

# Nowe aspekty genetyki astmy oskrzelowej – gen ADAM33

## New aspects of bronchial asthma genetics – ADAM33 gene

ANDRZEJ MARIUSZ FAL<sup>1/</sup>, JAN BIEGUS<sup>2/</sup>, MARTA ROSIEK<sup>2/</sup>, JÓZEF MAŁOLEPSZY<sup>1/</sup>

<sup>1/</sup> Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

<sup>2/</sup> SKN przy Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

W artykule przedstawione jest zagadnienie genetycznego podłoża astmy z uwzględnieniem najnowszych doniesień dotyczących roli genu ADAM33 w patogenezie tej choroby. Autorzy prezentują dotychczasowe osiągnięcia w poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za wystąpienie astmy. Przybliżone zostają także metody, za pomocą których możliwe jest badanie genomu: *genome wide-screen*, a także analiza konkretnych genów. Dyskutowane są polimorfizmy w obrębie genów IL-4 i IL-13, skutkujące kliniczną manifestacją choroby alergicznej. Artykuł zawiera także krótką charakterystykę całej rodziny białek ADAM, z uwzględnieniem fizjologicznej roli wybranych przedstawicieli w organizmie ludzkim. Dokładnie opisany został białkowy produkt genu ADAM33, polimorfizmy tego genu oraz ich korelacje z występowaniem astmy w badanych populacjach w świecie. Autorzy przedstawiają najbardziej prawdopodobną funkcję białka ADAM33 w patofizjologii astmy oskrzelowej. Prezentowane poglądy mogą stanowić kluczową rolę w dalszych badaniach mających na celu znalezienie skutecznej metody zarówno prewencji, jak i terapii tej choroby.

*Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(3), 111-116*

**Słowa kluczowe:** ADAM33, astma, genetyka, leczenie, badania populacyjne

In this review genetic aspects of bronchial asthma are discussed, including the role of ADAM33 gene. Authors summarise the current state of knowledge on genetic research in asthma. Most important methods for genome analysis are presented as well as an interpretation of the role of presently known genes. Also the role of polymorphism of IL-4 and IL-13 genes are underlined. Finally authors characterise the family of ADAM genes and focus on the role of its selected members in human physiology. Since the product of ADAM33 gene has been described in details recently, and gene polymorphism as well as its correlation with bronchial asthma occurrence investigated, in this paper a probable function of the product in asthma pathophysiology is also discussed. In the authors opinion investigation of the whole ADAM group, with a special respect to ADAM33 may result in a new approach to asthma treatment and prevention in the future.

*Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(3), 111-116*

**Key words:** ADAM33, asthma, genetics, treatment, population studies

Astma oskrzelowa jest jedną z najczęstszych chorób przewlekłych. Obecnie ocenia się, że choruje na nią około 155 milionów ludzi na całym świecie [1,2]. Wśród grup czynników odpowiedzialnych za rozwój astmy najczęściej wymienia się dwie: środowiskowe i genetyczne. Należy jednak zaznaczyć, że zależność pomiędzy tymi czynnikami a wystąpieniem astmy nie jest prosta i bezpośrednia. Coraz większą uwagę zwraca się na współdziałanie różnych elementów i ich wspólne indukowanie choroby. Dzięki dokładnemu poznaniu genomu oraz rozwojowi inżynierii genetycznej coraz dokładniej jesteśmy w stanie określić regiony ludzkiego DNA powiązane z występowaniem chorób alergicznych. Ze względu jednak na złożoną pato-

genezę choroby, heterogenną jej naturę, niepełną penetrację genów, obecność fenokopii, zróżnicowaną ekspresję genów, oddziaływania gen-gen oraz środowisko-gen [3] precyzyjne określenie genetycznych podstaw astmy i innych schorzeń alergicznych jest trudne.

### Przeszukiwanie genomu

Jednym ze sposobów odnajdywania fragmentów DNA biorących udział w patogenezie astmy (i innych chorób) jest przeszukiwanie całego genomu tzw. *genome-wide screen*. Polega on na ustaleniu markerów genetycznych DNA rodzin badanych, a następnie śledzenie ich dziedziczenia oraz ich zbieżności z fenotypem (np. astmą,

nadwrażliwością oskrzeli czy dodatnimi testami skórnymi). Pozwala to na określenie regionów genomu (w odniesieniu do markera genetycznego) odpowiedzialnych za wystąpienie badanego fenotypu. W przeciwieństwie do innych metod, jak analizy konkretnego genu, ten sposób pozwala na wykrycie wielu genów bez wcześniejszej wiedzy o ich funkcji, czy nawet istnieniu. Jest to zazwyczaj wstępne badanie umożliwiające odnalezienie ramion chromosomów, na których znajdują się informacje genetyczne wpływające na ekspresję choroby. Następne, bardziej szczegółowe metody, jak: klonowanie, sekwencjonowanie genów, grup genów czy regionów genomu umożliwiają odkrywanie polimorfizmów w obrębie scharakteryzowanych już wcześniej fragmentów DNA oraz łączenie ich z konkretnymi fenotypami.

Stosując metodę *genome-wide screen* przeanalizowano jedenaście różnych populacji. Próbkę badaną stanowili mieszkańcy Australii i Wielkiej Brytanii [4], USA [5,6], Niemiec [7], Francji [8], Holandii [9], dwukrotnie Japonii [10,11], Finlandii i Kanady [12], Chin, gdzie przebadano ponad 2500 osób [13], oraz Danii [14]. Wyniki tych prac różnią się od siebie, co może być uwarunkowane odmiennością przeprowadzonych badań, różnicami wielkości próby badanej, oraz faktem, że astma jest schorzeniem heterogennym. Uwzględniając kryteria interpretacji i wykazywania związków pomiędzy wynikami badań genetycznych rekomendowane przez Lander i Kruglyak [15] osiemnaście regionów genomu (tab. I) spełnia wymagane warunki:  $P \leq 0.002$  lub  $LOD \geq 1.9$  (logarytm 10 współczynnika prawdopodobieństwa) w co najmniej dwóch pracach lub  $P \leq 0.000049$  lub  $LOD \geq 3.3$  w co najmniej jednej pracy. Wyniki badań populacyjnych sugerują, że materiał genetyczny zawarty w regionach (2p, 2q, 5q, 7q i 11q) może mieć duże znaczenie w rozwoju astmy. Zależność

między astmą a regionami na 5q i 2q wydaje się być bardzo ścisła. Oprócz tego pięć niezależnych prac wykazało związek markera genetycznego na długim ramieniu chromosomu 13 z astmą, natomiast powiązanie z materiałem genetycznym znajdującym się na krótkim ramieniu chromosomu 6 oraz długim ramieniu chromosomu 12 pojawia się w badaniach 4 populacji. Sama obecność co najmniej osiemnastu regionów na różnych chromosomach związanych z patogenezą astmy ukazuje heterogenną naturę tego schorzenia. Dalsza identyfikacja konkretnych genów w obrębie odkrytych fragmentów genomu prawdopodobnie ukaże nowe elementy mające znaczenie w patogenezie choroby.

### Badania pojedynczych genów

Druga metoda, czyli analiza konkretnego genu, jest bardzo często wykorzystywanym sposobem odnajdywania w obrębie DNA zmian prowadzących do zwiększenia częstości występowania choroby. Tutaj gen jest znany i wybierany do oceny ze względu na swoją funkcję powiązaną z patofizjologią astmy. Przeprowadzono wiele badań genów znajdujących się w regionie cytokinowym chromosomu 5q (IL-4, IL-13, IL-9, IL-5, CD14, receptor  $\beta_2$ -arenergiczny [ADRB2]), HLA (*Human Leukocyte Antigen*), region na chromosomie 6p (włącznie z genem TNF (*Tumor Necrosis Factor*)), receptor IgE (FCERB) i łańcuch  $\alpha$  receptora IL-4 (IL-4 RA) na chromosomie 16p [wg 16]. Wyniki badań przeprowadzonych tą metodą niekiedy znacznie się między sobą różnią. Powiązania wykazywane w konkretnych populacjach nie są powtarzalne w innych. Można to tłumaczyć złożonością fenotypu astmy, stanowi to jednak istotny problem interpretacyjny, gdyż uniemożliwia często stwierdzenie, czy mamy do czynienia z prawdziwą korelacją, czy z błędem typu pierwszego.

W wielu pracach wykazano związek genów zaangażowanych w syntezę IL-4 oraz IL-13 z fenotypem astmy – atopii, co niewątpliwie związane jest z ich kluczową rolą w patogenezie astmy oskrzelowej [17]. Geny kodujące obie cytokiny leżą obok siebie w regionie cytokinowym na chromosomie 5q31, którego związek z astmą wykazano tak przy przeszukiwaniu genomu w populacjach, jak i przy bezpośrednim badaniu genu [18,19,20,21]. Receptory obu cytokin posiadają także wspólny łańcuch  $\alpha$ , którego gen IL-14RA, jest zlokalizowany na chromosomie 16p12. W badaniach wykazano, że polimorfizmy w obrębie samych cytokin i ich receptorów są ściśle związane z występowaniem i przebiegiem astmy.

W 1995 odkryty został polimorfizm promotora genu IL-4 (-590C/T), którego ekspresja związana jest ze zwiększeniem stężenia IgE u astmatyków [22], jakkolwiek niektóre późniejsze prace nie potwierdziły tej korelacji [23,24,25,26,27]. Ostatnio pojawiło się także doniesienie, że allel -590T jest powiązany ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia astmy w pierwszym roku życia

Tabela I. Lokalizacja chromosomowa regionów skorelowanych z astmą w różnych populacjach

Chromosom	Przykładowe populacje, w których astma wykazuje powiązanie z danym regionem
1p	Japonia
2p	Chiny
2q	Niemcy, Holandia
3p	Japonia
4q	Chiny, Dania, Japonia
5p	Francja
5q	Holandia, Japonia
6p	Niemcy, Japonia
7p	Finlandia, Francja
7q	Holandia
12q	Francja, Japonia, Holandia, Japonia
13q	Japonia, Holandia, Francja
16p	Chiny, Japonia
17q	Francja, Holandia
19q	Chiny

[28], co sugeruje, że allel ten mógłby być rewelatorem wcześniej pojawiającej się astmy, chociaż znów inni autorzy [26] nie potwierdzają takiej korelacji.

Gen IL-13 leży w odległości 25kd od wcześniej omawianego locus. Polimorfizm C/T w regionie –1111 został ściśle powiązany z wystąpieniem astmy atopowej, zaburzoną regulacją produkcji IL-13 oraz zwiększonym wiązaniem białek jądrowych [29]. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w kodującym eksonie 4 (G4464A), który skutkuje zamianą aminokwasu w pozycji 110 (z argininy na glutaminę) został zidentyfikowany i wykazano jego związek z wielkością stężenia IL-13 w surowicy [30]. Ten region białka jest również ważny w interakcji ligand-receptor [30]. Wykazano następnie powiązanie tego polimorfizmu z: podwyższonym stężeniem IgE u 1399 dzieci z trzech populacji [31], występowaniem astmy w populacji brytyjskiej i japońskiej [30], zwiększonym stężeniem całkowitego IgE oraz atopowym zapaleniem skóry [32] oraz podwyższonym stężeniem całkowitej i swoistych IgE (lecz nie astmą) w populacji chińskiej [33]. Niezależnie od wyników badań, w których nie wykazano związku między Arg110Gly locus a chorobą [34,35], polimorfizm ten koreluje z astmą w wielu różnych populacjach, co może dowodzić, że zmiany w obrębie genu IL-13 są odpowiedzialne za występowanie osobniczej podatności na rozwój astmy.

Gen kodujący łańcuch  $\alpha$  receptora dla IL-4 i IL-13, znajdujący się na chromosomie 16p12, był także intensywnie badany. Opisanych zostało czternaście różnych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu [36,37,38,39], dziesięć z nich skutkowało zamianą aminokwasu. Trzy z powstałych tak wariantów powodują zaburzenie funkcji receptora. Zamiana Ile50Val (znajdująca się w domenie zewnątrzkomórkowej) skutkuje zwiększeniem: aktywacji STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*), pobudzenia procesów transkrypcyjnych oraz ekspresji cząsteczek CD23 [40,41]. Ten wariant powiązano z astmą w populacji japońskiej [26,40,41]. Co więcej, okazuje się, że w różnych populacjach różne polimorfizmy opisywanych genów prowadzą do zwiększenia prawdopodobieństwa rozwoju astmy i chorób atopowych.

### ADAM33-Astma

W lipcu 2002r. w Nature [42] ukazała się praca przedstawiająca powiązanie genu ADAM33 (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) z chorobami płuc. Przeszukiwanie genomu (*genom-wide screen*) wśród 460 białych rodzin ze Stanów Zjednoczonych i Wielkiej Brytanii pozwoliło zidentyfikować locus na chromosomie 20p13, które wykazywało wysoką korelację z astmą LOD=2,94, oraz z astmą i nadwrażliwością oskrzeli LOD=3,93 [42]. Badania nad 135 polimorfizmami w 23 genach doprowadziły do identyfikacji genu ADAM33 jako znacząco związanego z astmą. Wykryto 24 znaczące polimorfizmy pojedyn-

czego nukleotydu występujące w obu lub tylko w jednej populacji (UK lub USA), z czego przeważająca ilość (14) znajdowało się w genie ADAM33 [42]. Rozpatrując obie populacje równocześnie gen ten, jako jedyny, wykazywał sześć istotnych statystycznie ( $P=0,03-0,006$ ) polimorfizmów, (w osobnej próbie brytyjskiej (siedem) ( $P=0,04-0,004$ ), a w oddzielnej amerykańskiej (sześć) ( $P=0,03-0,003$ )). W złączonych populacjach wykazano znaczące powiązanie z astmą pięciu par polimorfizmów w genie ADAM33 ( $P<0,001$ ), z najbardziej skorelowaną parą sięgającą wartości  $P=0,00004$  [42]. Łącznie znanych jest już 55 polimorfizmów opisywanego genu. Część z nich znajduje się w miejscach nie kodujących (w obrębie intronów lub w nie ulegających translacji regionach 3'). Takie ich umiejscowienie może skutkować alternatywnym *splicingiem*, wpływem na efektywność *splicingu* lub obróbkę m-RNA podobnie jak dzieje się to w innych tak umiejscowionych chorobotwórczych genach [43]. Jeden ze znacząco powiązanych z astmą polimorfizmów, pojawiający się w brytyjskiej próbie, zlokalizowany jest w regionie 3' genu i prowadzi do zamiany aminokwasu w ogonie cytoplazmatycznym białka, podobnie dwie zamiany aminokwasów domeny cytoplazmatycznej występują w próbie amerykańskiej [42].

### Charakterystyka grupy białek ADAM

Rodzina genów ADAM składa się z co najmniej 30 genów, których produkty białkowe spełniają w organizmie różne, w większości nie do końca poznane funkcje (tab. II). Białka ADAM są zakotwiczone w błonie komórkowej metaloproteazami o różnorodnych funkcjach, wśród których jest m.in. eliminacja z powierzchni komórki protein, takich jak cytokiny czy ich receptory [44]. Z 30 białek 18 ma aktywność metaloproteazy. Wszystkie białka tej grupy składają się z 8 domen, z których tylko 3 ostatnie różnią je od białek SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinases*). Idąc

Tabela II. Funkcja wybranych białek ADAM

Białko ADAM	Funkcja
ADAM 1/ fertilin- $\alpha$	Związane z zapłodnieniem
ADAM 2/ fertilin- $\beta$	Związane z zapłodnieniem
ADAM 8	Związany z procesami immunologicznymi
ADAM 9	Uwalnia czynnik podobny do EGF wiążącego heparynę
ADAM 10	Uwalnia domenę $\delta$ z receptora Notch, Regulacja różnicowania kom. nerwowych
ADAM 12	Związany z procesem osteogenezy i fuzji kom. mięśniowych
ADAM 15	Reguluje funkcję naczyń
ADAM 17/ (TACE)	Uwalnia TNF
ADAM 28	Związane z dojrzewaniem plemników i funkcją leukocytów
ADAM 33	Astma ??

od N-końca, domeny te to: sekwencja sygnałowa – biorąca udział w sekrecji, prodomena – poddawana obróbce w procesie aktywacji, blokująca aktywność proteazy, domena katalityczna – metaloproteaza zależna od Zn, dysintegrynowa – mająca właściwości adhezyjne, region bogaty w cysteinę – domena fuzyjna, domena podobna do czynnika EGF (*epidermal-growth-factor*) (EGF-like), domena przezłonowa oraz domena cytoplazmatyczna [45]. Domena dysintegrynowa (ok. 80 aminokwasowa) z 15 silnie konserwatywnymi resztami cysteinowymi, służy niektórym białkom do wiązania integryn, lecz rola tej części białka nie u wszystkich przedstawicieli tej grupy jest poznana. Białka ADAM o właściwościach metaloproteazy są produkowane w postaci zymogenów. Za brak aktywności odpowiedzialny jest kompleks utworzony między cysteiną a jonami Zn. Aktywacja następuje po dysocjacji cysteiny z kompleksu, z następującymi zmianami konformacyjnymi lub przez enzymatyczne rozszczepienie prodomeny. Proces ten jest określany jako „*cystein switch*” [46]. Cała grupa białek spełnia w organizmie cztery podstawowe funkcje: proteolityczną, adhezyjną, biorą udział w dwukierunkowym przekazywaniu sygnału oraz w fuzji z błoną komórkową [47,48]. Za przekazywanie sygnałów, zarówno do komórki, jak i z komórki, odpowiedzialne są białka ADAM zawierające w części cytoplazmatycznej domenę SH3 (ADAM 8, 9, 12), co umożliwia im przyłączanie białka Src. Przesyłanie informacji z komórki możliwe jest dzięki interakcji tych białek z integrynami i innymi receptorami [49].

Białka ADAM można odnaleźć prawie we wszystkich tkankach: najądrzu, nabłonku, łożysku, jajnikach, spermie, gruczole piersiowym, mięśniach szkieletowych, sercu, wątrobie, nerkach, jelicie grubym, mózgu, grasicy, śledzionie, płucach, kościach, monocytach, makrofagach i leukocytach [45], ponadto zostały one zlokalizowane także w niektórych nowotworach [50]. Z całej grupy 15 jej przedstawicieli występuje w tkankach somatycznych, natomiast 15 zostało zlokalizowanych w jądrze, z czego 12 występuje tylko w jądrze, a 3 głównie w tej lokalizacji. Odkrycie to sugeruje ścisły związek między funkcją białek ADAM i procesem spermatogenezy i zapłodnienia.

Niektóre białka z omawianej rodziny posiadają zdolność rozszczepiania protein zakotwiczonych w błonie komórkowej. W wyniku tej reakcji powstają dwa produkty, z których jeden jest białkiem rozpuszczalnym i niezwiązanym z błoną, a drugi stanowi pozostałą część białka zakotwiczona w błonie. Właściwość tą posiadają białka ADAM 17, 10, 9, znane są ich substraty i funkcje, substraty pozostałych proteaz jak np. ADAM 12 nie zostały zidentyfikowane.

### Charakterystyka ADAM33

Na początku 2002r. został zidentyfikowany i scharakteryzowany ADAM33 (jego postać mysia i ludzka) [51]. Białka będące produktem tego genu składają się z 797

(postać mysia) i 813 (ludzka forma) aminokwasów i wykazują 70% homologię w stosunku do siebie. Obie proteiny mają typową, charakterystyczną dla całej rodziny budowę (zbudowane są z ośmiu domen). W ludzkiej odmianie występują cztery miejsca możliwej N-glikolizacji. Całe białko w organizmie człowieka kodowane jest przez 22 egzony. Wnikliwa ocena składu aminokwasowego tej proteiny doprowadziła do identyfikacji dwóch jej izoform ( $\alpha$  i  $\beta$ ) [51]. Izoforma  $\beta$ , w wyniku alternatywnego *splicingu* egzonu 17, jest pozbawiona 26 reszt aminokwasowych znajdujących się na granicy pomiędzy domeną bogatą w cysteinę i EGF-like domeną. Natomiast dłuższa forma zawierająca tę sekwencję nazwana została izoformą  $\alpha$ . Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasów ADAM33 w stosunku do innych przedstawicieli tej grupy wykazała wysoką homologię tego białka w stosunku do całej rodziny protein, tak pochodzenia ludzkiego, jak i pochodzących z innych gatunków (myszy, małp, *Xenopus* i *Caenorhabditis*) [51]. Syntezę białka ADAM33 wykazano w fibroblastach i w komórkach mięśni gładkich płuc, natomiast nie stwierdzono jej w komórkach nabłonka płuc [42]. Proteina ta jest syntetyzowana w znaczących ilościach m.in.: w mózgu, sercu, nerkach, jądrach i płucach ludzi dorosłych.

### ADAM33 a patofizjologia astmy i *remodelingu*

Proces *remodelingu* zachodzący w tkance płucnej jest związany z aktywacją jednostek nabłonkowo-mezenchymalnych prowadzącą do proliferacji biosyntetycznie aktywnych fibroblastów, myofibroblastów i mięśni gładkich, co stanowi cechę *remodelingu* oraz towarzyszy nadwrażliwości oskrzeli (BHR). Rola ADAM33 w *remodelingu* oraz BHR jest poparta rezultatami wyżej przedstawionymi, jak i ekspresją w ludzkich fibroblastach i mięśniach gładkich płuc. Charakter ekspresji tego genu sugeruje, że wahania w jego aktywności lub poziomie ekspresji mogą być odpowiedzialne raczej za zaburzenia struktury i funkcji samych dróg oddechowych niż za wpływ na immunologiczną komponentę patofizjologii astmy. W dodatku znane funkcje całej rodziny białek ADAM np. w fuzji komórek, uwalnianiu czynników wzrostu [52] mogą potwierdzać rolę ADAM33 w patogenezie *remodelingu* tkanki płucnej. Białka te mogą umożliwiać proliferację i łączenie się komórek mięśni gładkich oraz fibroblastów skutkujące pogrubieniem ścian dróg oddechowych. Ich działanie opiera się tak na regulacji interakcji pomiędzy komórkami np. ich fuzji, sprawowaniem nadzoru nad gęstością rozmieszczenia receptorów na błonie komórkowej, jak i uwalnianiu niektórych cytokin.

### Podsumowanie

Ponieważ nie we wszystkich wcześniejszych badaniach udało się wykazać odpowiednio dużą korelację genu ADAM33 z astmą, określanie go jako podstawowego

w patogenezie choroby wymaga dokładnego zbadania i wnikliwej oceny. Obecnie najbardziej prawdopodobne jest, że polimorfizmy w obrębie tego *locus* stanowią poważne obciążenie u Brytyjczyków i Amerykanów, natomiast nie jest jasna jego rola w innych populacjach. Podobnie jak gen znajdujący się na chromosomie 14q24, wykazuje silne powiązanie z astmą tylko w populacji islandzkiej, co ukazuje heterogenność choroby oraz wagę różnych czynników środowiskowych, wpływających na różne geny w odmiennych populacjach.

Większość badań prowadzonych do tej pory starała się zidentyfikować geny powiązane z fenotypem, którym była obecność astmy lub jej brak. W tych pracach choroby nie traktuje się jeszcze w sposób jakościowy, stąd mogą one doprowadzić do znalezienia regionów DNA biorących udział w inicjacji samego schorzenia, a nie wpływających na ciężkość jego przebiegu i progresję. Największym wyzwaniem na przyszłość będzie wykrycie i zrozumienie mechanizmów intrakcji pomiędzy czynnikami środowiskowymi a genami prowadzące do wystąpienia astmy.

## Piśmiennictwo

1. Asher MI, Keil U, Anderson HR i wsp. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J* 1995; 8: 483-491.
2. Beasley R. The burden of asthma with specific reference to the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 482-489.
3. Collila S, Ober C, Beaty T i wsp. An examination of gene-environment interaction in a linkage study of asthma and household smoking. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 213-217.
4. Daniels SE, Bhattacharrya S, James A i wsp. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996; 383: 247-250.
5. Xu J, Meyers DA, Ober C i wsp. Genome-wide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three U.S. populations: collaborative study on the genetics of asthma. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1437-1446.
6. Mathias RA, Freidhoff LR, Blumenthal MN i wsp. Genome-wide linkage analyses of total serum IgE using variance components analysis in asthmatic families. *Genet Epidemiol* 2001; 20: 340-355.
7. Wjst M, Fischer G, Immervoll T i wsp. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 1996; 58: 1-8.
8. Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M i wsp. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1812-1818.
9. Xu J, Postma DS, Howard TD i wsp. Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1163-1173.
10. Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M i wsp. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12 B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* 2000; 66: 152-160.
11. Yokouchi Y, Shibasaki M, Noguchi E i wsp. A genome-wide linkage analysis of orchard grass-sensitive childhood seasonal allergic rhinitis in Japanese families. *Genes Immun* 2002; 3: 9-13.
12. Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD i wsp. A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 2001; 28: 87-91.
13. Xu X, Fang Z, Wang B i wsp. A genome-wide search for quantitative-trait loci underlying asthma. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1271-1277.
14. Haagerup A, Bjerke T, Schoitz PO i wsp. Allergic rhinitis-a total genome-scan for susceptibility genes suggests a locus on chromosome 4q24-q27. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 945-952.
15. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995; 11: 241-247.
16. Ober C, Moffatt MF. Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. *Clin Chest Med* 2000; 21: 245-261.
17. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X i wsp. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282: 2258-2261.
18. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR i wsp. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31. 1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994; 264: 1152-115.
19. Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI i wsp. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 1994; 23: 464-470.
20. Walley AJ, Wiltshire S, Ellis CM i wsp. Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits. *Genomics* 2001; 72: 15-20.
21. Holberg CJ, Halonen M, Solomon S i wsp. Factor analysis of asthma and atopy traits shows 2 major components, one of which is linked to markers on chromosome 5q. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 772-780.
22. Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK i wsp. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 74-78.
23. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I i wsp. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* 2000; 21: 60-64.
24. Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ i wsp. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 919-922.
25. Sandford AJ, Chagani T, Zhu S i wsp. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 135-140.
26. Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y i wsp. Childhood atopic asthma: positive association with a polymorphism of IL-4 receptor alpha gene but not with that of IL-4 promoter or Fc epsilon receptor 1 beta gene. *Exp Clin Immunogenet* 2000; 17: 63-70.
27. Hijazi Z, Haider MZ. Interleukin-4 gene promoter polymorphism [C590T] and asthma in Kuwaiti Arabs. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 190-194.
28. Zhu S, Chan-Yeung M, Becker AB i wsp. Polymorphisms of the IL-4, TNF-alpha, and Fc epsilon R1beta genes and the risk of allergic disorders in at-risk infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1655-1659.
29. van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC i wsp. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* 1996; 1: 61-65.
30. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M i wsp. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 549-559.

31. Graves PE, Kabesch M, Halonen M i wsp. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 506-513.
32. Liu X, Nickel R, Beyer K i wsp. An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS- 90). *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 167-170.
33. Leung TF, Tang NL, Chan IH i wsp. A polymorphism in the coding region of interleukin-13 gene is associated with atopy but not asthma in Chinese children. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1515-1521.
34. Ober C, Tsalenko A, Parry R i wsp. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1154-1162.
35. Celedon JC, Soto-Quiros ME, Palmer LJ i wsp. Lack of association between a polymorphism in the interleukin-13 gene and total serum immunoglobulin E level among nuclear families in Costa Rica. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 387-390.
36. Deichmann K, Bardutzky J, Forster J i wsp. Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 696-697.
37. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA i wsp. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 1997; 337: 1720-1725.
38. Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A i wsp. Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 517-526.
39. Wu X, Di Rienzo A, Ober C. A population genetics study of single nucleotide polymorphisms in the interleukin 4 receptor alpha (IL4RA) gene. *Genes Immun* 2001; 2: 128-134.
40. Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ i wsp. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 1999; 162: 1227-1231.
41. Izuhara K, Yanagihara Y, Hamasaki N i wsp. Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 65-71.
42. van Eerdeewegh P, Little RD, Dupuis J i wsp. Association of ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002; 418: 426-430.
43. Maquat LE. The power of point mutations. *Nature Genet* 2001; 27; 5-6.
44. Mullberg J, Althoff K, Jostock T i wsp. The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11; 27-38.
45. Wolfberg, Tyra G, White i wsp. ADAMs in Fertilization and Development. *Dev Biol* 1996; 180: 389-401.
46. van Wart H.E, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5578-5582.
47. Wjst M, Immervoll T. An internet linkage and mutation database for the complex phenotype asthma. *Bioinformatics* 1998; 14: 827-828.
48. Lander ES, Linton LM, Birren B i wsp. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
49. Weshamp G, Kratzschmar, Reid MS i wsp. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol* 1996; 132: 717-726.
50. Katagiri T, Harada Y, Emi M i wsp. Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68: 39-44.
51. Yoshinaka T, Nishii K, Yamada K i wsp. Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene* 2002; 282: 227-236.
52. Black RA, White JM. ADAMs focus on protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 34-38.