [134, 135].

Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a gének egyes regulátor polimorfizmusai szerepet játszanak-e az asztmára való hajlam kialakulásában, és befolyásolják-e a levegő szennyezettsége és az asztma kialakulása közötti lehetséges interakciókat.

Míthogy az *NFE2L2* és *KEAPI* gének vizsgált SNP-inek eloszlása nem tért el az asztmás és kontroll csoportok között, nem tartjuk valószínűnek, hogy ezen SNP-k meghatározó szerepet töltenek be az asztmára való hajlam kialakulásában. Amikor azonban a különböző asztma endofenotípusok és az SNP-k közti asszociációkat tanulmányoztuk, azt találtuk, hogy az *NFE2L2* gén regulátor régióiban elhelyezkedő rs2588882 és rs6721961 SNP-k variáns alléljait hordozó genotípusok ritkábbak az infekciós asztmások körében, ami ezen genotípusok infekciós-asztmával szembeni lehetséges védő hatására utal.

A genetikai variációk és a légszennyezettség interakciójának az asztma kialakulásában betöltött hatását vizsgálva azt találtuk, hogy az említett két polimorfizmus genotípus eloszlása szignifikánsan eltér az alacsony, illetve magas légszennyezettségű területeken élő asztmások között. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az *NFE2L2* genotípusai, a légszennyezettség mértéke és az infekció-indukált asztma exacerbációk között komplex kölcsönhatások húzódnak meg.

Bár egyre bővül azon tanulmányok sora, melyek az rs6721961 promóter SNP (-617 G/T) és az *NFE2L2* gén transzkripciós aktivitása közötti kapcsolatot kutatja, a polimorfizmus pontos, in vivo funkciója a mai napig tisztázatlan. A kérdéssel foglalkozó publikációk megismerése azonban közelebb vihet bennünket az eredményeink megértéséhez.

Marzec és kollégái tranziens transzfekciós esszéekben kimutatták, hogy az rs6721961 gyakori allélját hordozó promóter konstrukciók nagyobb luciferáz aktivitást mutatnak az SNP, és egy közeli, a -651-es nukleotidpozícióban elhelyezkedő SNP (rs6706649) ritka allélját hordozó konstrukciókhoz képest [134]. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az rs6721961 és rs6706649 SNP-k genotípusai befolyásolják az *NFE2L2* expressziós szintjét.

Ismert, hogy az *NFE2L2* az antioxidáns és II-es fázisú detoxifikáló enzimek génjeinek transzkripcióját a gének „upstream” szabályozó régióiban található ún. antioxidant response element (ARE)-hez történő kapcsolódás útján szabályozza. Érdekes módon, az *NFE2L2* promóterének proximális régiója szintén hordoz két ARE-szerű elemet, ami a gén transzkripciójának önszabályozó mechanizmusát veti fel [136]. Habár egyes vizsgálatok szerint több ARE területre van szükség a maximális transzkripciós aktivitás eléréséhez [137], az *NFE2L2* autoregulatorikus hatása

hozzájárulhat a fehérje folyamatos sejtmagi jelenlétéhez. Abból kiindulva, hogy az rs6721961 SNP a promóter régió említett ARE-szerű elemeinek egyikében helyezkedik el, Marzec és munkatársai megvizsgálták a polimorfizmus hatását az NFE2L2 fehérje és gén promóterét tartalmazó DNS terület között létrejövő kötés kialakulására [134]. Az előzetes elvárásoknak megfelelően azt találták, hogy az NFE2L2 kevésbé kötődik az olyan ARE-szerű szekvenciákhoz, melyek az rs6721961 SNP ritka allélját (T) hordozzák, és ezáltal kevésbé emeli meg a saját transzkripció aktivitását.

Az eddigieket figyelembe véve azt feltételezhetnénk, hogy az rs6721961 ritka alléljának hordozása, az antioxidáns rendszer hatékonyságát csökkentve, megnöveli az asztmára való hajlamot. Továbbá, mivel az Nfe2l2-deficiens egerek sokkal fogékonyabbnak bizonyulnak a oxidatív stresszt követő bakteriális infekcióra [138], elképzelhető, hogy az rs6721961 ritka alléljának hordozásával összefüggő alacsonyabb NFE2L2 expressziós szint hozzájárul az infekció-indukált exacerbációk megjelenéséhez.

Az általunk vizsgált populációban azonban a várttal ellentétes eredményeket kaptunk, hiszen az infekció-indukált exacerbációk nem a ritka, hanem az SNP gyakori allélját hordozók körében fordult elő nagyobb mértékben. Elképzelhető, hogy az rs6721961 SNP ritka alléljának az infekciós exacerbációk kialakulásában feltételezett védő szerepét és az allél hordozásából eredő csökkent génexpressziót más, általunk nem vizsgált polimorfizmusok, vagy az antioxidáns védelmi rendszerben résztvevő egyéb gének (pl. *KEAPI*) kompenzálják.

Az a megfigyelésünk, miszerint az NFE2L2 némely SNP-jének variáns allélja nagyobb gyakorisággal van jelen azokban az asztmás gyermekekben, akik relatíve kevésbé szennyezett területen élnek, jól illeszkedik a Li és társai által 2003-ban leírt ún. hierarchikus oxidatív stressz modellhez [139]. A modell szerint nagymértékű pro-oxidatív stimulus hatására a sejtekben olyan jelátviteli utak aktiválódnak, melyek gyulladáshoz vezető mediátorok expressziójához vezetnek. Ha elfogadjuk, hogy a hosszú távon jelenlévő magas NO₂ koncentráció egy adott területen a levegő relatív rossz minőségét jelzi, akkor elképzelhető, hogy a szennyező ágensek elnyújtott és nagymértékű expozíciója gyulladáshoz vezető folyamatokat indít el, s ezáltal az egyénekben megfigyelhető, eltérő genetikai hajlam oka az ezen folyamatokban részt vevő gének polimorfizmusában, mintsem az NFE2L2-útvonalban keresendő.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy az ehhez hasonló ellentmondásos adatok igen gyakoriak a környezet-genetikai kutatások palettáján. Az egyik legjelentősebb ezek közül a *CD14* polimorfizmusai és a bakteriális endotoxin szint közötti interakció szerepe az allergia és asztma kialakulásának kockázatában, melyet már részletesen bemutatottam a bevezetőben.

Arra a kérdésre, hogy az rs2588882 SNP miként befolyásolhatja az asztmás folyamatokat, még kevesebb választ találunk a szakirodalomban. Az SNP 3' (downstream) elhelyezkedése felveti a miRNS szabályozás lehetőségét, de erre egyelőre nem találtunk bizonyítékot.

5.3 A 11q13 és 14q22 genomterületek parciális genomszűrése során kapott eredmények megbeszélése

Munkánk során a 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-22.3 genomrégiók és az asztma, illetve annak egyes endofenotípusainak asszociációs elemzését végeztük el. Összesen 102 SNP-t genotipizáltunk, melyek 57 gént reprezentáltak az érintett területeken. Korábbi publikációkban már számos itt lokalizálódó gént, illetve polimorfizmust hoztak összefüggésbe az asztmával, de ezek egyikét sem erősítették meg későbbi GWAS elemzések során, bár a *PTGDR* és *GSTPI* gének asztmában betöltött szerepét több jelölt gén asszociációs vizsgálatban is igazolták [140].

Munkánk során az SNP-k allél- és genotípus eloszlását frekventista és bayesi statisztikai módszerrel is elemeztük. A BN-BMLA módszert használva megerősítettük a már korábban publikált asszociációkat az asztma és a *PTGDR*, *PTGER2* valamint az *MS4A2* gének között. A frekventista módszert alkalmazva ugyanezt csak a *PTGDR* gén esetében értük el, ami feltehetőleg annak köszönhető, hogy a három gén közül csak ez utóbbi befolyásolja közvetlenül az asztma megjelenését. Eredményeink alapján a *PTGER2* polimorfizmusai csak interakcióban vagy közvetve hatnak az asztma kialakulására, és hasonlóképpen, az *MS4A2* E237G variánsa (rs569108) is csak tranzitív módon befolyásolja azt. Ezek a kapcsolatok pedig rejtve maradnak a hagyományos (frekventista) statisztikai elemzések alkalmazásakor, míg a bayes hálós elemzések során elének tárulnak. Ez a jelenség adhat választ arra a kérdésre, hogy miért nem sikerült

korábban már számos, frekventista statisztikai módszert használó genetikai vizsgálatnak megerősítenie az *MS4A2* asztmában és más atópiás megbetegedésben betöltött szerepét. A nagy affinitású IgE receptor β alegységét kódoló *MS4A2* gén (korábbi nevén Fc ϵ RI- β) központi szerepet tölt be a hízósejt degranulációban és az IgE mediált allergiás reakcióban. Az rs569108 polimorfizmus, ami az E237G aminosavcserét okozza, konformáció predikációs eljárások szerint a receptor C-terminális részén belül hidrofóbicitás változást idéz elő. A molekula ezen része szomszédos az ún. ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif) motívummal, és befolyásolhatja a receptorból kiinduló intracelluláris jelátvitelt. Az *MS4A2* az atópiás megbetegedések első kandidáns génjei között szerepelt, és már 1996-ban asszociációt írtak le az E237G variáns és a fokozott bőrpróba reakció, valamint a metacholin provokációval kiváltott bronchiális reaktivitás között, egy, az Egyesült Királyságban elvégzett kutatás alapján [141]. Azóta számos populáción vizsgálták a polimorfizmus szerepét az asztma és atópia megjelenésében, de az eredmények rendkívül ellentmondásosnak bizonyultak. Jelen munkánkban nem sikerült alátámasztanunk a közvetlen asszociációt az asztma és az E237G variáns között, ám amikor az IgE és eozinofil szinteket, valamint a rhinitist is célváltozóként kezeltük az asztma mellett (CLI adathalmaz), az E237G tranzitív asszociációját mutattuk ki.

Régóta ismert, hogy a prostaglandin D2 központi szerepet játszik az asztmás légutak fiziológiai változásaiban, a bronchokonstrikció és vazodilatáció kiváltásán, valamint az érpermeabilitás és mucos termelésének fokozásán keresztül. *PTGDR* génkiütött egerekben nem alakul ki légúti hiperreaktivitás ovalbumin indukció hatására, ami arra utal, hogy a receptor fontos szerepet tölt be az asztma patomechanizmusában [142]. A gén variánsai és az asztma közti asszociációt több populáción is kimutatták [143]. Munkánk során, magyar populációt vizsgálva három polimorfizmus (rs17831675, rs17831682, rs803012) esetében igazoltunk direkt vagy tranzitív asszociációt.

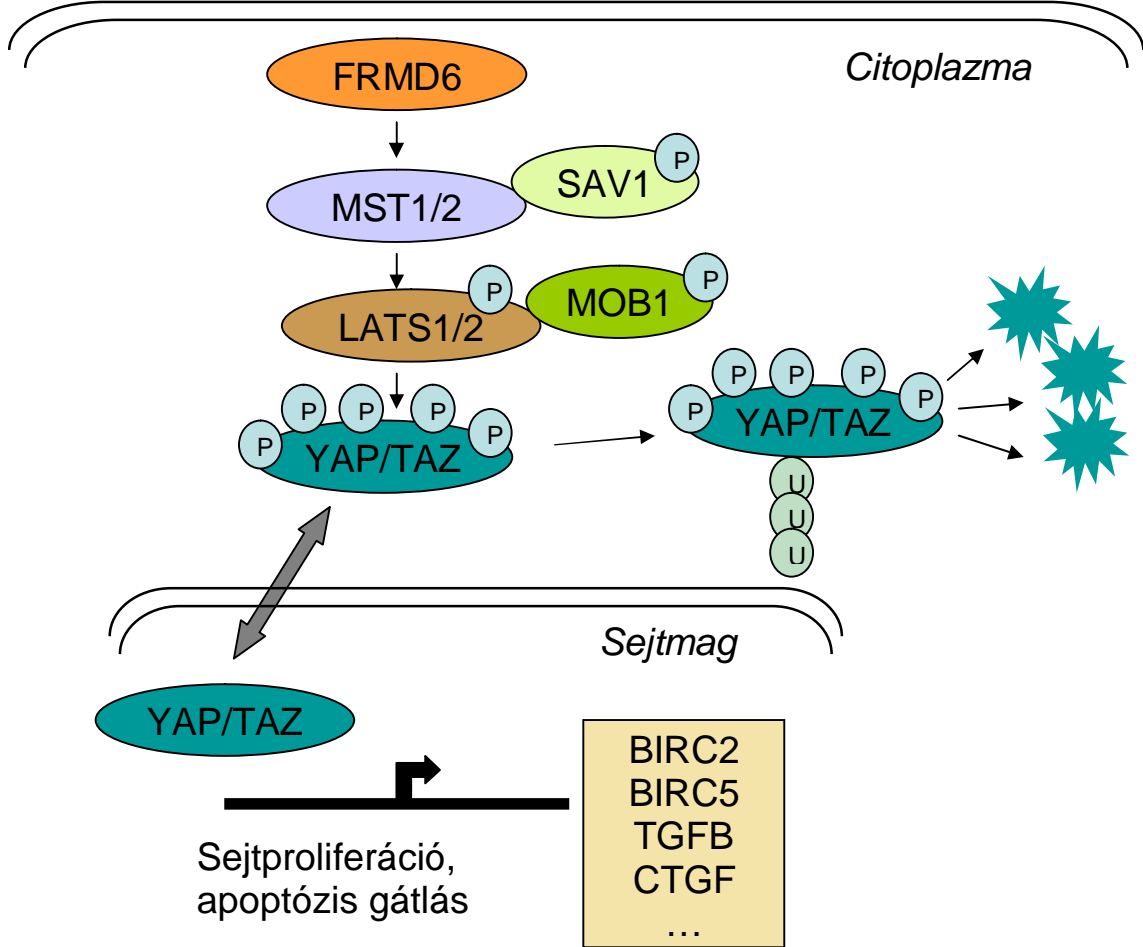
A Prostaglandin E2 gyulladáscsökkentő és bronchoprotektív hatású, gátolja az eozinofilek eotaxin, prostaglandin D2 és C5a által kiváltott kemotaxisát [144]. A *PTGER2* receptor polimorfizmusainak szerepét főként aszpirin-intoleráns asztmában igazolták, de néhány tanulmányban az asztmával mutatott asszociációjukat is leírták [145]. Saját eredményeink alapján, magyar populációban a *PTGER2* polimorfizmusainak genotípus eloszlása nem különbözik az asztmás és kontroll csoport

között, de az SNP-SNP interakciókat vizsgálva azt találtuk, hogy a *PTGER2* polimorfizmusai majdnem minden szignifikáns asszociációt mutató kölcsönhatásban részt vettek. Ez arra utal, hogy a génben lokalizálódó SNP-k önmagukban nem, csak más SNP-vel interakcióban befolyásolják az asztma kockázatát.

Korábbi eredmények replikálásán túlmenően tanulmányunkban új asztma géneket is azonosítottunk a vizsgált területeken. Legjelentősebb eredményünk az asztma és az *FRMD6* (FERM domain containing 6, korábban EX1, vagy willin) kapcsolatának leírása. A gén 5'UTR régiójában elhelyezkedő polimorfizmus (rs3751464) pozitív asszociációját mindkét alkalmazott statisztikai eljárás alkalmazásával igazoltuk. Az SNP ritka alléljának hordozása önmagában és más polimorfizmusokkal interakcióban is megnöveli az asztma kockázatát. Továbbá, az *FRMD6* egyik haplotípusáról szintén kimutattuk, hogy befolyásolja az asztmára való hajlamot. A gén expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult mind allergizált egerek, mind pedig humán asztmások légutaiban a kontroll egyénekhez képest. Bár a molekula pontos funkciója és az asztmában betöltött szerepe egyelőre nem ismert, az alább ismertetett korábbi tanulmányok és saját, itt nem bemutatott eredményeink valószínűsítik, hogy az *FRMD6* génvariánsai a Hippo jelátviteli útvonal befolyásolásán keresztül hatnak az asztma kialakulására.

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a Hippo szignáltranszdukciós út az egyik legjelentősebb konzervált szignalkaszád, ami a sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában, a szervek méretének kontrollálásában, a sejtproliferáció illetve apoptózis irányításában, valamint a tumorigenezisben vesz részt [146, 147]. Egyértelmű, hogy a jelátviteli utat érintő kis eltérések is megváltoztathatják a tüdő normális morfogenezisét, ami a környezeti ártalmakra adott módosult válaszkészséget és asztmára való hajlamot indukálhat. A citoskeletális fehérjéket a plazmamembránhoz horgonyzó FERM (4.1 ezrin, radixin, moesin) doménnel rendelkező *FRMD6* molekula a Hippo szignáltranszdukciós útvonal egyik upstream komponense [148]. Kutatásunk szempontjából érdekes egybeesés, hogy a szignálút egyik célmolekulája az antiapoptotikus *BIRC5* (survivin) gén [149], melynek humán asztmás és allergizált eger tüdőben mért emelkedett expresszója – mely a dolgozat 4.4.1 pontjában került bemutatásra - alátámasztja a Hippo jelátviteli út asztmában betöltött szerepét.

A Hippo jelátviteli utat a 6. ábrán mutatom be.



6. ábra: A Hippo szignálút sematikus rajza

Látható, hogy a zavartalanul működő szignálfolyamat során az MST1/2 (mammalian STE20-like protein kinase 1/2), és LATS1/2 (large tumor suppressor, homolog 1/2) foszforilációjának eredményeképpen a YAP1 (yes-associated protein 1) és a TAZ (tafazzin) molekulák a citoplazmában foszforilálódnak és degradálódnak, és nem képesek a sejtmagban olyan transzkripciós faktorokhoz kötődni, melyek a sejtproliferációért vagy apoptózis gátlásért felelős targetgének, pl. *CTGF* (connective tissue growth factor), *TGFB* (transforming growth factor-beta) vagy a *BIRC5* átíródását indítanák el. Ezáltal a Hippo szignálkaskád aktivációja (például nagy sejtsűrűség esetén) a sejtsztódás gátlását, valamint apoptózis indukálását eredményezi. Feltételezhetjük, hogy az asztma progressziója során a Hippo szignálutat eddig nem

ismert mechanizmusok gátolják, ami során a transzkripciós faktorokhoz kötődni képes YAP1 és TAZ molekulák mennyisége megnő, és ennek következtében a targetmolekulák mRNS szintje is emelkedik. Hipotézisünk alátámasztása érdekében a dolgozatban már ismertetett indukált köpet mintabankunkban megvizsgáltuk a jelátviteli út főbb komponenseinek génextpressziójának mértékét, és a YAP1 molekula esetében az asztmás személyek köpetmintáiban szignifikánsan magasabb mRNS szintet detektáltunk az egészséges személyek mintáihoz képest.

Jogosan merül fel a kérdés, hogy korábbi GWAS vizsgálatok során miért nem azonosították az *FRMD6*-ot, mint kandidáns asztma gént? Ennek valószínűleg az az oka, hogy ezeket a tanulmányok csak egy SNP-t genotipizáltak a génen belül (rs7140150), mely nem áll LD-ben az általunk elemzett rs3751464-gyel. Egyes szerzők szerint a GWAS vizsgálatok lefedettsége nem elégséges a jelölt asztma gének kimerítő feltérképezéséhez [140], amit ezen eredményünk is alátámaszt. Ráadásul ezeket a GWAS-okat a miénktől eltérő populációkban végezték el, ami jelentősen korlátozza az eredmények összehasonlíthatóságát.

Az rs3751464 az *FRMD6* 5'UTR szakaszában helyezkedik el a 14q22.1 kromoszómaregióban, 52117892 bázispárnál. *In silico* módszerrel sajnos nem találtunk adatot arra vonatkozóan, hogy az SNP, vagy az azzal LD-ben álló más SNP-k miként befolyásolják a gén funkcióját, vagy a betegséget, ugyanis nyilvános adatbázisokban nincsen elérhető információ arról, hogy ezen SNP-k vagy haplotípusaik bármilyen szabályozó elem kötéséért lennének felelősek.

További jelentős eredményünk az *AHNAK* (desmoyokin) génben lokalizálódó rs11231128 SNP és az asztma indirekt, ám igen erős asszociációjának kimutatása. A polimorfizmus az allergiás rhinitis-szel interakcióban befolyásolja az asztmára való hajlamot. Az *AHNAK* fehérje számos sejtféleségben megtalálható. Az epitél sejtekben főképp a sejtmembránon lokalizálódik, és feltehetőleg a 'tight junction' kialakításban van szerepe. Többet igazolták, hogy a helytelenül szerveződő 'tight junction' struktúrák elégtelenül látják el barrier funkciójukat, ami megnövekedett asztma hajlamhoz vezet [150-152]. A vizsgálatunk során asszociációt mutató rs11231128 egy ún. missense SNP, ami a fehérje 3724-es pozíciójában szerin/prolin aminosav cserét okoz, s ezzel befolyásolhatja annak 3D szerkezetét. Ráadásul, az Ingenuity adatbázis alapján, az *AHNAK* kölcsönhat olyan fehérjékkel, mint a TGFβ1 (transforming growth factor, beta

1), EGFR (epidermal growth factor receptor), IL6 és a STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4), melyek jelentős szerepet töltenek be az asztma patomechanizmusában. (Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 9.0 Software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA; www.ingenuity.com)).

Hasonlóképpen, a *TXNDC16* (thioredoxin domain containing 16) gén 3'UTR régiójában lokalizálódó SNP (rs1565970) kapcsán is azt találtuk, hogy csak fennálló rhinitis esetében befolyásolja az asztma kockázatot. A gén, illetve fehérje funkciójáról azonban nem áll rendelkezésre információ a nyilvános adatbázisokban.

Erős, direkt asszociációt találtunk a *PRPF19* gén rs7928208 SNP-je és az asztma között, ráadásul a polimorfizmus asszociációt mutatott az asztma 6 éves kor alatti megjelenésével is. Habár a molekula asztmában betöltött szerepe nem ismert, a *PRPF19* gén terméke, hasonlóan más, korábban leírt asztma génhez (pl. *RAD50*) a DNS javításban vesz részt, így elképzelhető hogy a fehérje megváltozott funkciója befolyásolja a sejtek stresszválaszát [153-155].

5.4 A *BIRC5* gén szerepe az asztma illetve endofenotípusainak megjelenésében

A *BIRC5* asztmás, allergiás folyamatokban betöltött potenciális szerepére egy korábban létrehozott allergizált egér modell génexpressziós eredményei és irodalmi adatok összecsengése hívta fel a figyelmünket. Miután az egér tüdőszöveten végzett microarray vizsgálatunk eredményét real-time PCR technikával alátámasztottuk, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy található-e genetikai (SNP-szintű), illetve az egérmodellben megfigyelthez hasonló génexpressziós különbség asztmás és egészséges személyek között is?

Munkánkban a *BIRC5* gén szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusokat vizsgálva azt találtuk, hogy az 5' szabályozó területen elhelyezkedő rs8073903 és rs8073069 SNP-k allél- és genotípusfrekvenciája eltér a beteg és a kontroll csoport között. Ez a különbség még kifejezettebbnek bizonyult, ha csak a nőket vizsgáltuk, ami egy nem-által meghatározott folyamat lehetőségét veti fel. Az asztmás csoportot endofenotípusok szerint tovább osztályozva azt tapasztaltuk hogy ezen polimorfizmusok asztmára hajlamosító hatása még markánsabb a nem-allergiás asztmás alcsoporton belül. Mivel az eozinofília sokkal inkább jellemzi a nem-allergiás asztma fenotípust mint az allergiásat, eredményeink megfeleltek az előzetes várakozásainknak. Ezen túlmenően, korrelációt mutattunk ki az általunk vizsgált 5' UTR SNP genotípusai és a szérum eozinofil szintek között. A genotípus vizsgálatokból származó eredményeinket a haplotípus-elemzések eredményei is megerősítették.

A *BIRC5* génjében, illetve szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok szerepét eddig leginkább daganatos betegekből származó mintákon vizsgálták. Yang és munkatársai nyelőcső daganatos betegeken végzett kutatásaik eredményeként írták le, hogy a -625 G/C (rs8073069) polimorfizmus ritka alléljának jelenléte a *BIRC5* expressziójának emelkedett szintjét eredményezi [156]. Ez alapján feltételezhetjük, hogy az SNP ritka allélját hordozók körében megfigyelt, asztmára - pontosabban a nem-allergiás asztma endofenotípusra - való megnövekedett hajlam az SNP ritka alléljának *BIRC5* expresszióra gyakorolt hatásának tulajdonítható. Egyértelmű kijelentést azonban a kérdésre irányuló részletesebb, asztmás betegcsoporton végzett vizsgálatok nélkül nem tehetünk.

A másik, elemzéseink alapján asztmára, illetve a nem-allergiás asztma endofenotípusra nagymértékben hajlamosító polimorfizmus (-644C/T, rs8073903) és egyéb patológiás folyamatok közötti asszociációra az irodalomban jelenleg nem található adat.

A géntől 3' irányban elhelyezkedő rs1508147 kapcsán egy nemrég publikált, ún. teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálat (GWAS) során Dixon és munkatársai azt találták, hogy ennek a polimorfizmusnak van a legerősebb hatása a *BIRC5* expressziójára (LOD érték: 19.89) [157]. Arra a kérdésre, hogy a polimorfizmus ritka allélja (A) miként befolyásolja a génexpressziót, adatok hiányában csak feltételezésekkel válaszolhatunk. Az SNP 3' elhelyezkedése felveti a miRNS szabályozás módosításának lehetőségét (új miRNS kötőhelyek létrehozásával vagy régiók tönkrétével), de a jelenleg rendelkezésünkre álló miRNS kötőhely prediktáló szoftverek segítségével ezt a hipotézist eddig nem tudtuk megerősíteni. Érdekes azt is megemlíteni, hogy a HapMap adatai alapján (release #27, NCBI Build 36), az rs1508147 nagyon erős kapcsoltságban ($D' = 1$, $r^2 = 1$) van 11 további SNP-vel, melyek szintén felelősek lehetnek a megfigyelt hatásért.

Mivel egyre több irodalmi adat támasztja alá a *BIRC5* szerepét az eozinofil sejtek túlélésében, megvizsgáltuk, hogy van-e kimutatható összefüggés a szérumban eozinofil és IgE szintek, valamint az általunk vizsgált SNP-k genotípusai között.

Elemzéseink során azt találtuk, hogy azok a vizsgálati személyek, akik homozigóták az rs9904341 (-31G/C) vad-típusú alléljára (azaz a -31GG genotípust hordozzák), magasabb szérumban eozinofil szinttel rendelkeznek, mint azok a személyek, akik a ritka allélt is hordozzák genomjukban.

Az rs9904341 (-31G/C) a legtöbbit tanulmányozott *BIRC5* polimorfizmus. A gén promóterének CDE/CHR régiójában található, ezáltal befolyással van a gén sejtciklusfüggő transzkripciójára. Számos tanulmány foglalkozik a polimorfizmus szerepének vizsgálatával különböző daganat-típusokban, azonban a közölt eredmények meglehetősen ellentmondásosak [158-160]. Egy nemrég publikált meta-analízis eredményei alapján Sristava és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a polimorfizmus ritka, -31CC genotípusa csak az ázsiai populációkban asszociál megnövekedett daganat-képző hajlammal [161].

A *BIRC5* gén szabályozó régióiban elhelyezkedő SNP-k vizsgálatából származó ellentmondásos eredmények arra utalnak, hogy a gén expressziójának szabályozásában más genetikai/epigenetikai módosító tényezők is szerepet játszanak. Erre szolgál példával Boidot és munkatársai közleménye, akik mellrákos betegekben a *BIRC5* emelkedett mértékű expresszióját allélvesztéssel (LOH = loss of heterozigosity) illetve megnövekedett demetiláz expresszióval hozták összefüggésbe [162].

Az asszociációs vizsgálatokat követően mRNA expressziós analízist végeztünk indukált köpet mintákban és azt találtuk, hogy a *BIRC5* mRNA szintje szignifikánsan magasabb az asztmás betegek légútjaiban, összehasonlítva az egészséges kontroll személyek légútjaiban mért értékekkel. Méréseink alapján a köpet eozinofil szint korrelációt mutatott a *BIRC5* mRNA szintjével, az asztma kontroll teszt értékekkel, az asztma súlyossági fokával, valamint a kilélegzett nitrogén-monoxid értékekkel. Nem találtunk azonban összefüggést a belélegzett kortikoszteroid dózis és a köpet eozinofil szint között.

Az általunk talált pozitív korreláció a *BIRC5* mRNA szintje és a köpet eozinofil sejtaránya között a molekula apoptózist gátló szerepét leíró tanulmányokat támasztja alá [96]. A méréseink során kapott egyéb eredményeink nagy része megfelel a korábbi irodalmi adatoknak [88, 163-165]. A belélegzett kortikoszteroid dózis és a köpet eozinofil szint közötti, más tanulmányok során kimutatott összefüggés hiányát magyarázhatja az indukált köpet méréseink során alkalmazott viszonylag kis mintaszám. Emellett, mivel az ICS adása és a köpet indukció között eltelt idő különbözött az egyes vizsgálati személyeknél, nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy ezen időintervallumok heterogenitása befolyásolta az ICS dózissal kapcsolatos eredményeinket.

6 Következtetések

A gyermekkori asztma genetikai hátterét vizsgáló kutatásaink során az alábbi eredményekre jutottunk.

Genotípus-környezet interakciós vizsgálataink első részében kimutattuk, hogy a CCR5 kemokinreceptor deléciós formájának hordozása megnöveli a krónikus *Mycoplasma pneumoniae* fertőzésre való hajlamot, azonban a *Mycoplasma p.* ellenes IgG pozitív gyermekekben a CCR5Δ32 allél jelenléte csökkenti az asztma kialakulásának kockázatát.

Megerősítettük a *Mycoplasma p.* fertőzés és az asztma kialakulása között fennálló asszociációt, melyről már korábbi tanulmányokban beszámoltak.

A CCR5Δ32, illetve a RANTES -403A allélek hordozása és az asztma megjelenése között az általunk vizsgált populációban nem találtunk direkt kapcsolatot.

Az oxidatív stresszválasz szabályozásában központi szerepet betöltő *NFE2L2* és *KEAP1* gének vizsgált SNP-inek eloszlásának tekintetében nem találtunk különbséget az asztmás és kontroll csoportok között.

Az *NFE2L2* regulátor régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok vizsgálatakor azt találtuk, hogy az rs2588882 G és rs6721961 T alléleit hordozó genotípusok ritkábban fordulnak elő az infekciós asztmások körében, mint más asztma endofenotípusú csoportoknál, ami ezen allélek infekciós asztmával szembeni lehetséges védő hatására utal.

A genetikai variánsok és a levegő NO₂ koncentráció együttes szerepét tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy az alacsonyabb légszennyezettségű régiókban élő asztmás gyermekek között az rs2588882 G, valamint az rs6721961 T (ritka) allélek gyakrabban fordulnak elő.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *NFE2L2* gén polimorfizmusai befolyásolhatják az infekció által kiváltott asztma kockázatát, és gén-környezet kölcsönhatásban befolyásolhatják a környezeti (légszennyezettségi) faktorok hatását az asztma kialakulására.

A 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-22.3 genomrégiók vizsgálata során az asztma és az *FRMD6* gén egyik 5'UTR polimorfizmusának (rs3751464) pozitív asszociációját frekventista és bayesi statisztikai eljárás alkalmazásával is igazoltuk. Kimutattuk, hogy az SNP ritka allélja (T) önmagában, más polimorfizmusokkal interakcióban és haplotípus szinten is megnöveli az asztma kockázatát.

Az *FRMD6* gén expressziós szintjét alacsonyabbnak találtuk OVA-indukált egér asztma modellben az allergizálást követően, és humán asztmások légutaiban a kontroll egyénekhez képest.

Kimutattuk, hogy az *AHNAK* génben lokalizálódó rs11231128 és a *TXNDC16* gén 3'UTR régiójában elhelyezkedő rs1565970 polimorfizmusok indirekt módon, csak fennálló rhinitis esetén befolyásolják az asztma kockázatot.

Erős, direkt asszociációt detektáltunk az asztma és a *PRPF19* gén rs7928208 SNP-jének ritka allélja (G) között, ráadásul a polimorfizmus asszociációt mutatott az asztma 6 éves kor alatti megjelenésével is.

A BN-BMLA módszert használva megerősítettük a már korábban publikált asszociációkat az asztma és a *PTGDR* (rs17831682), *PTGER2* (rs708502 és rs17197), valamint az *MS4A2* gén (E237G, rs569108) variánsai között. Megállapítottuk, hogy ezen gének közül csak a *PTGDR* SNP-je befolyásolja közvetlenül az asztma megjelenését, míg a *PTGER2* polimorfizmusai csak interakcióban vagy közvetve, és az *MS4A2* E237G variánsa tranzitív módon befolyásolja az asztma kialakulását.

Megfigyeléseink igazolják az interakciók és közvetett asszociációk kimutatására is alkalmas bayes hálós elemzések alkalmazásának igényét a komplex etiológiájú kórképek tanulmányozásában.

Egér allergiás asztma modellben detektált eredményeinket megerősítve kimutattuk, hogy az asztmások légutaiban szignifikánsan magasabb az antiapoptotikus hatású *BIRC5* mRNS szintje, mint az egészséges személyek légutaiban.

Megállapítottuk, hogy a *BIRC5* mRNS szintje szignifikáns korrelációt mutat az indukált köpetben jelenlévő eozinofil sejtek arányával. Az eozinofil szint ezen túlmenően korrelációt mutatott az asztma kontroll teszt értékekkel, az asztma súlyossági fokával, valamint a kilélegzett nitrogén-monoxid értékekkel.

A gén regulátor régióban elhelyezkedő polimorfizmusok allél- és genotípus eloszlását vizsgálva az rs8073903 és az rs8073069 SNP-k ritka allélei és az asztma között szignifikáns asszociációt mutattunk ki, mely a nők körében még kifejezettebbnek bizonyult. Az említett SNP-k vad allélei által alkotott haplotípusról (TG) kimutattuk, hogy az szignifikánsan gyakrabban fordul elő az egészségesek körében, mint az asztmások között. Az egyes asztma endofenotípusokat külön elemezve azt találtuk, hogy a fenti SNP-k ritka allélei a nem-allergiás asztmára való fokozott hajlammal asszociálnak szignifikáns mértékben.

Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az rs9904341 és a szérum relatív és abszolút eozinofil szintje között, mely szerint az SNP vad genotípusát (GG) hordozó személyek magasabb szérum eozinofil szinttel rendelkeznek, mint azok, akik a ritka allélt is hordozzák genomjukban.

A fenti eredmények alátámasztják, hogy a BIRC5 molekula fontos komponense a légutak normális működésének és módosulásai hozzájárulhatnak az asztmás fenotípus megjelenéséhez.

7 Összefoglalás

A multifaktoriális betegségek genetikai hátterének feltérképezése többretű genetikai-genomikai vizsgálatokat igényel. Munkánk során a gyermekkori asztma patomechanizmusának pontosabb megértése céljából gén-asszociációs elemzéseket, parciális genomszűrést, valamint gén-környezet interakciós vizsgálatokat végeztünk.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a *CCR5A32* allél hordozása megnöveli a *Mycoplasma pneumoniae* fertőzés kockázatát, viszont a fertőzött személyekben az allél jelenléte csökkent rizikót jelent az asztma kialakulására. Kimutattuk a *Mycoplasma p.* fertőzés és az asztma között fennálló asszociációt.

Az *NFE2L2* génjének szabályozó régiójában elhelyezkedő két polimorfizmus (rs258888 és rs6721961) esetében azt találtuk, hogy genotípusaik inverz asszociációt mutatnak infekciós asztmával. Ezen SNP-k gyakoriságai különböznek az asztmás betegek között, attól függően, hogy azok milyen légszennyezetséggű területen élnek.

A 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-22.3 genomrégiók vizsgálata során az asztma és az *FRMD6* gén egyik 5'UTR SNP-jének (rs3751464) pozitív asszociációját frekventista és bayesi statisztikai eljárás alkalmazásával is igazoltuk. A gén expressziós szintjét szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk OVA-indukált egér asztma modellben az allergizálást követően, és humán asztmások légutaiban a kontroll egyénekhez képest. Erős, közvetlen asszociációt találtunk a *PRPF19* gén rs7928208 SNP-jének ritka allélja és az asztma, valamint az asztma 6 éves kor alatti megjelenése között. Kimutattuk, hogy az *AHNAK* (rs11231128) és a *TXNDC16* (rs1565970) gének polimorfizmusai közvetetten, csak fennálló rhinitis esetén befolyásolják az asztma kockázatát. A BN-BMLA módszer alkalmazásával asszociációt találtunk az asztma és a *PTGDR* (rs17831682), *PTGER2* (rs708502 és rs17197), valamint az *MS4A2* gén (E237G, rs569108) variánsai között, melyek közül csak a *PTGDR* SNP-je befolyásolja közvetlenül az asztma megjelenését.

Megállapítottuk, hogy a *BIRC5* gén expressziós szintje szignifikánsan magasabb az asztmások légutaiban az egészséges személyek légutaival összevetve. Kimutattuk, hogy a molekula mRNS szintje, valamint az rs9904341 SNP vad genotípusa szignifikáns korrelációt mutat az indukált köpetben jelenlévő eozinofil sejtek arányával. Szignifikáns asszociációt detektáltunk az rs8073903 és rs8073069 SNP-k valamint az asztma, azon belül pedig a nem-allergiás asztma endofenotípus között.

8 Summary

Revealing the genetic background of multifactorial diseases requires manifold genetic and genomic studies. In our work, to understand more precisely the pathomechanism of childhood asthma, we carried out gene association analyses, partial genome screening and gene-environment interaction studies.

We found that carrying the deleted allele of *CCR5* gene (*CCR5*Δ32) increases the risk of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) infection, however in MP infected people the presence of the allele decreases the risk of asthma development. We detected association between *Mycoplasma p.* infection and asthma. When studying *NFE2L2*, we detected that two polymorphisms (rs258888 and rs6721961) were inversely associated with susceptibility to infection-induced asthma. Also, we found remarkable differences in the genotype distributions of these polymorphisms between distinctly polluted regions. As the result of the partial genome screening conducted on the 11q12.2-q13.1 and 14q22.1-22.3 genome regions we found strong association between an *FRMD6* gene polymorphism (rs3751464) and asthma, which was verified by both frequentist and bayesian statistical approaches. The expression level of *FRMD6* was found to be significantly decreased in OVA-induced mouse model of asthma after allergization and it was significantly lower in the lungs of asthma patients compared to those of healthy subjects. Strong and direct association was found between rs7928208 in the *PRPF19* gene and asthma and this SNP was also associated with asthma development before 6 years of age. We showed that rs11231128 in the *AHNAK* gene and rs1565970 in the *TXNDC16* gene influenced asthma risk in interaction with rhinitis. Using the BN-BMLA method we found different types of associations between SNPs in *PTGDR* (rs17831682), *PTGER2* (rs708502 and rs17197), *MS4A2* (E237G, rs569108) and asthma. We found the expression level of the anti-apoptotic *BIRC5* gene significantly higher in the airways of asthma patients than of healthy controls. The *BIRC5* mRNA level and also the wide type genotype of rs9904341 were significantly correlated with the eosinophil ratio in induced sputum. We detected significant associations between rs8073903 and rs8073069 SNPs and asthma, especially in non-allergic asthma.

9 Irodalomjegyzék

1. New NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma. (1997) National Heart, Lung and Blood Institute. *Lippincott Health Promot Lett*, 2: 1, 8-9.
2. Johanson JF. (2001) Critical review of the epidemiology of gastroesophageal reflux disease with specific comparisons to asthma and breast cancer. *Am J Gastroenterol*, 96: S19-21.
3. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. (1998) Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 4-9.
4. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. (1989) Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*, 140: 1745-1753.
5. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST. (2011) WAO White book on allergy.
6. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. (2012) Allergic diseases and asthma: a major global health concern. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12: 39-41.
7. Zsigmond G, Novák Z, Berényi K. (2006) Gyermekkori allergiás betegségek nemzetközi epidemiológiai felmérése – az ISAAC-vizsgálat Magyarországon. *Gyermekorvos Továbbképzés*, 5: 67-72.
8. Palmer LJ, Cookson WO. (2000) Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res*, 10: 1280-1287.
9. Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutius E, Wahn U. (2000) Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Multicentre Allergy Study Group. *Lancet*, 356: 1392-1397.
10. Cullinan P, MacNeill SJ, Harris JM, Moffat S, White C, Mills P, Newman Taylor AJ. (2004) Early allergen exposure, skin prick responses, and atopic wheeze at age 5 in English children: a cohort study. *Thorax*, 59: 855-861.
11. Peden DB. (2005) The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J Allergy Clin Immunol*, 115: 213-219; quiz 220.
12. Ellwood P, Asher MI, Bjorksten B, Burr M, Pearce N, Robertson CF. (2001) Diet and asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema symptom prevalence: an ecological analysis of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) data. ISAAC Phase One Study Group. *Eur Respir J*, 17: 436-443.
13. Bjorksten B. (2004) Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer Semin Immunopathol*, 25: 257-270.
14. Braback L, Forsberg B. (2009) Does traffic exhaust contribute to the development of asthma and allergic sensitization in children: findings from recent cohort studies. *Environ Health*, 8: 17.
15. Poynter ME, Persinger RL, Irvin CG, Butnor KJ, van Hirtum H, Blay W, Heintz NH, Robbins J, Hemenway D, Taatjes DJ, Janssen-Heininger Y. (2006) Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290: L144-152.

16. Linaker CH, Coggon D, Holgate ST, Clough J, Josephs L, Chauhan AJ, Inskip HM. (2000) Personal exposure to nitrogen dioxide and risk of airflow obstruction in asthmatic children with upper respiratory infection. *Thorax*, 55: 930-933.
17. Ciencewicki J, Jaspers I. (2007) Air pollution and respiratory viral infection. *Inhal Toxicol*, 19: 1135-1146.
18. Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW. (2003) Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 23: 8786-8794.
19. Kim J, Cha YN, Surh YJ. (2010) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res*, 690: 12-23.
20. Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tuder RM, Georas SN, Biswal S. (2005) Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med*, 202: 47-59.
21. Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, Morishima Y, Hegab AE, Homma S, Nomura A, Sakamoto T, Shimura M, Yoshida A, Yamamoto M, Sekizawa K. (2005) Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes Cells*, 10: 1113-1125.
22. Holroyd KJ, Eleff SM, Zhang LY, Jakab GJ, Kleeberger SR. (1997) Genetic modeling of susceptibility to nitrogen dioxide-induced lung injury in mice. *Am J Physiol*, 273: L595-602.
23. Minelli C, Wei I, Sagoo G, Jarvis D, Shaheen S, Burney P. (2011) Interactive effects of antioxidant genes and air pollution on respiratory function and airway disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 173: 603-620.
24. Zhang LY, Levitt RC, Kleeberger SR. (1995) Differential susceptibility to ozone-induced airways hyperreactivity in inbred strains of mice. *Exp Lung Res*, 21: 503-518.
25. Melen E, Nyberg F, Lindgren CM, Berglind N, Zucchelli M, Nordling E, Hallberg J, Svartengren M, Morgenstern R, Kere J, Bellander T, Wickman M, Pershagen G. (2008) Interactions between glutathione S-transferase P1, tumor necrosis factor, and traffic-related air pollution for development of childhood allergic disease. *Environ Health Perspect*, 116: 1077-1084.
26. Kerkhof M, Postma DS, Brunekreef B, Reijmerink NE, Wijga AH, de Jongste JC, Gehring U, Koppelman GH. (2010) Toll-like receptor 2 and 4 genes influence susceptibility to adverse effects of traffic-related air pollution on childhood asthma. *Thorax*, 65: 690-697.
27. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. (2006) The asthma epidemic. *N Engl J Med*, 355: 2226-2235.
28. Matricardi PM, Bonini S. (2000) Mimicking microbial 'education' of the immune system: a strategy to revert the epidemic trend of atopy and allergic asthma? *Respir Res*, 1: 129-132.
29. Le Souef P. (2000) Infant lung function, bronchial responsiveness and the development of asthma. *Pediatr Allergy Immunol*, 11 Suppl 13: 15-18.
30. Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, Platts-Mills TA, Heymann PW. (1999) Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med*, 159: 785-790.

31. Johnston SL, Martin RJ. (2005) Chlamydomphila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae: a role in asthma pathogenesis? *Am J Respir Crit Care Med*, 172: 1078-1089.
32. Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. (2001) House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 322-328.
33. Michel O, Ginanni R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B, Sergysels R. (1991) Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy*, 21: 441-448.
34. Dahl ME, Dabbagh K, Liggitt D, Kim S, Lewis DB. (2004) Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat Immunol*, 5: 337-343.
35. Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, Vargaftig BB, Russo M. (2003) Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol*, 171: 1001-1008.
36. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. (2002) Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*, 196: 1645-1651.
37. Woo JG, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK. (2003) The -159 C->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 112: 438-444.
38. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleeker ER. (2001) Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 965-969.
39. Simpson A, Martinez FD. (2010) The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clin Exp Allergy*, 40: 209-223.
40. Wold AE. (1998) The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy*, 53: 20-25.
41. Dunnill MS. (1960) The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol*, 13: 27-33.
42. Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. (1999) The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol Today*, 20: 528-533.
43. Bradding P, Walls AF, Holgate ST. (2006) The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117: 1277-1284.
44. Kulka M, Alexopoulou L, Flavell RA, Metcalfe DD. (2004) Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J Allergy Clin Immunol*, 114: 174-182.
45. McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH, Marshall JS. (2003) Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol*, 170: 1625-1629.
46. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*, 109: 1351-1359.
47. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O'Connor B, Barnes PJ, Chung KF. (1998) Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce

- macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 256-262.
48. Tang C, Ward C, Reid D, Bish R, O'Byrne P M, Walters EH. (2001) Normally suppressing CD40 coregulatory signals delivered by airway macrophages to TH2 lymphocytes are defective in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 107: 863-870.
 49. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. (2000) Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest*, 106: 551-559.
 50. Yukawa T, Read RC, Kroegel C, Rutman A, Chung KF, Wilson R, Cole PJ, Barnes PJ. (1990) The effects of activated eosinophils and neutrophils on guinea pig airway epithelium in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2: 341-353.
 51. Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. (2000) Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res*, 1: 54-61.
 52. Park CS, Choi YS, Ki SY, Moon SH, Jeong SW, Uh ST, Kim YH. (1998) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airways. *Eur Respir J*, 12: 872-878.
 53. Simon HU. (2001) Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. *Immunol Rev*, 179: 156-162.
 54. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. (2001) Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest*, 119: 1329-1336.
 55. Cox G. (1995) Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol*, 154: 4719-4725.
 56. Homey B, Zlotnik A. (1999) Chemokines in allergy. *Curr Opin Immunol*, 11: 626-634.
 57. Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X, Takamatsu JK, Saito H, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Takebe Y, Ohishi T, Fukutake K, Maruyama Y, Yashiki S, Sonoda S, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. (1999) Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 4581-4585.
 58. Tian M, Liu F, Wen GY, Shi SY, Chen RH, Zhao DY. (2009) Effect of variation in RANTES promoter on serum RANTES levels and risk of recurrent wheezing after RSV bronchiolitis in children from Han, Southern China. *Eur J Pediatr*, 168: 963-967.
 59. Zhang YG, Huang J, Zhang J, Li XB, He C, Xiao YL, Tian C, Wan H, Zhao YL, Tsewang YG, Fan H. (2010) RANTES gene polymorphisms and asthma risk: A meta-analysis. *Arch Med Res*, 41: 50-58.
 60. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*, 273: 1856-1862.

61. Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R, Helms PJ. (1999) Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. *Lancet*, 354: 1264-1265.
62. Mitchell TJ, Walley AJ, Pease JE, Venables PJ, Wiltshire S, Williams TJ, Cookson WO. (2000) Delta 32 deletion of CCR5 gene and association with asthma or atopy. *Lancet*, 356: 1491-1492.
63. Ward JK, Barnes PJ, Springall DR, Abelli L, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Polak JM, Belvisi MG. (1995) Distribution of human i-NANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 13: 175-184.
64. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. (1994) Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest*, 94: 2231-2236.
65. Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. (2006) Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol*, 533: 240-252.
66. Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 7809-7813.
67. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. (1993) Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 9: 371-377.
68. Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. (1997) Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16: 629-639.
69. Silvestri M, Spallarossa D, Frangova Yourukova V, Battistini E, Fregonese B, Rossi GA. (1999) Orally exhaled nitric oxide levels are related to the degree of blood eosinophilia in atopic children with mild-intermittent asthma. *Eur Respir J*, 13: 321-326.
70. Piacentini GL, Bodini A, Costella S, Vicentini L, Mazzi P, Sperandio S, Boner AL. (1999) Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J*, 13: 1386-1390.
71. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. (1996) Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 454-457.
72. Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Caramori M, Chapman KR, Gutierrez C, Zamel N. (1998) Exhaled nitric oxide and bronchial reactivity during and after inhaled beclomethasone in mild asthma. *J Asthma*, 35: 473-479.
73. Bisgaard H, Loland L, Oj JA. (1999) NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast. *Am J Respir Crit Care Med*, 160: 1227-1231.
74. Silkoff PE, Romero FA, Gupta N, Townley RG, Milgrom H. (2004) Exhaled nitric oxide in children with asthma receiving Xolair (omalizumab), a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody. *Pediatrics*, 113: e308-312.
75. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA, Verheyen AK, van der Linde HJ, van Ark I, Coene A, Nijkamp FP. (1996) Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 1697-1701.

76. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. (2005). *Am J Respir Crit Care Med*, 171: 912-930.
77. Maziak W, Loukides S, Culpitt S, Sullivan P, Kharitonov SA, Barnes PJ. (1998) Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 998-1002.
78. Horvath I, Donnelly LE, Kiss A, Balint B, Kharitonov SA, Barnes PJ. (2004) Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide concentrations in asthmatic smokers. *Respiration*, 71: 463-468.
79. Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. (1995) Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J*, 8: 295-297.
80. de Gouw HW, Grunberg K, Schot R, Kroes AC, Dick EC, Sterk PJ. (1998) Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J*, 11: 126-132.
81. Horvath I. (2005) A kilégzett nitrogén-monoxid jelentősége asthma bronchialéban – Elkülönítő diagnosztika és követés. *LAM*, 15: 265-272.
82. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, Gagliardo R, Profita M, Bousquet J, Bonsignore G. (1999) Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol*, 103: 563-573.
83. Wark PA, Johnston SL, Bucchieri F, Powell R, Puddicombe S, Laza-Stanca V, Holgate ST, Davies DE. (2005) Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med*, 201: 937-947.
84. Holgate ST, Davies DE. (2009) Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity*, 31: 362-367.
85. Woolley KL, Gibson PG, Carty K, Wilson AJ, Twaddell SH, Woolley MJ. (1996) Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 237-243.
86. Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, Zhang X, Moilanen E, Barnes PJ. (2000) Delayed eosinophil apoptosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 77-83.
87. Walsh GM. (2000) Eosinophil apoptosis: mechanisms and clinical relevance in asthmatic and allergic inflammation. *Br J Haematol*, 111: 61-67.
88. Duncan CJ, Lawrie A, Blaylock MG, Douglas JG, Walsh GM. (2003) Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J*, 22: 484-490.
89. Altieri DC. (2010) Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*, 430: 199-205.
90. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388: 300-304.
91. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. (2002) Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci*, 115: 575-585.

92. Altieri DC, Marchisio PC. (1999) Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest*, 79: 1327-1333.
93. Zhao J, Tenev T, Martins LM, Downward J, Lemoine NR. (2000) The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci*, 113 Pt 23: 4363-4371.
94. Altieri DC. (2001) The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*, 7: 542-547.
95. Alznauer F, Martinelli S, Yousefi S, Thurig C, Schmid I, Conway EM, Schoni MH, Vogt P, Mueller C, Fey MF, Zangemeister-Wittke U, Simon HU. (2004) Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J Exp Med*, 199: 1343-1354.
96. Vassina EM, Yousefi S, Simon D, Zwicky C, Conus S, Simon HU. (2006) cIAP-2 and survivin contribute to cytokine-mediated delayed eosinophil apoptosis. *Eur J Immunol*, 36: 1975-1984.
97. Di Valentin E, Crahay C, Garbacki N, Hennuy B, Gueders M, Noel A, Foidart JM, Grooten J, Colige A, Piette J, Cataldo D. (2009) New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296: L185-197.
98. Tolgyesi G, Molnar V, Semsei AF, Kizsel P, Ungvari I, Pocza P, Wiener Z, Komlosi ZI, Kunos L, Galffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. (2009) Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of paraoxonase-1 in the disease. *Int Immunol*, 21: 967-975.
99. Tumes DJ, Connolly A, Dent LA. (2009) Expression of survivin in lung eosinophils is associated with pathology in a mouse model of allergic asthma. *Int Immunol*, 21: 633-644.
100. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. (1990) Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis*, 142: 1351-1358.
101. Harris JR, Magnus P, Samuelsen SO, Tambs K. (1997) No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 43-49.
102. Koppelman GH, Los H, Postma DS. (1999) Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. *Eur Respir J*, 13: 2-4.
103. Nieminen MM, Kaprio J, Koskenvuo M. (1991) A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest*, 100: 70-75.
104. Barnes KC, Marsh DG. (1998) The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today*, 19: 325-332.
105. March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. (2011) The genetics of asthma and allergic disorders. *Discov Med*, 11: 35-45.
106. Liggett SB. (1995) Genetics of beta 2-adrenergic receptor variants in asthma. *Clin Exp Allergy*, 25 Suppl 2: 89-94; discussion 95-86.
107. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benchekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. (2002) Association

- of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, 418: 426-430.
108. Basehore MJ, Howard TD, Lange LA, Moore WC, Hawkins GA, Marshik PL, Harkins MS, Meyers DA, Bleecker ER. (2004) A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 114: 80-87.
 109. Haller G, Torgerson DG, Ober C, Thompson EE. (2009) Sequencing the IL4 locus in African Americans implicates rare noncoding variants in asthma susceptibility. *J Allergy Clin Immunol*, 124: 1204-1209 e1209.
 110. Munthe-Kaas MC, Carlsen KH, Haland G, Devulapalli CS, Gervin K, Egeland T, Carlsen KL, Undlien D. (2008) T cell-specific T-box transcription factor haplotype is associated with allergic asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*, 121: 51-56.
 111. Pykalainen M, Kinoshita R, Valkonen S, Rydman P, Kilpelainen M, Laitinen LA, Karjalainen J, Nieminen M, Hurme M, Kere J, Laitinen T, Lahesmaa R. (2005) Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, 115: 80-87.
 112. Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Silverman ES, Raby B, Brown A, Ozonoff A, Richter B, Weiss ST. (2004) The IL12B gene is associated with asthma. *Am J Hum Genet*, 75: 709-715.
 113. Suttner K, Depner M, Klopp N, Illig T, Vogelberg C, Adamski J, von Mutius E, Kabesch M. (2009) Genetic variants in the GATA3 gene are not associated with asthma and atopic diseases in German children. *J Allergy Clin Immunol*, 123: 1179-1181.
 114. Zhou H, Hong X, Jiang S, Dong H, Xu X. (2009) Analyses of associations between three positionally cloned asthma candidate genes and asthma or asthma-related phenotypes in a Chinese population. *BMC Med Genet*, 10: 123.
 115. Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, Bleecker ER. (2002) Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet*, 70: 230-236.
 116. Kabesch M, Schedel M, Carr D, Woitsch B, Fritzsche C, Weiland SK, von Mutius E. (2006) IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117: 269-274.
 117. Potaczek DP, Okumura K, Nishiyama C. (2009) FCER1A genetic variability and serum IgE levels. *Allergy*, 64: 1383.
 118. Vladich FD, Brazille SM, Stern D, Peck ML, Ghittoni R, Vercelli D. (2005) IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest*, 115: 747-754.
 119. Wu H, Romieu I, Shi M, Hancock DB, Li H, Sienna-Monge JJ, Chiu GY, Xu H, del Rio-Navarro BE, London SJ. (2010) Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. *J Allergy Clin Immunol*, 125: 321-327 e313.
 120. Potter PC, Van Wyk L, Martin M, Lentjes KU, Dowdle EB. (1993) Genetic polymorphism of the beta-2 adrenergic receptor in atopic and non-atopic subjects. *Clin Exp Allergy*, 23: 874-877.

121. Deichmann KA, Starke B, Schlenther S, Heinzmann A, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J. (1999) Linkage and association studies of atopy and the chromosome 11q13 region. *J Med Genet*, 36: 379-382.
122. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, Bhattacharyya S, Tinsley J, Zhang Y, Holt R, Jones EY, Lench N, Carey A, Jones H, Dickens NJ, Dimon C, Nicholls R, Baker C, Xue L, Townsend E, Kabesch M, Weiland SK, Carr D, von Mutius E, Adcock IM, Barnes PJ, Lathrop GM, Edwards M, Moffatt MF, Cookson WO. (2003) Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet*, 35: 258-263.
123. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Makela S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A, Zucchelli M, Gullsten H, Leino M, Alenius H, Petays T, Haahtela T, Laitinen A, Laprise C, Hudson TJ, Laitinen LA, Kere J. (2004) Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science*, 304: 300-304.
124. Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, Kuldane S, Donfack J, Kogut P, Patel NM, Goodenbour J, Howard T, Wolf R, Koppelman GH, White SR, Parry R, Postma DS, Meyers D, Bleecker ER, Hunt JS, Solway J, Ober C. (2005) Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet*, 76: 349-357.
125. Noguchi E, Yokouchi Y, Zhang J, Shibuya K, Shibuya A, Bannai M, Tokunaga K, Doi H, Tamari M, Shimizu M, Shirakawa T, Shibasaki M, Ichikawa K, Arinami T. (2005) Positional identification of an asthma susceptibility gene on human chromosome 5q33. *Am J Respir Crit Care Med*, 172: 183-188.
126. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SA, Wong KC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, von Mutius E, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WO. (2007) Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*, 448: 470-473.
127. Wills-Karp M, Ewart SL. (2004) Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet*, 5: 376-387.
128. Gu ML, Zhao J. (2011) Mapping and localization of susceptible genes in asthma. *Chin Med J (Engl)*, 124: 132-143.
129. Antal P, Fannes G, Timmerman D, Moreau Y, De Moor B. (2003) Bayesian applications of belief networks and multilayer perceptrons for ovarian tumor classification with rejection. *Artif Intell Med*, 29: 39-60.
130. Antal P, Fannes G, Timmerman D, Moreau Y, De Moor B. (2004) Using literature and data to learn Bayesian networks as clinical models of ovarian tumors. *Artif Intell Med*, 30: 257-281.
131. Botto LD, Khoury MJ. (2001) Commentary: facing the challenge of gene-environment interaction: the two-by-four table and beyond. *Am J Epidemiol*, 153: 1016-1020.
132. Albert PS, Ratnasinghe D, Tangrea J, Wacholder S. (2001) Limitations of the case-only design for identifying gene-environment interactions. *Am J Epidemiol*, 154: 687-693.

133. Welniak LA, Wang Z, Sun K, Kuziel W, Anver MR, Blazar BR, Murphy WJ. (2004) An absence of CCR5 on donor cells results in acceleration of acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol*, 32: 318-324.
134. Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lancken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY, Kleeberger SR. (2007) Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J*, 21: 2237-2246.
135. von Otter M, Landgren S, Nilsson S, Celojevic D, Bergstrom P, Hakansson A, Nissbrandt H, Drozdziak M, Bialecka M, Kurzawski M, Blennow K, Nilsson M, Hammarsten O, Zetterberg H. (2010) Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease. *BMC Med Genet*, 11: 36.
136. Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol*, 22: 2883-2892.
137. Favreau LV, Pickett CB. (1995) The rat quinone reductase antioxidant response element. Identification of the nucleotide sequence required for basal and inducible activity and detection of antioxidant response element-binding proteins in hepatoma and non-hepatoma cell lines. *J Biol Chem*, 270: 24468-24474.
138. Reddy NM, Suryanarayana V, Kalvakolanu DV, Yamamoto M, Kensler TW, Hassoun PM, Kleeberger SR, Reddy SP. (2009) Innate immunity against bacterial infection following hyperoxia exposure is impaired in NRF2-deficient mice. *J Immunol*, 183: 4601-4608.
139. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. (2003) Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol*, 109: 250-265.
140. Michel S, Liang L, Depner M, Klopp N, Ruether A, Kumar A, Schedel M, Vogelberg C, von Mutius E, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Laub O, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Gut IG, Schreiber S, Lathrop M, Illig T, Kabesch M. (2010) Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PLoS One*, 5: e13894.
141. Hill MR, Cookson WO. (1996) A new variant of the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI-beta E237G): associations with measures of atopy and bronchial hyper-responsiveness. *Hum Mol Genet*, 5: 959-962.
142. Honda K, Arima M, Cheng G, Taki S, Hirata H, Eda F, Fukushima F, Yamaguchi B, Hatano M, Tokuhisa T, Fukuda T. (2003) Prostaglandin D2 reinforces Th2 type inflammatory responses of airways to low-dose antigen through bronchial expression of macrophage-derived chemokine. *J Exp Med*, 198: 533-543.
143. Leung TF, Li CY, Kong AP, Chan IH, Ng MC, Chan MH, So WY, Wong GW, Lam CW, Chan JC. (2009) PTGDR is not a major candidate gene for asthma and atopy in Chinese children. *Pediatr Allergy Immunol*, 20: 556-562.
144. Sturm EM, Schratl P, Schuligoi R, Konya V, Sturm GJ, Lippe IT, Peskar BA, Heinemann A. (2008) Prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors. *J Immunol*, 181: 7273-7283.

145. Park BL, Park SM, Park JS, Uh ST, Choi JS, Kim YH, Kim MK, Choi IS, Choi BW, Cho SH, Hong CS, Lee YW, Lee JY, Park CS, Shin HD. (2010) Association of PTGER gene family polymorphisms with aspirin intolerant asthma in Korean asthmatics. *BMB Rep*, 43: 445-449.
146. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. (2010) The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev*, 24: 862-874.
147. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, Martin JF. (2011) Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*, 332: 458-461.
148. Angus L, Moleirinho S, Herron L, Sinha A, Zhang X, Niestrata M, Dholakia K, Prystowsky MB, Harvey KF, Reynolds PA, Gunn-Moore FJ. (2012) Willin/FRMD6 expression activates the Hippo signaling pathway kinases in mammals and antagonizes oncogenic YAP. *Oncogene*, 31: 238-250.
149. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D. (2007) Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*, 130: 1120-1133.
150. Holgate ST, Roberts G, Arshad HS, Howarth PH, Davies DE. (2009) The role of the airway epithelium and its interaction with environmental factors in asthma pathogenesis. *Proc Am Thorac Soc*, 6: 655-659.
151. Kim IY, Jung J, Jang M, Ahn YG, Shin JH, Choi JW, Sohn MR, Shin SM, Kang DG, Lee HS, Bae YS, Ryu do H, Seong JK, Hwang GS. (2010) ¹H NMR-based metabolomic study on resistance to diet-induced obesity in AHNAK knock-out mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 403: 428-434.
152. de Boer WI, Sharma HS, Baelemans SM, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, Braunstahl GJ. (2008) Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*, 86: 105-112.
153. Li H, Wetten S, Li L, St Jean PL, Upmanyu R, Surh L, Hosford D, Barnes MR, Briley JD, Borrie M, Coletta N, Delisle R, Dhalla D, Ehm MG, Feldman HH, Fornazzari L, Gauthier S, Goodgame N, Guzman D, Hammond S, Hollingworth P, Hsiung GY, Johnson J, Kelly DD, Keren R, Kertesz A, King KS, Lovestone S, Loy-English I, Matthews PM, Owen MJ, Plumpton M, Pryse-Phillips W, Prinjha RK, Richardson JC, Saunders A, Slater AJ, St George-Hyslop PH, Stinnett SW, Swartz JE, Taylor RL, Wherrett J, Williams J, Yarnall DP, Gibson RA, Irizarry MC, Middleton LT, Roses AD. (2008) Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 65: 45-53.
154. Legerski RJ. (2009) The Pso4 complex splices into the DNA damage response. *Cell Cycle*, 8: 3448-3449.
155. Voglauer R, Chang MW, Dampier B, Wieser M, Baumann K, Sterovsky T, Schreiber M, Katinger H, Grillari J. (2006) SNEV overexpression extends the life span of human endothelial cells. *Exp Cell Res*, 312: 746-759.
156. Yang L, Zhu H, Zhou B, Gu H, Yan H, Tang N, Dong H, Sun Q, Cong R, Chen G, Wang B. (2009) The association between the survivin C-31G polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci*, 54: 1021-1028.
157. Dixon AL, Liang L, Moffatt MF, Chen W, Heath S, Wong KC, Taylor J, Burnett E, Gut I, Farrall M, Lathrop GM, Abecasis GR, Cookson WO. (2007) A

- genome-wide association study of global gene expression. *Nat Genet*, 39: 1202-1207.
158. Hmeljak J, Erculj N, Dolzan V, Kern I, Cor A. (2011) BIRC5 promoter SNPs do not affect nuclear survivin expression and survival of malignant pleural mesothelioma patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137: 1641-1651.
 159. Krepela E, Dankova P, Moravcikova E, Krepelova A, Prochazka J, Cermak J, Schutzner J, Zatloukal P, Benkova K. (2009) Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol*, 35: 1449-1462.
 160. Cheng ZJ, Hu LH, Huang SJ. (2008) [Correlation of -31G/C polymorphisms of survivin promoter to tumorigenesis of gastric carcinoma]. *Ai Zheng*, 27: 258-263.
 161. Srivastava K, Srivastava A, Mittal B. (2012) Survivin promoter -31G/C (rs9904341) polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 39: 1509-1516.
 162. Boidot R, Vegran F, Jacob D, Chevrier S, Gangneux N, Taboureau J, Oudin C, Rainville V, Mercier L, Lizard-Nacol S. (2008) The expression of BIRC5 is correlated with loss of specific chromosomal regions in breast carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 47: 299-308.
 163. Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemiere C, Pizzichini E, Cartier A, Hussack P, Goldsmith CH, Laviolette M, Parameswaran K, Hargreave FE. (2006) Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J*, 27: 483-494.
 164. Schleich FN, Seidel L, Sele J, Manise M, Quaedvlieg V, Michils A, Louis R. (2010) Exhaled nitric oxide thresholds associated with a sputum eosinophil count $\geq 3\%$ in a cohort of unselected patients with asthma. *Thorax*, 65: 1039-1044.
 165. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. (2002) Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*, 360: 1715-1721.

Saját publikációk jegyzéke

Értekezésben összefoglalt saját közlemények:

1. **Ungvári I**, Tölgyesi G, Semsei AF, Nagy A, Radosits K, Keszei M, Kozma GT, Falus A, Szalai C. CCR5 Delta 32 mutation, Mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007 Jun;119(6):1545-7. IF: 8,115
2. **Ungvári I**, Hadadi É, Virág V, Nagy A, Kiss A, Kalmár Á, Zsigmond G, Semsei AF, Falus A, Szalai C. Relationship between air pollution, NFE2L2 gene polymorphisms and childhood asthma in a Hungarian population. J Community. Genet. 2012; 3:(1) pp. 25-33.
3. **Ungvári I**, Hadadi É, Virág V, Bikov A, Nagy A, Semsei AF, Gálffy G, Tamási L, Horváth I, Szalai C. Implication of BIRC5 in asthma pathogenesis. Int Immunol. 2012; 24:(5) pp. 293-301. IF: 3,415
4. **Ungvári I**, Hullám G, Antal P, Kizsel PS, Gézsi A, Hadadi É, Virág V, Hajós G, Millinghoffer A, Nagy A, Kiss A, Semsei ÁF, Temesi G, Melegh B, Kisfali P, Széll M, Bikov A, Gálffy G, Tamási L, Falus A, Szalai C. Evaluation of a Partial Genome Screening of Two Asthma Susceptibility Regions Using Bayesian Network Based Bayesian Multilevel Analysis of Relevance. PLoS One. 2012;7(3):e33573. IF: 4,092

Más témában megjelent közlemények:

1. Tölgyesi G, Keszei M, **Ungvári I**, Nagy A, Falus A, Szalai C. Involvement of TNFalpha -308A promoter polymorphism in the development of asthma in children infected with Chlamydomphila pneumoniae. Pediatr Res. 2006 Nov ; 543-8. IF: 2,619
2. Nagy A, Keszei M, Kis Z, Budai I, Tölgyesi G, **Ungvári I**, Falus A, Szalai C. Chlamydomphila pneumoniae infection status is dependent on the subtypes of asthma and allergy. Allergy Asthma Proc, 2007. 28(1): p. 58-63. IF: 0,970

3. Szalai C., **Ungvári I**, Pelyhe L, Tölgyesi G., Falus A. Asthma from a pharmacogenomic point of view. *Br J Pharmacol*, 2008. 153(8): p. 1602-14. IF: 4,902
4. Semsei AF, Erdélyi DJ, **Ungvári I**, Kámory E, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Cságoly E, Falus A, Kovács GT, Szalai C., Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res*. 2008 Aug;32(8):1214-20. IF: 2,390
5. Tölgyesi G, Molnár V, Semsei AF, Kiszél P, **Ungvári I**, Pócza P, Wiener Z, Komlósi ZI, Kunos L, Gálffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of paraoxonase-1 in the disease. *Int Immunol*. 2009 Aug;21(8):967-75. IF: 3,403
6. Simon T, Semsei ÁF, **Ungvári I**, Hadadi É, Virág V, Nagy A, Vángor MS, László V, Szalai C, Falus A. Asthma endophenotypes and polymorphisms in the histamine receptor HRH4 gene. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;159(2):109-20. IF: 2,403
7. Semsei AF, Erdelyi DJ, **Ungvári I**, Csagoly E, Hegyi MZ, Kiszél PS, Lautner-Csorba O, Szabolcs J, Masat P, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovacs GT. ABCC1 polymorphisms in anthracycline induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell Biol Int*. 2012 Jan;36(1):79-86. IF: 1,482
8. Weiszhar Z, Bikov A, Gálffy G, Tamási L, **Ungvári I**, Szalai C, Losonczy G, Horváth I. Elevated complement factor H levels in asthmatic sputa. *J Clin Immunol*. 2013 Feb;33(2):496-505. IF.: 3,077

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Falus Andrásnak, aki lehetőséget adott arra, hogy a Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézetben dolgozhassam. Köszönöm neki a bizalmat és bátorítást amivel mindig támogatott, és hogy atyai gondoskodásával családi légkört teremtett mindannyiunk munkájához.

Köszönöm Prof. Dr. Buzás Editnek, az Intézet jelenlegi vezetőjének, hogy lehetővé tette hogy a munkámat tovább folytathassam, és szakmai, emberi példát mutatott nekem.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Szalai Csabának amiért a csoportjában dolgozhattam, és amiért szakmai tanácsaival segített eligazodni a kutatás útvesszőiben.

Köszönöm Hadadi Évának, hogy mind szakmai, mind baráti támaszt nyújtott, és a munkámat minden mozzanatában önzetlen segítséggel mozdította elő.

Köszönöm Félné Dr. Semsei Ágnesnek, hogy a kezdeti években társam volt egy labor működtetésében. A szakmai nehézségekben, statisztikai útvesszőkben mindig segítőkészen támogatott. Precizitást és alázatot tanulhattam tőle.

Köszönöm Sándorné Vángor Mónikának a mindig precíz, pontos, átgondolt, készséges munkavégzését.

Köszönettel tartozom Dr. Bikov Andrásnak, Dr. Horváth Ildikónak, Dr. Gálffy Gabriellának, Dr. Tamási Lillának, Dr. Nagy Adriennek és Dr. Radosits Károlynak a minták gyűjtésében és feldolgozásában nyújtott értékes segítségüket.

Köszönöm Dr. Antal Péternek, Hullám Gábornak, Temesi Gergelynek, Gézsi Andrásnak, Hajós Gergelynek és Millinghoffer Andrásnak a BN-BMLA elemzés során mutatott elkötelezettségüket, és precizitásukat.

Szeretném megköszönni Virág Vikornak, Dr. Éder Katalinnak, Dr. Schermann Gézának, Lautner-Csorba Orsolyának, Dr. Pál Zsuzsannának, Dr. Németh Zsuzsannának, Dr. Tölgyesi Gergelynek és az intézet összes dolgozójának a sokféle, akár baráti, akár szakmai segítséget.

És végül köszönöm kisfiamnak, férjemnek, szüleimnek és testvéreimnek, hogy segítettek azzá válni aki vagyok, hogy mindvégig mellettem álltak, bátorítottak, és elviselték a munkám miatti nehézségeket.