

Analiza polimorfizmu R576Q genu podjednostki α receptora dla interleukiny 4 u chorych atopowych

The polymorphism R576Q of the interleukin-4 receptor subunit α gene in atopic patients

BARBARA RYMARCZYK ^{1/}, DARIUSZ MOCZULSKI ^{2/}, BARBARA ROGALA ^{1/}, WŁADYSŁAW GRZESZCZAK ^{2/}

^{1/} Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Alergologii i Immunologii Klinicznej Śląskiej Akademii Medycznej

^{2/} Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii Śląskiej Akademii Medycznej, ul. 3 Maja 13/15, 41-800 Zabrze

Istnieją dane sugerujące, że gen lub geny kodujące podjednostkę α receptora dla IL-4 odpowiadają za genetyczną predyspozycję do wykształcenia fenotypu atopowego. W nawiązaniu do toczącej się w piśmiennictwie dyskusji podjęto próbę potwierdzenia tej hipotezy na przykładzie populacji polskiej przy zastosowaniu modelu badań rodzinnych (*family based study design*) oraz analizę korelacji pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu Q576R genu podjednostki α receptora dla IL-4 a wybranymi parametrami immunologicznymi.

Do badań włączono 45 chorych w wieku 11-34 lat uczulonych na pyłki traw i zbóż lub roztocza kurzu domowego cierpiących na alergiczny nieżyt nosa i/lub astmę oskrzelową. Polimorfizm R576Q genu dla IL-4R α oznaczono przy zastosowaniu techniki PCR (*Polimerase Chain Reaction*), a następnie trawienia przez enzym restrykcyjny MspI. Do analizy związku pomiędzy badanym polimorfizmem a występowaniem atopii posłużono się testem TDT oraz McNemara. U każdego badanego oznaczono stężenie całkowitej IgE w surowicy, alergenowo-swoistych IgE przeciwko wybranym alergenom, IL-4 oraz sIL-4R.

Analiza TDT wykazała, że allel R576 i 576Q został przekazany odpowiednio 20 i 15 razy przez heterozygotycznych rodziców potomstwu dotkniętemu atopią (McNemar $\chi=0,72$; $p=0,19$). Pomimo braku znamienności statystycznej analizowanych wartości, obserwowana tendencja wskazuje, że częstsza transmisja allelu R576 może odgrywać rolę w mechanizmach atopii.

Alergia Astma Immunologia, 2000, 5(3), 188-192

Słowa kluczowe: receptor dla interleukiny 4, polimorfizm R576Q, choroby atopowe, genetyka astmy

There is a strong evidence that R576 allele of interleukin-4 receptor α gene (IL-4R) might predispose to atopy. The aim of the study was to test the role of R576Q polymorphism in patients with atopy using family based study design, free of possible biases caused by population substructure and the effect of R576Q polymorphism on the total IgE, IL-4 and sIL-4R serum levels.

For this purpose 45 atopic patients (aged 11-34) with pollen and house dust mite allergy or/and mild asthma together with both parents were collected. R576Q polymorphism of IL-4R α gene was genotyped in each proband and both parents using PCR-based protocol. The results were analysed with the transmission disequilibrium test (TDT) using the family based study design. The total IgE serum level, allergen-specific IgE to the common aeroallergens, IL-4 and sIL-4R α were assessed in each proband and their both parents. In TDT test R576 and Q576 allele were transmitted from heterozygous parents to the affected offspring 20 and 15 times, respectively (McNemar test: $\chi=0,72$; $p=0,19$). No significant differences among total IgE, IL-4 and sIL-4R α serum levels in investigated groups with the same genotype were observed.

The results of transmission disequilibrium test did not reach the statistical significance, however the observed excess of R576 allele may support the previous observation of case-control studies in other populations, that R576 allele is associated with atopy. A larger study group has to be collected to prove the observed correlation.

Alergia Astma Immunologia, 2000, 5(3), 188-192

Key words: interleukin-4 receptor, polymorphism R576Q, atopy, genetics of asthma

Dane badawcze wskazują, że około 20-30% populacji ludności świata wykazuje cechy skazy atopowej, której klasycznym markerem jest znacznie podwyższone stężenie IgE w surowicy [1]. W wielu krajach obserwuje się stały wzrost częstości występowania chorób alergicznych z kręgu atopii. Panuje powszechne przekonanie, iż fenotypowa manifestacja skazy atopowej jest wypadkową współdziałania heterogennych czynników genetycznych i środowiskowych [2,3,4]. Już na początku XX wieku Cooke [5] opisał rodzinne występowanie atopii opierając się na danych anamnestycznych rodzin dotkniętych astmą atopową, pokrzywką oraz obrzękiem naczyń ruchomym.

W późniejszych latach lawinowo zaczęło narastać zainteresowanie badaczy zagadnieniem genetycznej determinacji tej grupy chorób.

Patomechanizm reakcji alergicznej związany jest z funkcją wielu komórek oraz ich mediatorów. Reakcja „przełączenia” produkcji limfocytów B na syntezę IgE wymaga aktywacji komórek B poprzez CD40:CD40L, współdziałania wysokich stężeń IL-4 i IL-13 w warunkach względnego niedoboru INF- γ i innych aktywnych biologicznie białek o przeciwstawnej funkcji wobec aktywności typu Th2. Interleukina 4 jest jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za syntezę IgE i pod-

trzymywania przewlekłego immunologicznego odczynu zapalnego warunkującego objawy chorób alergicznych. Interleukina 4, początkowo określana mianem czynnika wzrostowego limfocytów B (BCGF – *B-Cell Growth Factor*), wywiera swoje wielokierunkowe działanie za pośrednictwem swoistego receptora.

Badania strukturalne receptora dla IL-4 wykazały, że składa się on z dwóch podjednostek. Podjednostka γ nie jest swoista dla cząsteczki IL-4 i występuje jako składowa wielu receptorów dla różnych cytokin, natomiast podjednostka α charakteryzuje się właściwościami czynnika aktywującego transkrypcję i wiążącego IL-4 [6]. Podjednostka ta pełni szczególną rolę w procesie syntezy IgE. Dane te sugerują, że gen lub geny kodujące podjednostkę α odpowiadają za genetyczną predyspozycję do wykształcenia fenotypu atopowego poprzez udział tego genu/genów w zapoczątkowaniu oraz podtrzymywaniu reakcji alergicznej. Ważną obserwacją badawczą jest również fakt, że łańcuch α receptora dla IL-4 jest również składową receptora dla IL-13 wykazującej synergizm funkcji w procesie syntezy IgE z IL-4 [7].

Przypuszcza się, że gen kodujący łańcuch α receptora dla IL-4 (IL-4R α) odgrywa istotną rolę w kształtowaniu genetycznej predyspozycji do rozwoju fenotypu atopowego. Marker D16S401, zlokalizowany w pobliżu genu IL4R α jest związany nie tylko z ujawnieniem się fenotypu atopowego u Hutteritów [8], ale również ze zdolnością do produkcji alergenowo-swoistych IgE, co zaobserwowano na podstawie badań przeprowadzonych w rodzinach niemieckich [9].

W obrębie genu dla IL-4R α zidentyfikowano wiele polimorfizmów poszczególnych nukleotydów odpowiedzialnych za substytucję pojedynczych aminokwasów [10,11,12,13]. Mitsuyasu [14] zaobserwował związek pomiędzy występowaniem substytucji Ile50 a występowaniem astmy oskrzelowej, natomiast Hershey [15] opisał powiązanie między obecnością allelu R576 a występowaniem zespołu hyper-IgE oraz atopowego zapalenia skóry. Oba rodzaje polimorfizmów są ściśle powiązane ze zmianami funkcjonowania receptora. Kruse [12] zaobserwował szczególną zależność pomiędzy współistnieniem alleli S503 i R576 a tendencją do występowania niskich stężeń całkowitej IgE w surowicy w mechanizmie zaburzenia fosorylacji STAT6.

Badania przeprowadzone przez Noguchi i wsp. [16] przy zastosowaniu badań rodzinnych (*Family Based Study Design*) w populacji japońskiej, wskazują, że gen IL-4R α nie wywiera istotnego wpływu na zjawiska dziedziczenia astmy oskrzelowej ani atopii. Ober i wsp. [12] przeanalizowali wszystkie egzony genu IL-4R w poszukiwaniu związków pomiędzy ich występowaniem a ujawnieniem się fenotypu atopowego. Stosując metodę TDT (*Transmission Disequilibrium Test*) wykazali oni istnienie takiej zależności w przypadku atopii oraz astmy oskrze-

lowej u Hutteritów, Murzynów oraz ludności hiszpańskiej. Zaobserwowali oni również, że allele wykazujące najsilniejszy związek z atopią były odmienne dla różnych grup etnicznych.

Wyniki badań opublikowane przez Hershey'a i wsp. [15] wykazały, że allel R576 genu dla IL-4R α jest ściśle związany z atopią. W późniejszym czasie przeprowadzono wiele badań celem potwierdzenia tej pionierskiej obserwacji, których wyniki nie doprowadziły do ostatecznego potwierdzenia tej tezy. Badania wskazujące na związek pomiędzy występowaniem allelu R576 i atopią miały charakter badań kontrolno-klinicznych (*case-control study design*). Ich rozbieżne wyniki mogą być skutkiem odmienności w zakresie badanych populacji oraz zastosowania różnych modeli analizy związku tego polimorfizmu z atopią.

W nawiązaniu do toczącej się w piśmiennictwie dyskusji podjęto próbę potwierdzenia hipotezy Hershey'a i wsp. na przykładzie przedstawicieli populacji polskiej wykazujących cechy atopii przy zastosowaniu modelu badań rodzinnych (*Family Based Study Design*). Postanowiono również przeprowadzić analizę korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmu Q576R w obrębie genu podjednostki α dla IL-4, a wybranymi parametrami immunologicznymi (stężeniem całkowitej IgE, stężeniem IL-4 oraz sIL-4R α w surowicy) u chorych wykazujących uczulenie na pyłki traw i zbóż lub roztocza kurzu domowego cierpiących na alergiczny nieżyt nosa i/lub astmę oskrzelową.

PACJENCI I METODY

Pacjenci

Do badań włączono 45 chorych wykazujących cechy atopii (19 mężczyzn, 26 kobiet w wieku 11-34, średnio 20 lat) leczonych w Wojewódzkiej Poradni Alergologicznej w Zabrze oraz ich rodziców (45 mężczyzn, 45 kobiet, w wieku 34-65, średnio 48 lat). Wszyscy chorzy zostali podzieleni na 3 grupy:

- 27 chorych na sezonowy alergiczny nieżyt nosa lub/i astmę, uczulonych na pyłki roślin,
- 18 chorych na całoroczny alergiczny nieżyt nosa lub/i astmę uczulonych na roztocza kurzu domowego,
- 90 osób – rodzice badanych chorych.

Każda z badanych osób wyraziła świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

Projekt badania został pozytywnie zaopiniowany przez Komisję Bioetyczną Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.

Metodyka badań

Rozpoznanie choroby ustalano na podstawie wywiadu, badania fizykalnego oraz dodatniego wyniku testów skórnych. Testy skórne przeprowadzano techniką HEP (*histamine-equivalent prick*). U chorych na sezonowy

alergiczny nieżyt nosa lub/i astmę oskrzelową oznaczono stężenia alergenowo-swoistych IgE przeciwko *Secale cereale*, *Betula verucosa*, *Phleum pratense* oraz *Plantago lanceolata*. U chorych na całoroczny alergiczny nieżyt nosa lub/i astmę oskrzelową oznaczono stężenia alergenowo-swoistych IgE przeciwko *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*. Chorzy z pozytywnym wywiadem w kierunku schorzeń alergicznych, dodatnim wynikiem testów skórnych z przynajmniej jednym z badanych alergenów, stężeniem alergenowo-swoistej IgE powyżej 2 kU/l (powyżej 2 klasy podanej przez producenta) oraz stężeniem całkowitej IgE w surowicy powyżej 100 kU/l zostali uznani za spełniających kryteria włączenia do badań.

W czasie badania chorzy byli leczeni miejscowymi lekami obkurczającymi naczynia błony śluzowej nosa lub/i kromonami lub/i kortykosteroidami o działaniu miejscowym. U żadnego z badanych nie prowadzono swoistej immunoterapii.

Diagnostyka immunologiczna

Próbki krwi pobierano w trakcie naturalnej ekspozycji na alergen i przechowywano w temp. -70°C do czasu badania. Stężenie całkowitej IgE oraz alergenowo-swoistych IgE oznaczano metodą fluoroenzymatyczną (FEIA, Pharmacia, Szwecja), zgodnie z zaleceniami podanymi przez producenta. Wyniki podano w kU/l.

IL-4 i sIL4R α

Oznaczenia stężenia IL-4 i sIL4R α w surowicy dokonano przy użyciu zestawu R&D Systems wykorzystując technikę ELISA. Wyniki wyrażono w pg/ml.

Analiza genetyczna

DNA do analizy genetycznej uzyskano z leukocytów krwi obwodowej pobieranej na wersenian dwusodowy. DNA izolowano przy zastosowaniu MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). Polimorfizm R576Q (A1902G) genu dla podjednostki α receptora dla IL-4 oznaczono zgodnie z protokołem wg Noguchi [16]. Polimorfizm ten analizowano namnażając fragment długości 300 par zasad. Produkt amplifikacji został poddany trawieniu przez enzym restrykcyjny MspI, a następnie rozdzieleniu na żelu agarozowym o stężeniu 2,5% i wizualizacji przy użyciu zestawu BioDoc z transiluminatorem UV (*Biometra*). Przy obecności allelu Q miejsce restrykcyjne było zachowane.

Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako medianę oraz zakres wartości. Do porównania średnich wartości pomiędzy badanymi parametrami w poszczególnych grupach o określonym genotypie posłużono się testem Manna-Whitney'a. Do analizy związku pomiędzy polimorfizmem R576Q, a występowaniem atopii posłużono się metodą TDT (*Transmission Disequilibrium Test*), a częstość przykazy-

wania alleli porównywano używając testu McNemara. W przypadku związku określonego allelu z atopią powinien on być przekazywany z większą częstością przez heterozygotycznych rodziców dotkniętemu atopią potomstwu niż drugi allel.

WYNIKI

Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic pomiędzy stężeniami IgE, IL-4 oraz sIL-4R α w badanych grupach o określonym genotypie (tab. I). Taką samą analizę przeprowadzono w grupach rodziców badanych chorych,

Tabela I. Stężenia całkowitej IgE, IL-4 oraz sIL-4R α w surowicy w grupach badanych chorych z określonym genotypem

	Wartość badanego parametru	Genotyp QQ	Genotyp QR lub RR	Test Manna-Whitney'a (p)
Liczba badanych chorych	n=44	n=23	n=21	
Stężenie tIgE [kU/l]	233 (101-2000)	192 (115-2000)	263 (101-2000)	p>0,05
Stężenie IL-4 [pg/ml]	32 (25-135)	31 (29-135)	32 (25-62)	p>0,05
Stężenie sIL-4R [pg/ml]	20 (15-36)	20 (15-36)	20 (15-34)	p>0,05

Tabela II. Stężenia całkowitej IgE, IL-4 oraz sIL-4R α w surowicy rodziców badanych chorych w grupach o określonym genotypie

	Wartość badanego parametru	Genotyp QQ	Genotyp QR lub RR	Test Manna-Whitney'a (p)
Liczba rodziców	n=88	n=48	n=40	
Stężenie tIgE [kU/l]	50 (5-2000)	49 (5-776)	52 (15-2000)	p>0,05
Stężenie IL-4 [pg/ml]	35 (25-96)	35 (25-96)	36 (29-58)	p>0,05
Stężenie sIL-4R [pg/ml]	25 (15-36)	22 (16-34)	29 (15-36)	p>0,05

Tabela III. Wyniki testu TDT u chorych wykazujących cechy atopii z pyłkownicą oraz z nadwrażliwością na roztocza kurzu domowego

Badana grupa	# rodzice heterozygotyczni	Allel 576Q	Allel 576R	Test McNemara (p)
Wszyscy chorzy z cechami atopii	35	15	20	0,19
Chorzy na pyłkownicę	21	10	11	0,41
Chorzy z nadwrażliwością na roztocza kurzu domowego	14	5	9	0,14

również nie wykazując znamienych statystycznie różnic pomiędzy badanymi parametrami (tab. II).

We wszystkich badanych grupach chorych oznaczono stężenia alergenowo-swoistych IgE przeciw powszechnie występującym alergenom. Parametr ten stanowił wskaźnik konstytucji atopowej każdego z badanych, a stwierdzenie istotnych klinicznie stężeń alergenowo-swoistych IgE stanowiło kryterium włączenia chorego do badań.

Analiza TDT wykazała, że allel R576 i 576Q został przekazany odpowiednio 20 i 15 razy przez heterozygotycznych rodziców potomstwu dotkniętemu atopią (McNemar $\chi^2=0,72$, $p=0,19$). Ta sama analiza przeprowadzona w podgrupach chorych na pyłkovicę oraz u chorych z nadwrażliwością na roztocza kurzu domowego wykazała rozkład w przekazywanych alleli 50%:50% (10:11) w grupie chorych na pyłkovicę oraz 36%:64% na korzyść allelu R576 w grupie z uczuleniem na roztocza kurzu domowego (tab. III).

DYSKUSJA

Wyniki przeprowadzonych badań nie potwierdzają jednoznacznie, że allel R576 genu IL-4R α ma związek z fenotypem atopowym. Pomimo faktu, że zaobserwowano powiązanie częstości występowania allelu 576R z predyspozycją do ujawniania się cech atopii, nie udało się wykazać znamienności statystycznej opisanej zależności. Poczynione w niniejszej pracy obserwacje potwierdzają wyniki badań opublikowanych przez Hershey'a i wsp., który zaobserwował ścisły związek pomiędzy częstszym występowaniem allelu R576 w grupie chorych wykazujących cechy atopii w porównaniu z grupą osób bez cech atopii [15]. Sugeruje on, że mutacja Q576R jest związana ze zmianą funkcjonowania receptora dla IL-4, co może być czynnikiem predysponującym do atopii. Mechanizm tego zjawiska polega na podstawieniu Arg przez Glu, co powoduje zmniejszenie zdolności wiązania fosfatazy fosfotyrozynowej SHP-1, prowadząc do zmiany sygnału przekazywanego za pośrednictwem receptora. Nie wyklucza się jednak istnienia innego mechanizmu zmiany funkcji receptora. Obserwacjom tym przeczy Nogushi i wsp. [16],

który na podstawie obserwacji populacji japońskiej, uważa, że gen podjednostki α receptora dla IL-4 nie wpływa na procesy dziedziczenia atopii ani astmy oskrzelowej. Interesujących danych dostarczyła Ober i wsp. [17], która poddała analizie polimorfizm Q576R oddzielnie dla populacji Hutteritów, rasy białej, czarnej i Hiszpanów obserwując pozytywną korelację jedynie w populacji chorych na astmę oskrzelową Hiszpanów.

Analiza tła genetycznego chorób o charakterze kompleksowym, do których zaliczane są również schorzenia atopowe napotyka na wiele trudności ze względu na fakt, że ich fenotyp jest wypadkową współdziałania często wielu genów oraz czynników środowiskowych trudnych do obiektywnej, ilościowej oceny. Kolejną trudnością jest zebranie wystarczająco dużej reprezentatywnej, homogennej grupy. Wyniki badań opublikowanych w ostatnich latach pozwoliły w znacznym stopniu na zrozumienie genetycznych uwarunkowań wielu schorzeń, identyfikację chromosomów i zlokalizowanie genów odpowiedzialnych nie tylko za manifestację fenotypową tych schorzeń, ale również zwiększoną predyspozycję do ich ujawnienia się.

Dotychczas opublikowane wyniki badań powiązania genu IL-4A z atopią, oparte na rodzinnym modelu (*Family Based Study Design*), nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Hershey i wsp. [15] i Kruse [12] uważają, że allel R jest czynnikiem ryzyka. Noguchi i wsp. [16] nie potwierdzili tych obserwacji, natomiast Ober i wsp. [17] wykazała związek pomiędzy częstością występowania allelu Q a atopią.

Wyniki przeprowadzonych przez nas badań nie pozwalają na jednoznaczne potwierdzenie powiązania genu IL-4A z manifestacją fenotypu atopowego, choć wskazują na większą częstość transmisji allelu R576 u chorych wykazujących cechy atopii. Wyniki te są zbieżne z cytowanymi powyżej obserwacjami Hershe'ya i wsp. [15], mimo, że nasze wyniki badań nie wykazują znamienności statystycznej obserwowanej tendencji. Być może większa liczebność badanej grupy pozwoliłaby wyciągnięcie jednoznacznego wniosku popartego znamienym statystycznie wynikiem.

Piśmiennictwo

- Casolaro V, Georas SN, Song Z, Ono SJ. Biology and genetics of atopic disease. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 796-803.
- Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1139-1146.
- Rosenwasser LJ, Borish L. Promoter polymorphisms predisposing to the development of asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 13-15.
- Barnes KC. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 47-52.
- Cooke RA, Van der Veer A Jr.: Human sensitization. *J Immunol* 1916, 1: 201-305.
- Idzerda RL, March CJ, Mosley B. Human interleukin 4 receptor confer biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 1990; 171:861-873.
- Aman MJ, Tayebi N, Obirir NI, Puri RK, Modi WS, Leonard WJ. cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J Biol Chem* 1996; 271: 29265-29270.
- Ober C, Tselenko A, Willadsen SA, Newman D, Daniel R, Wu X, Andral J. Genome-wide screen for atopy susceptibility alleles in the Hutterites. *Clin Exp Allergy* 1999; 4: 11-15.
- Deichmann K, Heinzmann A, Forster J, Dischinger S, Mehl C, Brueggelolte E, Hildebrandt F. Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL-4 receptor gene. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:151-155.

10. Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J. Common polymorphisms in the coding part of the IL-4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 231: 696-697.
11. Rosenwasser L. Genetics of Atopy and Asthma: Promoter-Based Candidate Gene Studies for IL-4. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 61-64.
12. Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA. The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor α gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunol* 1999; 96: 365-371.
13. Ober C, Cox N, Parry R, Abney M, Di Rienzo A, Changyalaket B, Gidley H. Genome wide search for asthma susceptibility loci in a funder population. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1393-1398.
14. Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor α chain in IgE synthesis. *J Immunol* 1999; 162: 1227-1231.
15. Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Imoto N, Nakahara S, Matsui A, Hamaguchi H. lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor α gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 228-233.
16. Hershey KGK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain of function mutation in the α subunit of the interleukin-4-receptor. *N. Engl J Med* 1997; 24: 1720-1725.