



Badania genetyczne u chorych z atopowym zapaleniem skóry

B. Nedoszytko, A. Wilkowska, J. Roszkiewicz



Katedra i Klinika Dermatologii,
Wenerologii i Alergologii
AM w Gdańsku.

Atopowe zapalenie skóry (AZS) to przewlekła, zapalna choroba naskórka i skóry właściwej, przebiegająca z nasilonym świądem, typowym umiejscowieniem i morfologią zmian, współistniejącą z innymi chorobami atopowymi (alergiczny nieżyt nosa i spojówek, astma oskrzelowa) u chorego lub w jego rodzinie.



AZS dotkniętych jest 5% wszystkich dzieci i 1-3% osób dorosłych

Patogeneza **AZS** - podstawowa przyczyna nieznana

- **Zaburzenia odpowiedzi humoralnej**
 - ▶ zapalenie skóry uwarunkowane aktywacją limfocytów Th2
 - ▶ podwyższony poziom IgE
 - ▶ nadwrażliwość na antygeny pokarmowe i środowiskowe
- **Defekty odpowiedzi komórkowej**
 - ▶ ↓ Ts CD8+, Treg CD4+Cd25+, NK,
 - ▶ ↓ syntezy IFN-gamma i odpowiedzi na mitogeny, obwodowa eozynofilia, nieprawidłowa chemotaksja neutrofili
- **Zaburzenie odporności nieswoistej**
 - ▶ ↓ peptydów przeciwbakteryjnych (HBDβ-2, katelicidyny)
 - ▶ Kolonizacja skóry przez *S. aureus*, *M. furfur*
- **Wrodzony defekt ektodermalny**
 - ▶ ↓ niedobór 6-desaturazy, ceramidów,
 - ▶ ↑ ilości proteaz, ↓ inhibitorów proteaz
 - ▶ Nieprawidłowa reakcja naczyń - biały dermatografizm
 - ▶ ↑ wytwarzanie potu
- **Zaburzenia neurowegetatywne** - ↓ próg świądu

Genetyczna predyspozycja do atopii opisana została na początku XXw.

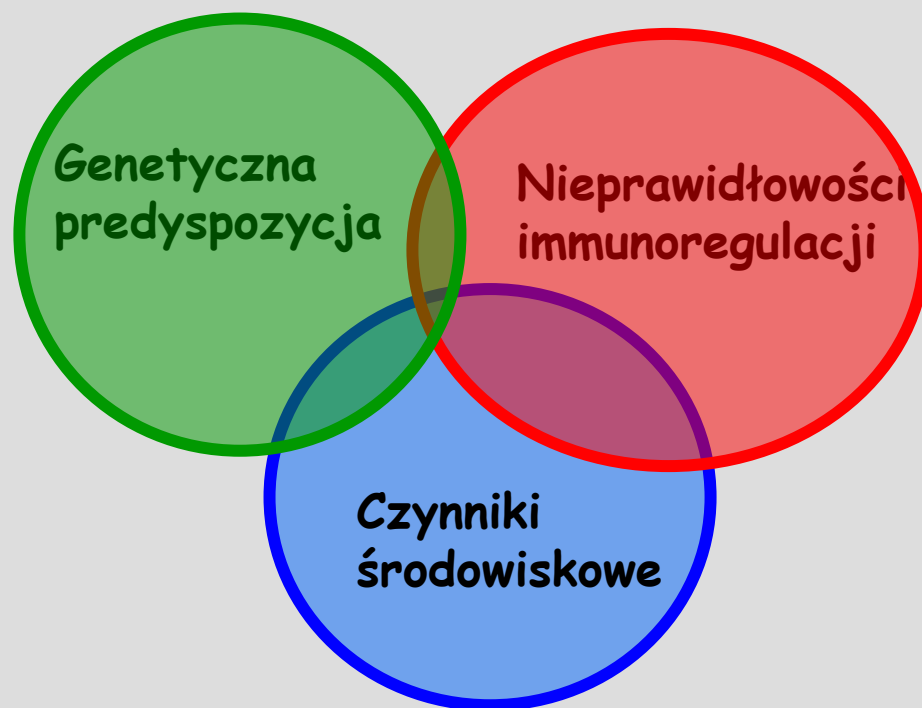
W roku 1916 Cooke i van der Veer stwierdzili iż ponad 50% pacjentów z alergicznym katarzem i astmą mają pozytywny wywiad rodzinny.

1923 rok - Coca i Cooke wprowadzili pojęcie atopii:

„Atopia jest to genetycznie uwarunkowana skłonność do chorobowego reagowania na styczność z pospolitymi substancjami otaczającego środowiska, nieszkodliwymi dla większości osób w normalnej populacji”.

Zaproponowali także **jednogenowy, autosomalny dominujący** model dziedziczenia choroby.

Atopowe zapalenie skóry to choroba wieloczynnikowa (poligenowa), w etiopatogenezie której odgrywa rolę wiele nieallelicznych genów oraz wiele indukujących ją czynników środowiskowych.



Patogeneza AZS

- ▶ Zaburzenia genetyczne
- ▶ Zaburzenia epigenetyczne
- ▶ Efekt działania czynników środowiskowych



Podłoże genetyczne AZS:

- u około 70% pacjentów z AZS rodzinny wywiad atopowy
- bliźnięta monozygotyczne mają 72-86% ryzyko wystąpienia AD w porównaniu z 21-23% dla bliźniąt dizygotycznych
- bliźnięta monozygotyczne wychowywane razem lub oddzielnie wykazują większą zgodność objawów, aniżeli bliźnięta dizygotyczne wychowywane razem lub oddzielnie
- Ryzyko wystąpienia atopii u dzieci zdrowych rodziców wynosi ok. 5-15%,
- jeżeli jeden z rodziców choruje ryzyko wystąpienia AZS u ich dzieci wynosi 56%, jeżeli oboje chorują ryzyko wzrasta do 80%
- jeżeli choruje matka, to ryzyko wystąpienia AZS u dziecka wynosi 57%, podczas gdy w przypadku choroby ojca ryzyko jest mniejsze (46%).

Genetyczne cechy AD:

Dziedziczenie poligenowe – więcej niż jeden gen ma wpływ na powstanie AD

Heterogenność genetyczna – u różnych chorych choroba może być wywoływana przez mutacje w różnych allelach

Niepełna penetracja – u nosicieli genu brak objawów choroby

Fenokopia – choroba może być wywoływana wyłącznie przez czynniki środowiskowe

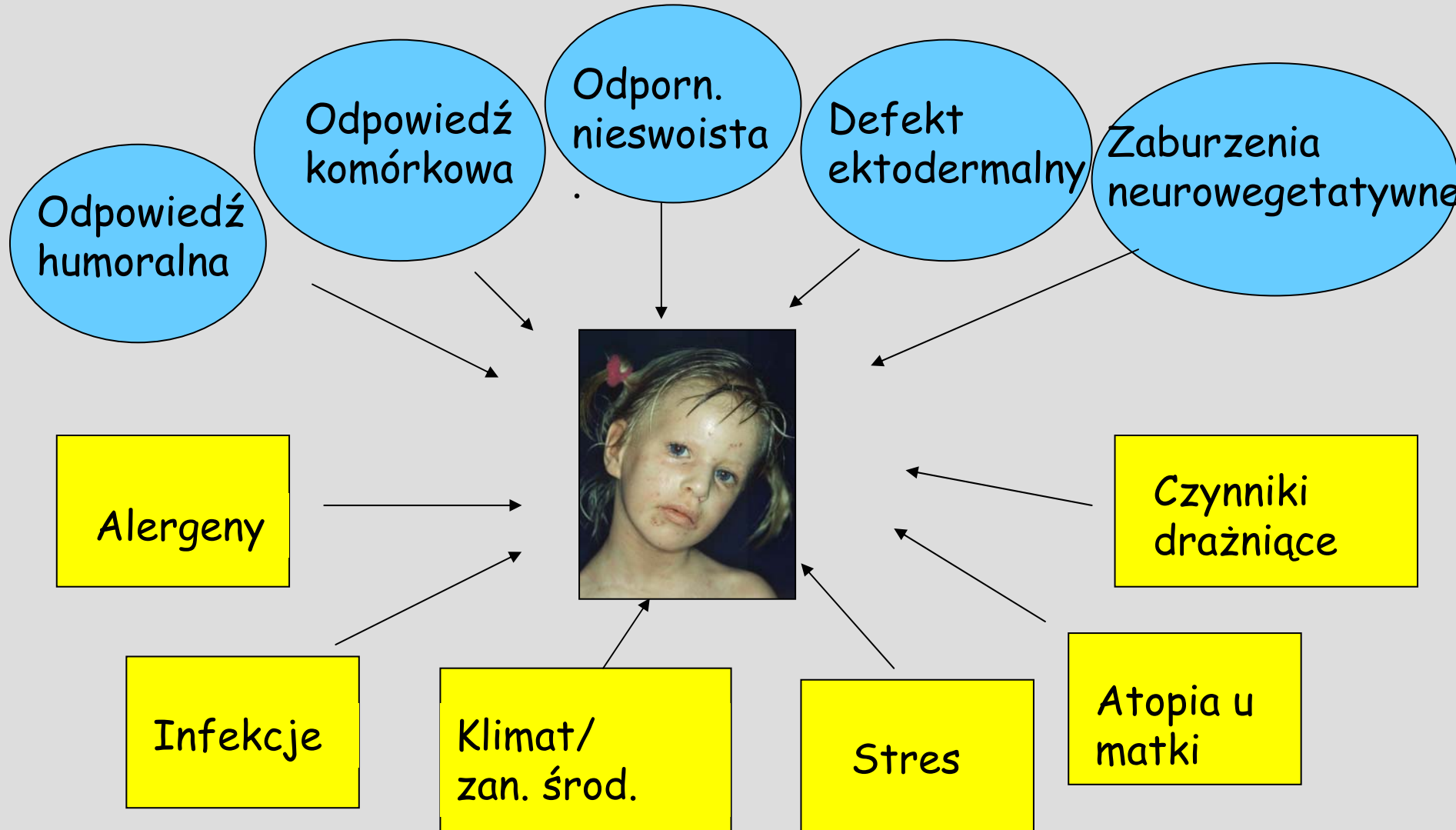
Piętnowanie genomowe rodzicielskie (imprinting) – u chorych z AD zachodzi ekspresja alleli dziedziczonych od jednego z rodziców.

Patogeneza AZS

- ▶ Zaburzenia genetyczne
- ▶ Zaburzenia epigenetyczne
- ▶ Efekt działania czynników środowiskowych

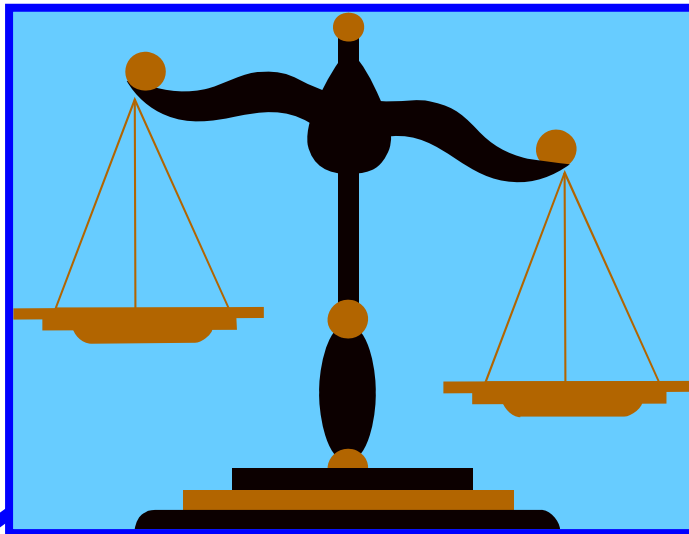


Czynniki genetyczne



Czynniki środowiskowe

Geny (70%)



**Środowisko
(30%)**

Patogeneza AZS

- ▶ Zaburzenia genetyczne
- ▶ Zaburzenia epigenetyczne
- ▶ Efekt działania czynników środowiskowych



Zaburzenia epigenetyczne w AZS

- ▶ Niezgodność objawów u bliźniąt MZ (25%)
- ▶ Regulacja ekspresji genów (metylacja CpG, acetylacja, fosforylacja histonów)
 - Metylacja promotora wyłącza gen
 - Dziedziczny wzorzec metylacji po rodzicach (imprinting)
 - ▶ Dokładność procesu metylacji 97-99,9%
 - ▶ Nowa metylacje 3-5%
- ▶ Dieta, a metylacja (źródłem -CH₃ wit B12, kwas foliowy)
- ▶ Retrowirusy, retrotranspozony
- ▶ iRNA (rybozomy?)
- ▶ Defekt białek chaperonowych (HSP-90)

Patogeneza AZS

- ▶ Zaburzenia genetyczne
- ▶ Zaburzenia epigenetyczne
- ▶ Efekt działania czynników środowiskowych



Metodyka badania genetycznego podłoża chorób wieloczynnikowych:

Analiza mikrosatelitarnego DNA:

- krótkie powtórzenia tandemowe [STRP].
- badania dziedziczenia markerów (transmission disequilibrium test -TDT).

Badanie sprzężeń i analiza genów kandydatów podatności na atopię

- badania sprzężeń w rodzinach z AZS

Badania polimorfizmów/mutacji genów kandydatów

- Badania funkcjonalne SNPs - (wpływ na ekspresję genu, funkcję białka)

Badania genetyczne chorób ze współistnieniem azs

Analiza ekspresji genów z zastosowaniem mikromacierzy

Jednonukleotydowe polimorfizmy (SNPs)

Genom człowieka:	2.7-2.9 mld pz
Liczba genów:	25 000-35 000
1.42 milionów SNPs:	1 SNP/ 1.9 kb
	1 SNP w sekw. kodującej/ 1.08 kb

- ▶ 93% loci genowych ma co najmniej 1 SNP
- ▶ 59% loci genowych >5 SNPs
- ▶ 39% loci genowych >10 SNPs

- ▶ Badania sprzężenia w rodzinach z AZS wyznaczyły 19 regionów na 12 chromosomach zawierających geny podatności na AZS

Reference	Study population	Sample	Phenotypes	Regions of highest linkage
Lee et al. 2000 [25]	European	199 families with ≥ 2 affected siblings	AD Allergic sensitization	3q21 ($p=8.42 \times 10^{-6}$) 3q21 ($p=6.7 \times 10^{-4}$)
Cookson et al. 2001 [28]	British	148 nuclear families recruited via children with active AD	AD AD plus asthma Σ serum IgE	1q21 ($p=0.0005$) 17q25 ($p=0.0004$) 20p ($p=0.0005$) 16q-tel ($p=0.0007$) 5q31 ($p=0.004$)
Bradley et al. 2002 [26]	Swedish	109 families (197 affected full-sib pairs, 9 affected half-sib pairs)	AD AD plus specific IgE Extreme AD Severity score of AD	3p24-22 ($p<0.001$) 5p13 ($p<0.005$) 6q16 ($p<0.01$) 10p13-12 ($p<0.01$) 18q21 ($p<0.001$) 4q24-26 ($p<0.005$) 6p ($p<0.005$) 1p32 ($p<0.01$) 18p ($p<0.005$) 21q21 ($p<0.005$) 7p14 ($p<0.005$) 13q14 ($p<7.4 \times 10^{-4}$) 15q14-15 ($p<7.4 \times 10^{-4}$) 17q21 ($p<7.4 \times 10^{-4}$) 3q14 ($p<7.4 \times 10^{-4}$)
Haagerup et al. 2004 [27]	Danish	23 affected sib-pair families	AD plus specific IgE	3p26-24 ($p \leq 0.001$) 4p15-14 ($p \leq 0.0126$) 18q11-12 ($p=0.004$) 18q11-12 ($p \leq 0.004$)

19 regionów - 1p32, 1q21, 3q14, 3q21, 3p24-22, 4p15-14, 4q24-26, 5p13, 5q31, 6p, 6q16, 7p14, 13q13, 15q14, 16q, 17q21, 18p, 18q11-12, 21q21,

4 regiony w co najmniej dwóch badaniach -

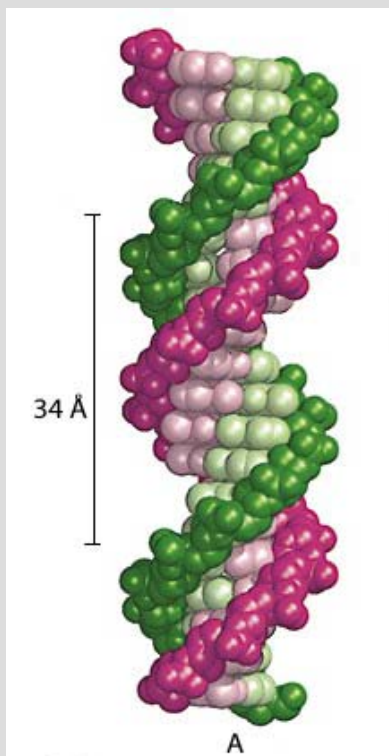
3q, 3p, 17q, 18q

Zdefiniowano 6 regionów genomu człowieka potencjalnie zawierających geny AZS (OMIM):

ATOD1	- 3q21
ATOD2	- 1q21
ATOD3	- 17q11-q24
ATOD4	- 20p
ATOD5	- 13q12-q14
ATOD6	- 5q31-q33

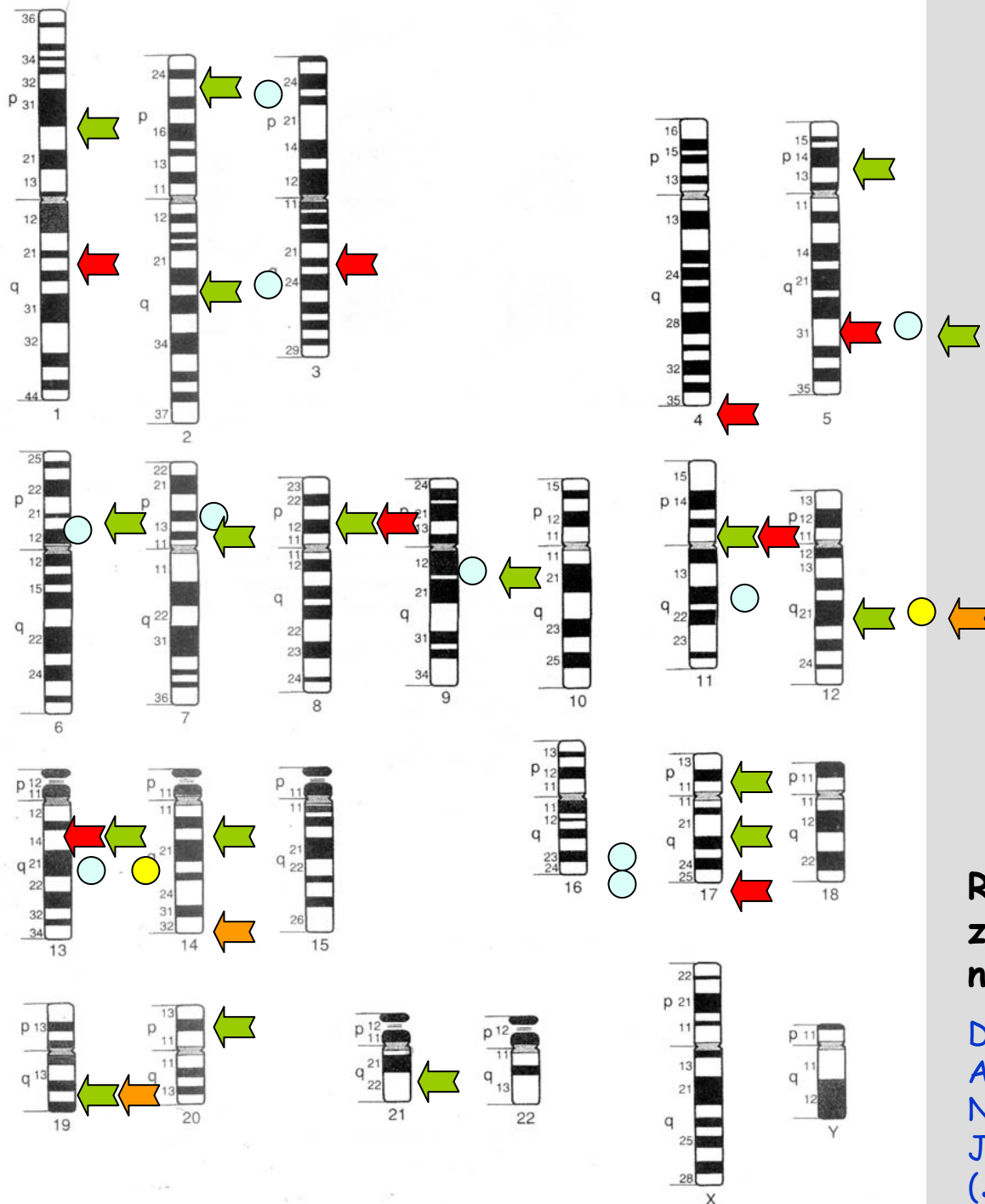
OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>

Ile jest genów AZS?



24 geny warunkujące triadę chorób atopowych (alergia, astma, AD)

1. Arylamine N-acetyltransferase
2. $\beta 2$ adrenergic receptor
3. CCR3
4. CD14
5. CTL-4
6. Fc ϵ RI β
7. Glutathione S transferase
8. Histamine N-methyltransferase
9. IFN- γ
10. IL-4
11. IL-4R α
12. IL-9
13. IL-10
14. IL-13
15. IRF-1
16. Lymphotoxin- α
17. MCP-1
18. NOS1
19. PAF acetyl hydrolase
20. RANTES
21. SPINK5
22. TGF- β 1
23. TLR4
24. TNF- α



Badana cecha
kliniczna:

AZS



Astma



BHR



Stężenie IgE



Liczba eozynofili



**Regiony chromosomowe
zawierające geny podatności
na AZS i inne choroby atopowe**

Dane z badań populacji:
Australijskiej, Hutterites,
Niemieckiej, Szwedzkiej,
Japońskiej, Francuskiej i Brytyjskiej
(Sengler i wsp. 2001)

Gene	Gene name	Location	Variant	Phenotype	Population	Association?	Reference	
<i>TLR2</i>	Toll-like receptor 2	4q32	Arg753Gln	Severe AD	German	Yes	[82]	
<i>IRF2</i>	Interferon regulatory factor 2	4q35	-467 G/A	AD	Japanese	Yes	[87]	
<i>CSF2</i>	Colony-stimulating factor 2	5q31	-677 A/C	AD	British	Yes	[88]	
			3606 T/C, 3928 C/T	AD at 12 and 24 months	Canadian	Yes	[89]	
<i>IL4</i>	Interleukin-4	5q31	-590 C/T	AD	Japanese	Yes	[90]	
				Extrinsic AD	German	Yes	[64]	
				AD	Australian	No	[91]	
				Intrinsic AD	Japanese	No	[62]	
<i>IL13</i>	Interleukin-13	5q31	Arg130Gln	AD	Canadian	Yes	[51]	
				AD	Japanese	Yes	[52]	
				AD	German	Yes	[53]	
				-1111 C/T	AD	Dutch	Yes	[54]
				AD	Japanese	No	[52]	
<i>IL5</i>	Interleukin-5	5q31	-703 C/T	Blood eosinophilia in AD	Japanese	Yes	[92]	
<i>CD14</i>	Monocyte differentiation antigen CD14	5q31	-159 C/T	AD (interaction with dog ownership)	American	Yes	[80]	
				AD	German	No	[93]	
<i>IL12B</i>	Interleukin-12B	5q31-33	1188 A/C	AD, Psoriasis	Japanese	Yes	[94]	
<i>SPINK5</i>	Serine protease inhibitor, Kazal-type 5		Glu420Lys	AD	British	Yes	[74]	
				AD	Japanese	Yes	[75]	
				AD	Japanese	Yes	[76]	
				Asthma with AD Disease severity and food allergy in AD	German	Yes	[77]	
				Japanese	Yes	[78]		
<i>FCER1B</i>	High affinity IgE receptor, beta chain	11q13	Rsa1n2, Rsalex7	AD	British	Yes	[95]	
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase, P1	11q13	Ile105Val	AD	Russian	Yes	[96]	
				Haplotypes	AD	Russian	Yes	[97]
<i>PHF11</i>	Plant homeodomain Zink finger 11 protein	13q14	T/C intron3, G/A 3' UTR	Childhood AD	Australian	Yes	[98]	
<i>CMA1</i>	Mast cell chymase	14q11	BstXI	AD	Japanese	Yes	[99]	
				AD	Japanese	Yes	[100]	
				AD	Japanese	No	[101]	
				AD	Italian	No	[102]	
				-1903 G/A	IgE levels in AD	British	Yes	[103]
<i>IL4RA</i>	Interleukin 4 receptor α chain	16p12	Gln551Arg	Severe AD	American	Yes	[59]	
				Adult AD	Japanese	Yes	[60]	
				AD (interaction with infection)	British	Yes	[61]	
				Intrinsic AD	Japanese	No	[62]	
				-3223 C/T	Extrinsic AD	German	Yes	[64]
<i>CARD15</i>	Caspase recruitment domain- containing protein 15	16q12	2722 G/C	AD	Japanese	Yes	[65]	
				AD	German	Yes	[104]	
<i>RANTES</i>	Regulated upon activation, normally T cell expressed + secreted	17q11-q12	-403 A/G	AD	German	Yes	[105]	
				AD	Hungarian	No	[106]	
<i>EOTAXIN</i>	Eotaxin	17q21	-426 C/T, -384 A/G	IgE levels in AD	Japanese	Yes	[107]	
<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor β 1	19q13.1	Arg25Pro	AD	British	Yes	[108]	
<i>SCCE</i>	Stratum corneum chymotryptic enzyme	19q13	AACCins	AD	British	Yes	[109]	

AD Atopic dermatitis, IgE immunoglobulin E

Sprzężenie z AZS
wykazano do tej pory
dla 19 genów na 8
różnych chromosomach
(Hoffjan i Epplen
(2005))

Geny AZS:

- ▶ Gen receptora dla IgE (FcRI β)
- ▶ Geny cytokin, czynników wzrostu i ich receptorów
 - IL-4, IL-13, IL-5, IL-12B, IL-18
 - IL-4R, IL-13R
 - TNF α , TGF-beta, GM-CSF, CTLA4, CSF2
- ▶ Gen odporności nieswoistej (TLR-2, TLR-9, CARD15, CD14)
- ▶ Geny chemokin (RANTES, eotaksyna)
- ▶ Geny kodujące czynniki transkrypcji
 - STAT-6, interferon regulatory factor (IRF2), PHF11 (białko z p. cynk), Tbet
- ▶ Geny kodujące receptory dla hormonów (β 2AR, glukokortykoidów)
- ▶ Geny kodujące białka strukturalne naskórka, enzymy i ich inhibitory
 - filagrynę
 - chymotrypsyne w. rogowej (SCCE),
 - chymaze mastocytów (MCC)
 - Inhibitor proteaz serynowych (SPINK5)
 - transferazę glutationową (GSTP1)
 - cz. aktywujące kaspazę (CARD4, CARD15)

Gen receptora FCRI- β o wysokim powinowactwie dla IgE

AZS, a FCRI- β :

- ▶ wysoka ekspresja na komórkach APC: KL i IDEC
- ▶ APC mają ułatwioną prezentację antygenów
- ▶ FCRI- β dziedziczony po matce

Gen receptora FCRI- β o wysokim powinowactwie dla IgE

Locus	Gen	Nazwa	Fenotyp	Populacja	Asocjacja?
11q13	FCRI- β	Receptor IgE Ile181Leu Gly237Glu	AD	GB Austr PL	+ + +

Badania własne:

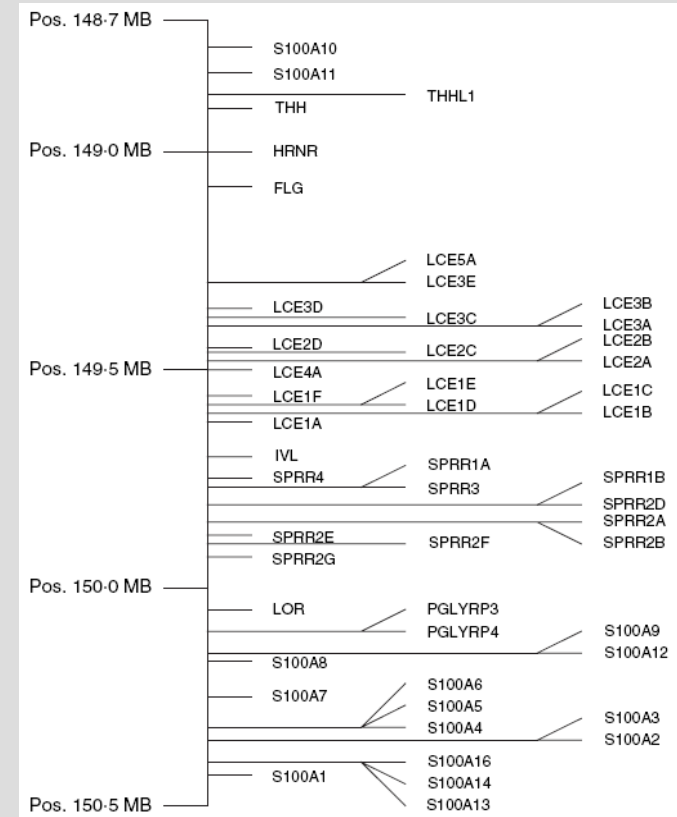
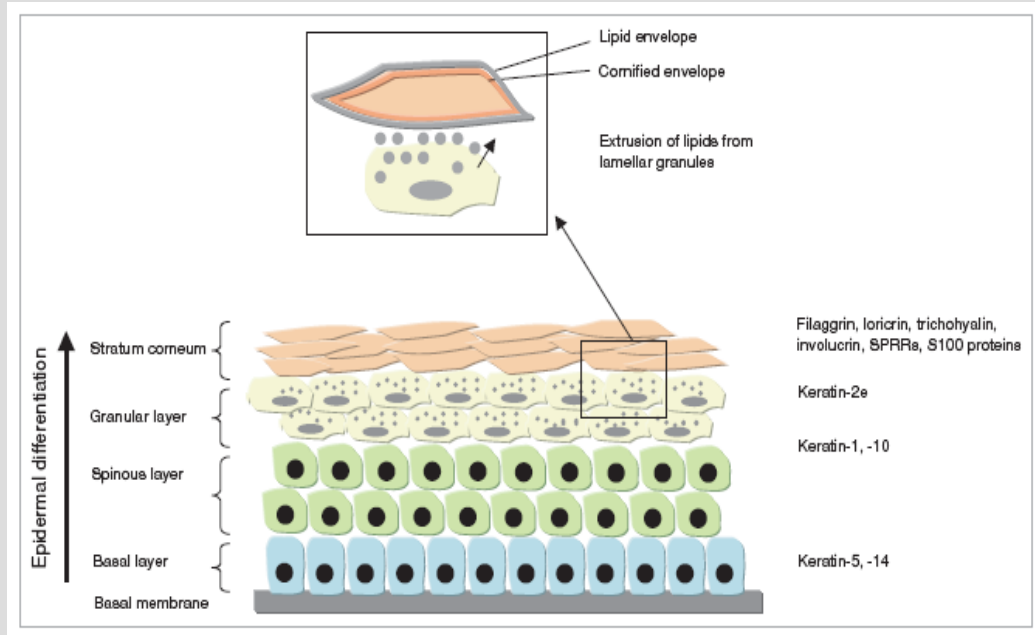
Analiza 43 rodzin dzieci z AZS wykazała:

- wysoką częstość wariantu Leu181 w rodzinach dzieci z AZS (91% rodzin).
- wykazano, iż znacznie częściej jest on przekazywany chorym dzieciom przez matkę (Zabłotna i wsp. 2007)

Analiza związku AZS
z mutacjami genów
kodujących białka
strukturalne naskórka

1q21 - ATOD2 (PSORS4)

37 genów kompleksu EDC - epidermal differentiation complex



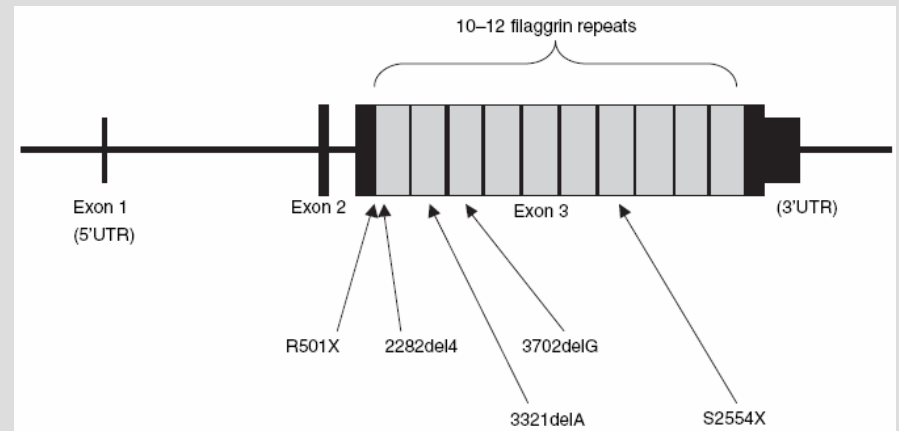
Wzrost ekspresji	Spadek ekspresji
S100 A8 (psoriazyna)	loricyna
S100 A8 kalgranulina A,	filagryna
SPPR	

PPRP-1A i 1B - receptory dla peptydoglikanów bakt G(+)

Palmer i wsp. Nat. Genet. (2006)

Mutacje w genie kodującym filagrynę:

- zwiększają ryzyko wystąpienia AZS i astmy atopowej
- występują u 4% osób zdrowych oraz u 33% osób z AZS (52/189)
- odpowiedzialne są także za powstanie "rybiej łuski"



**Mutacje R501X, 2282del4 -
brak syntezy filagryny**

Table 1 Association studies of filaggrin loss-of-function mutations with atopic dermatitis (AD)

Study	Population	Phenotype	Number of cases and controls	Mutations	Combined allele frequency*	P-value
Palmer et al. 2006 ⁴⁰	Irish children	AD	52/189	R501X, 2282del4	0.33/0.042	3×10^{-17}
Palmer et al. 2006 ⁴⁰	Scottish schoolchildren	Asthma	604/1008	R501X, 2282del4	0.084/0.049	6×10^{-4}
Palmer et al. 2006 ⁴⁰	Danish children	AD	142/190	R501X, 2282del4	0.095/0.042	0.006
Weidinger et al. 2006 ⁴¹	German	AD	476 trice ^b	R501X, 2282del4	101T: 37NT ^b	5.1×10^{-6}
Weidinger et al. 2006 ⁴¹		Extrinsic AD	476 trice ^b	R501X, 2282del4	88T: 30NT ^b	9.8×10^{-6}
Weidinger et al. 2006 ⁴¹		AD	Affected vs. unaffected parents from trice	R501X, 2282del4	Not specified	< 0.001
Stemmer et al. 2007 ⁴²	German	AD	374/667	R501X, 2282del4	0.087/0.051	0.001
Stemmer et al. 2007 ⁴²		AD onset ≤ 2 years	207/667	R501X, 2282del4	0.12/0.051	7.6×10^{-7}
Machholz et al. 2006 ⁴³	European	AD	490 trice ^b	R501X, 2282del4	209T: 98NT ^b	1.9×10^{-9}
Machholz et al. 2006 ⁴³	German	AD	186/314	R501X, 2282del4	0.094/0.025	3.5×10^{-4}
Raether et al. 2006 ⁴⁴	German	AD	272/276	R501X, 2282del4	Not specified	2×10^{-6}
Raether et al. 2006 ⁴⁴			338 trice ^b	R501X, 2282del4	Not specified	0.0016 ^c
Baker et al. 2007 ⁴⁵	British	AD persisting into adulthood	163/1463	R501X, 2282del4	0.27/0.046	3.5×10^{-13}
Weidinger et al. 2007 ⁴⁶	German	AD	274/252	R501X, 2282del4	0.12/0.03	4.9×10^{-4}
Weidinger et al. 2007 ⁴⁶		AD onset ≤ 2 years	114/252	R501X, 2282del4	Not specified	2.8×10^{-6}
Moser et al. 2007 ⁴⁷	European	AD	426 families	R501X, 2282del4	148T: 86NT ^b	0.0001
Moser et al. 2007 ⁴⁷		Asthma	426 families	R501X, 2282del4	108T: 71NT ^b	0.006
Moser et al. 2007 ⁴⁷		Atopy	426 families	R501X, 2282del4	146T: 97NT ^b	0.002
Nonoyama et al. 2007 ⁴⁸	Japanese	AD	143/156	R501X, 2282del4	Not detectable	–
Nonoyama et al. 2007 ⁴⁸				S2554X, 3321delA	0.056/0.00	0.0015

*Some papers report combined carrier frequencies. To make the results more comparable, we translated these numbers into the combined allele frequencies. ^bTransmission disequilibrium test (TDT) analysis (T, number of transmissions; NT, number of nontransmissions). ^cP-value for TDT analysis of the R501X mutation only.

Mutacje R501X, 2282del4 – brak syntezy filagryny

Europa

Osoby zdrowe:

3-5% populacji

AZS

9- 33% chorych

Polska (Kowalewski i wsp 2007)

2282del4 - 3,73% heterozygot

R510X - 0,98% heterozygot

Mutacje R501X, 2282del4 związane są z:

- postacią „zewnętrznpochodną” (extrinsic) AZS
- ciężkimi postaciami AZS
- wczesnym występowaniem objawów (<2rż)

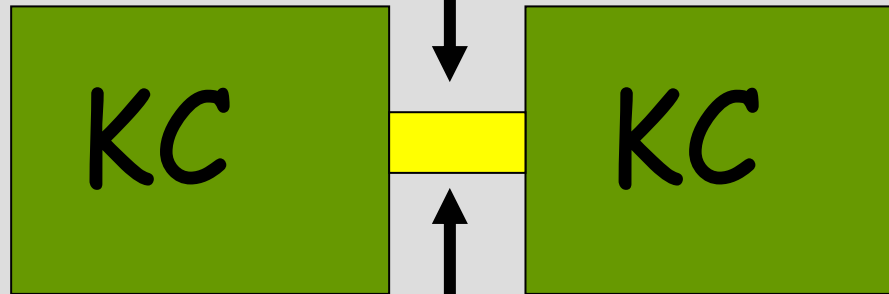
► Analiza związku występowania
AZS z mutacjami genów
kodujących proteazy naskórkowe?

AZS - genetycznie uwarunkowany defekt naskórka

- wzrost ilości proteaz wytwarzanych przez:
 - Staphylococcus aureus
 - roztocza kurzu domowego
 - warstwę rogową naskórka
 - komórki tuczne (tryptaza, chymaza)
- niedobór inhibitorów proteaz (SPINK5)
- niszczenie korneodesmosomów
 - zniszczenie bariery skórnej
 - ułatwienie wnikania alergenów
 - zewnątrzpochodna indukcja alergii i atopii
- aktywacja przez proteazy receptora -2 w neurocytach (świąd)
- niedobór 6-desaturazy, ceramidów
- spadek ekspresji filagryny, loricyny

Egzogenne proteazy

- Staphylococcus aureus
- Dermatophagoides pteronyssimus



Inhibitory proteaz:

SKALP
SLP1
LEKT1

Endogenne proteazy:

- SCCE (stratum corneum chymotryptic enzyme)
- SCTE (stratum corneum tryptic enzyme)
- MCC i MCT (mast cell chymase and tryptase)
- katepsyny i inne

AZS, a geny proteaz

Locus	Gen	Nazwa	Fenotyp	Populacja	Asocjacja ?
19q13	SCCE	Chymaza w. rogowej	AD IgE	J,J,J,I GB	++/-- -
14q11	MCC	Chymaza mastocytów	AD IgE	J. J, J, D, I, GB	+++ +

- ▶ Mutacje genu SPINK5 kodującego inhibitor proteaz serynowych są przyczyną zespołu Nethertona
- ▶ Niektóre warianty polimorficzne genu SPINK5 występują częściej u chorych z AZS

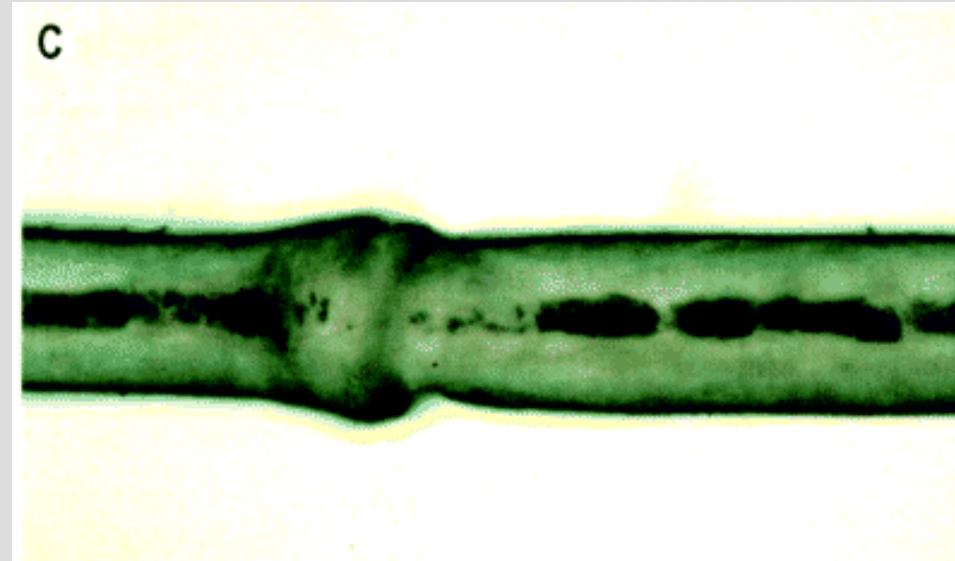
Zespół Nethertona

Dziedziczenie AR, w większości dotyczy dziewczynek.

Triada objawów:

- zmiany skórne o cechach wrodzonej uogólnionej erythrodermii z obfitym złuszczeniem naskórka w okresie noworodkowym i niemowlęcym, a w późniejszym okresie zmiany grudkowo-rumieniowo-złuszczające z cechami rybiej łuski linijnej okrażającej Cornela (*ichthyosis linearis circumflexa*)
- atopowe zapalenie skóry z podwyższeniem poziomu IgE
- włosy bambusowe, co prowadzi do ich złamań (*trichorexis invaginata*)

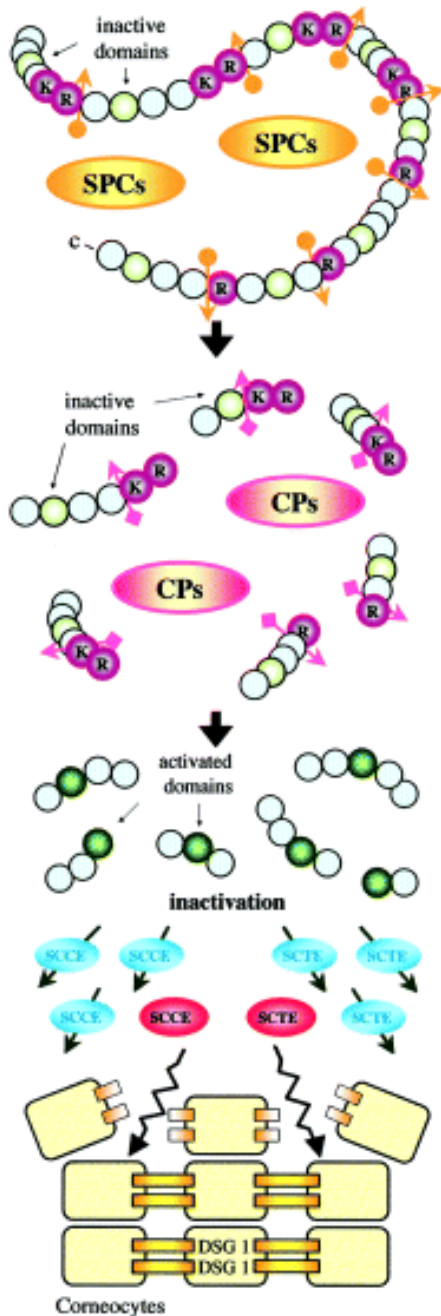
Comèl-Netherton syndrome



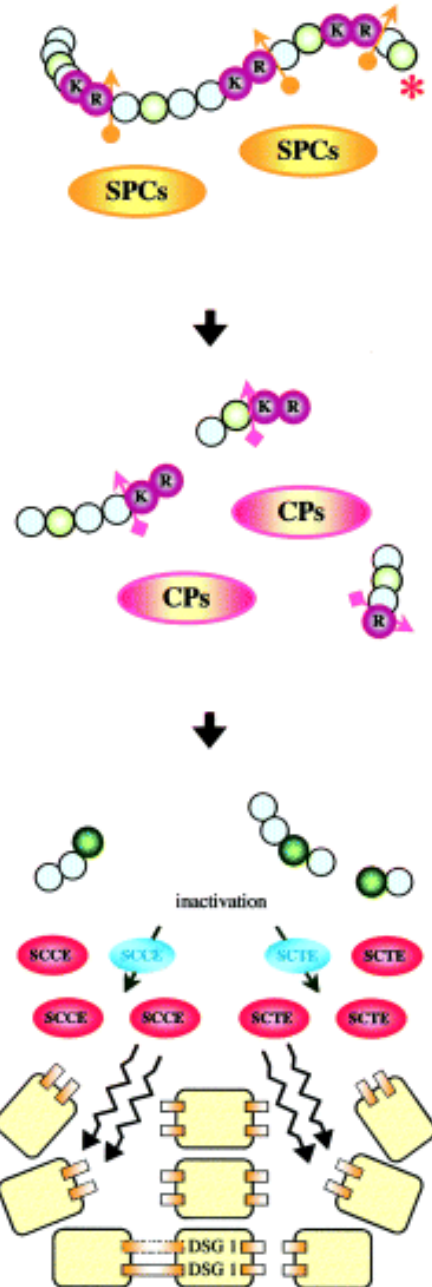
Cechy kliniczne NTS

- (A) Rybia łuska okrażająca
(Ichthyosis linearis circumflexa).
- (B) Uogólniona erythrodermia z
obfitym złuszczeniem naskórka
- (C) Trichorrhexis invaginata. Włosy
„bambusowe”.

a. Normal



b. Netherton Syndrome



Przyczyną NTS mutacje genu SPINK5- pro-białko LEKT-1 ma mniej domen inaktywujących

Efekty:

- wzrost aktywności proteaz serynowych
- degradacja desmozyny
- złuszczenie naskórka

SPC - subtilisin-like proprotein convertase

CP - carboxypeptidase

SCCE /STTE - striatum corneum chymotrypsin/ trypsin- like enzyme

DG-1 - desmoglein 1

Walley i wsp 2001, Nature Genetics 29:, 175-178

- Wariant Glu420Lys wykazuje znaczące sprzężenie z AZS, IgE i Atopią
- Odziedziczenie wariantu Glu420Lys i Asn368Ser po matce wiąże się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia atopii, AD lub podwyższonym poziomem IgE

Table 2 • Weinberg tests of association

a 148 nuclear families with atopic dermatitis: parent-of-origin effects included in model

Marker	Phenotype	Disease allele	Transmissions (T:NT) ^a		P	Rm ^b
			Maternal	Paternal		
Glu420→Lys	Atopy	Lys420	46:28	32:45	0.005	4.04
Glu420→Lys	AD	Lys420	44:31	33:47	0.009	3.92
Glu420→Lys	IgE**	Lys420	46:28	32:45	0.005	4.25
Glu420→Lys	Asthma	Lys420	29:16	23:25	0.070	3.1
Asn368→Ser	Atopy	Asn368	49:27	36:42	0.023	3.47
Asn368→Ser	AD	Asn368	47:28	36:43	0.024	3.67
Asn368→Ser	IgE ^c	Asn368	49:28	36:42	0.030	3.55

b 66 nuclear and 7 extended families in replication panel: parent-of-origin effects included in model

Marker	Phenotype	Disease allele	Transmissions (T:NT) ^a		P	Rm ^b
			Maternal	Paternal		
Glu420→Lys	Atopy	Lys420	15:8	18:6	0.008	2.63
Glu420→Lys	AD	Lys420	10:1	15:3	0.002	3.32
Glu420→Lys	IgE ^c	Lys420	14:7	18:7	0.012	2.35
Glu420→Lys	Asthma	Lys420	11:4	17:10	0.040	1.43

Badania innych autorów potwierdziły związek substytucji Glu420Lys w genie LEKT1 z AZS

Kato i wsp. (2003): Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Brit. J. Derm.* 148: 665-669

Nishio i wsp (2003) Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. *Genes Immun.* 4(7):515-7.

Kusunoki i wsp. (2005): SPINK5 polymorphism is associated with disease severity and food allergy in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 115(3):636-638.

Kabesch i wsp. (2004) Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy.* 34(3):340-5.

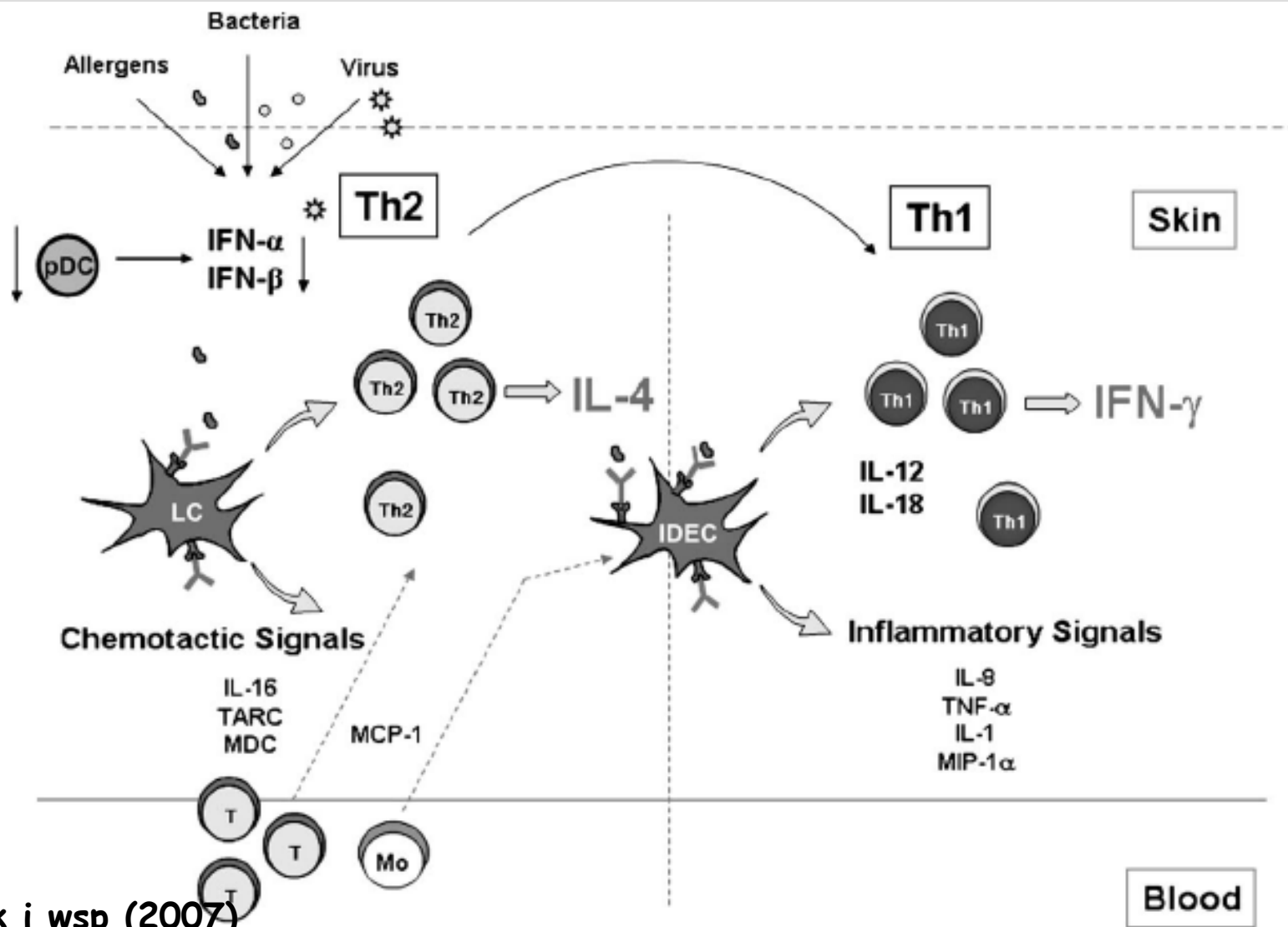
Asocjacja z AZS + Astma, nie z AZS samodzielnie.

Jongepier (2005): Polymorphisms in SPINK5 are not associated with asthma in a Dutch population. *J Allergy Clin Immunol.* 115(3):486-92. (brak ekspresji w płucach)

- ▶ Analiza związku AZS z mutacjami genów cytokin i ich receptorów, które prowadzą do podwyższenia ich ekspresji, lub zwiększenia ich aktywności?

Faza ostra

Faza przewlekła



Cytokiny w patogenezie AZS

Cytokina	Funkcja w AZS
Faza ostra TSLP (limfopoetyna) IL-4 IL-13 IL-31 IL-5 IL-17 IL-16	Aktywacja KD, różnicowanie Th0/Th2, synteza przez KC - TARC, MDC Synteza IgE, przełączenie klas Synteza IgE, aktywacja MC Th2, zapalenie, promocja AD, (IL-31RA+OncostatR(LIF) Indukcja wzrostu i hamowanie apoptozy eozynofili, Synteza IL-6, IL-8, Chemotaksja limfocytów CD4, KD,
Faza przewlekła IFN γ IL-12 IL-18 TNF α GM-CSF IL-11 TGF- β	Synteza MCP1, RANTES Różnicowanie Th0/Th1 Różnicowanie Th0/Th1, indukcja syntezy IFN γ Indukcja stanu zapalnego, Chemotaksja eozynofili, dojrzewanie KD, proliferacja KC Synteza kolagenu I Działanie przeciwzapalne

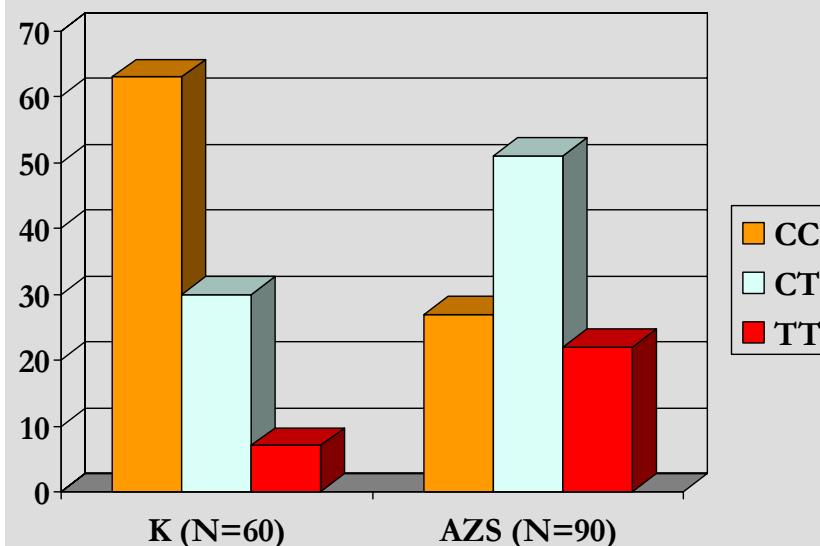
Geny cytokin i receptorów

Locus	Gen	Fenotyp	Populacja	Asocjacja?
5q31 ATOD6	IL-4	Ciężkie AD	D, PL	++
	IL-13	AD	C, J, D, DK, J, PL	+ +
	IL-12B	AD/PS	J	+
	IL-5	Eozynofilia w AD	J	+
	IL-2	AD	USA, PL D	+ -
	TSLP	A	D	+
11q22	IL-18	AD	D	+
16p12	IL4R	AD	J, USA, GB J D	+ + + + +

Badania zespołu Kliniki Dermatologii AM w Gdańsku



- ▶ AZS wykazuje związek z wariantami promotora o zwiększonej transkrypcji:
 - IL-4 (Nedoszytko i wsp. 2006) %
 - IL-13 (Gleń i wsp 2007)
 - IL-2 (Ryduchowska i wsp 2007)
 - TNF- α (Nedoszytko i wsp 2006)
- ▶ U chorych z AZS występują określone warianty genów TAP (Wilkowska i wsp. 2004, Nedoszytko i wsp 2006).



IL-4

Subpopulacje limfocytów T (Nedoszytko 2007.)

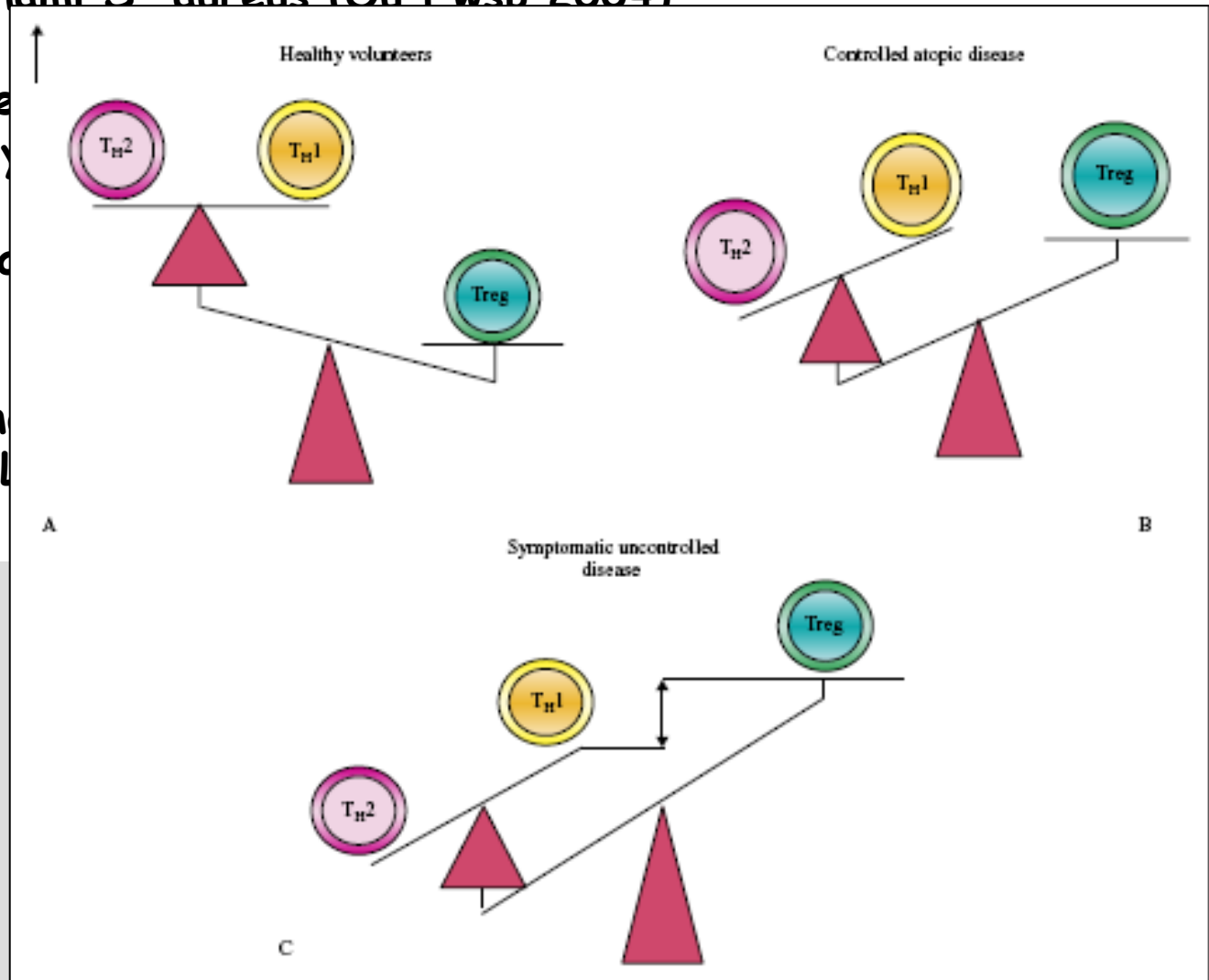
Typ	Cytokina stym.	Gł. cz. trans kr.	Efektorowa cytokina	Funkcja	Patologiczny efekt
Th1	IL-12	T-bet	IFN- γ , IL-2, TNF α	Stym odp komórkowej elim. patogenów zewnątrzkomórkowych	Ch. autoimmun. alergie kontaktowe, AD
Th2	IL-4	GATA-3	IL-4, IL-13, IL-5	Stym odp humoralnej, elim patogenów wewnątrzkomórkowych	Astma , alergie IgE zależne
Th3	TGF- β 1 IL-14, IL-4 Anty IL-12	?	TGF- β 1		Łuszczyca
Th17	TGF- β 1 plus IL-6	ROR γ t	IL-17 ,IL-6, TNF α , IL-22	prozapalna	Ch autoimmunol. Łuszczyca, MS, ch Crohna, RA
Tr1	IL-10, IFN- α		TGF- β 1	IMMUNOSUPRESJA Th1 i Th2	AD, łuszczyca
Treg CD4+ CD25+	TGF- β 1 minus IL-6	Foxp3	TGF- β 1 IL-10	Immunosupresja p-zapalne hamowanie CD4+ i CD8+	AD, Łuszczyca

Zaburzenia funkcji limfocytów Treg (CD4+CD25+Fox+GITR+) w AZS:

- limfocyty Treg tracą zdolność do immunosupresji po stymulacji superantygenami *S. aureus* (Ou i wsp 2004)

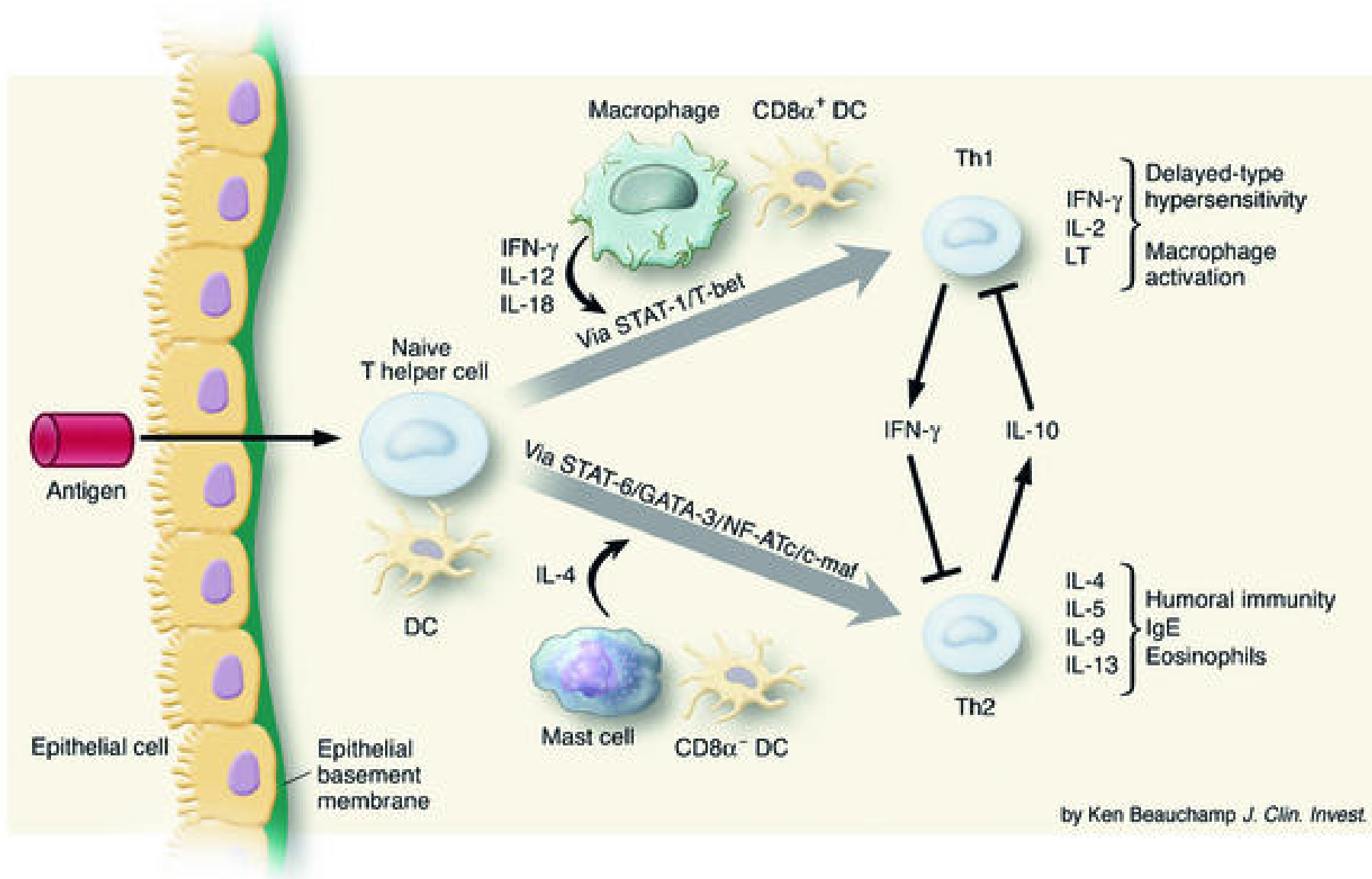
- mutacja genu
braku limfocy
krynopatii i
atopowego z
2001).

- atopia u m
stymulacji Tl



do
p-
z
sp
t) po

- ▶ Analiza związku AZS z mutacjami genów kodujących czynniki transkrypcyjne



AZS a czynniki transkrypcji

Locus	Gen	Nazwa	Fenotyp	Populacja	Asocjacja?
4q32	STAT6	Cz. transkr. akt. Th2	AD/AS	D, J	+
13q14	PHF11	PHD finger protein	AD	Au	+
4q35	IRF2	Interferon regulatory factor	AD	J,	+
4q35	Tbet	TH1	AD, IgE, A	USA	+

Kabesh i wsp.(2006) - w populacji 1120 dzieci z astmą analiza częstości polimorfizmów:

IL-4 598 C/T.

IL-13 1112 C/T

IL-4R 148 A/G

STAT6 2829 C/T.

W porównaniu z ryzykiem obliczanym dla jednego genu ryzyko astmy i podwyższenia poziomu IgE zwiększa się gdy liczone jest dla czterech badanych genów.

Ryzyko astmy rośnie -10,8x

Ryzyko podwyższenia IgE - 16,8x

Geny wykazują dominujący i addytywny efekt

=geny kumulatywne

► Analiza związku AZS z mutacjami genów kodujących geny chemokin



Chemokiny

Chemokina	Komórka docelowa
Eotaksyna IL-16	eozynofil
IL-16 CCL-1 CCL-2 (MCP-1) CCL-5 (RANTES) CCL17 (TARC) CCL18 (MIP-4) CCL22(MDC) CCL-27 (CTACK)	Limfocyt Th2 Limfocyt Tc2

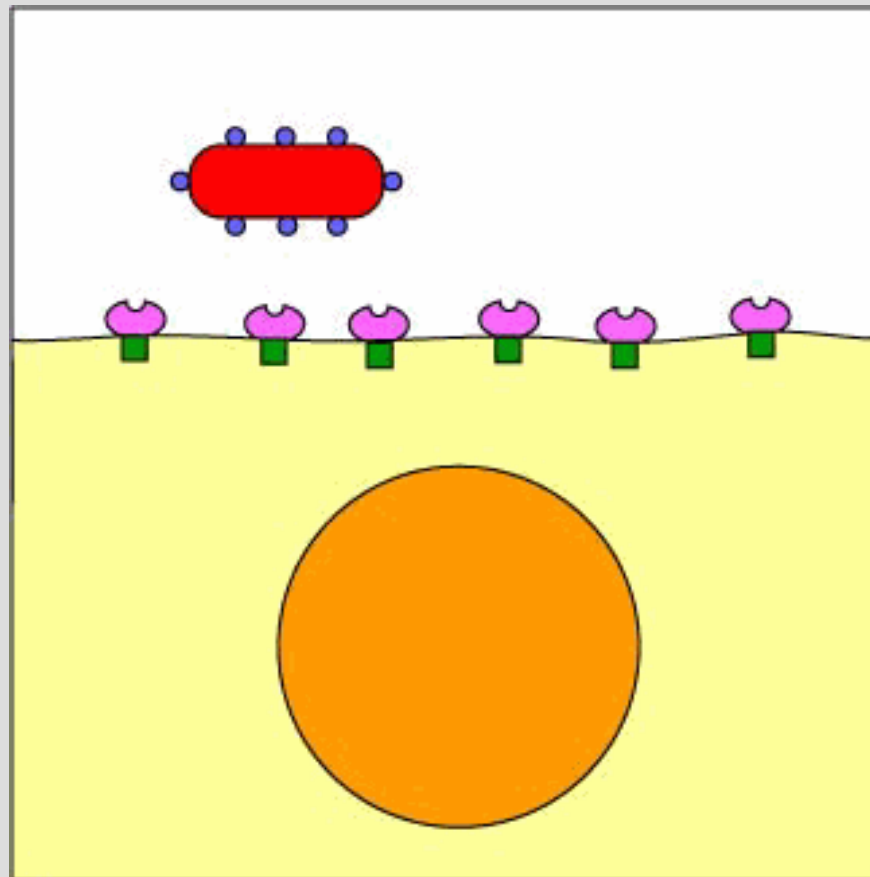
Geny chemokin

Locus	Gen	Fenotyp	Populacja	Asocjacja?
17q11	RANTES (CCL5)	AD	D H	+ -
17q21	EOTAKSYNA (CCL11)	IgE w AD	J	+

AZS a odporność nieswoista

Receptory Toll-like

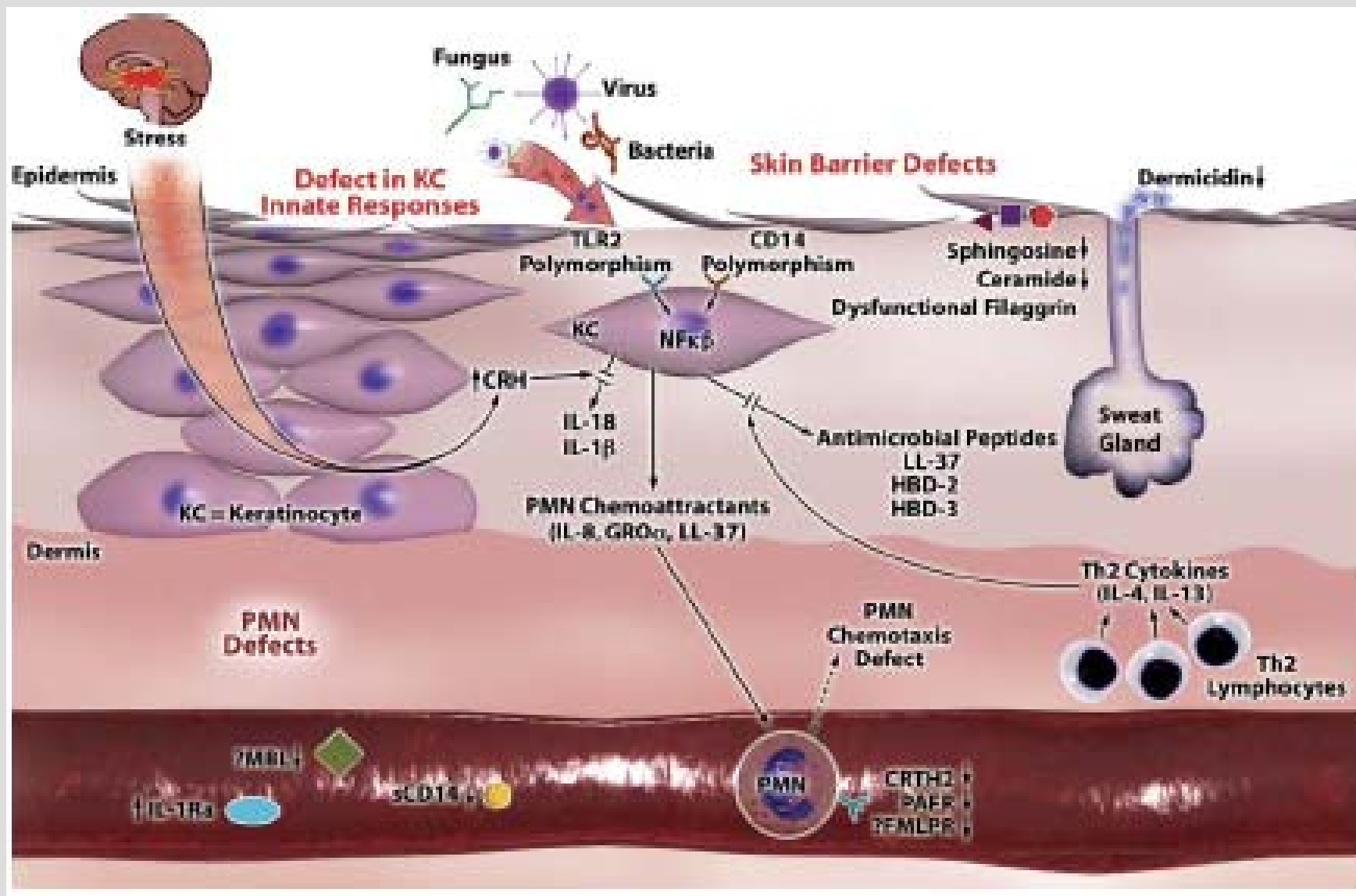
(PPR – pattern recognition receptors)



W AZS obserwuje się osłabienie mechanizmów odporności nieswoistej

- ▶ **Obniżona ekspresja peptydów przeciwbakteryjnych**
 - LL37
 - HBD2, HBD3
 - dermicydyny w pocie
- ▶ **Obniżona ekspresja iNOS**
- ▶ **Obniżona ekspresja receptorów PPR**
 - MBL
 - sCD-14
- ▶ **IL-4 hamuje ekspresję TLR-2 i CD14 na KL, KC**
- ▶ **Obniżenie ekspresji sCD14 w płynie owodniowym i mleku sprzyja AD**
- ▶ **Zaburzenie funkcji neutrofili (obniż. zd. fagocytozy, syntezy rodników tlenu, chemotaksji)**
- ▶ **Wzrost częstości infekcji :**
 - *S. aureus* (90% skóra, wzrost ilości bakterii w kale)
 - *Malassezia furfur* (*Pityrosporum orbiculare*) (60%)
 - Wirusowych (HSV, *moluscum contagiosum* v, *vaccinia* v)
 - Niedobór w jelicie *Bifidobacterium* - komensali jelitowych
stym. powstawanie limf. Th-1

ASZ – defekty odporności nieswoistej



RECEP-TOR	LIGAND	Wpływ na ekspresję cytokin	EFEKT
TLR 1	składniki bakteryjnej ściany komórkowej	TNF α , IL-12	Obrona p-bakt
TLR 2	składniki bakteryjnej ściany komórkowej, także składniki ściany drożdży i mykobakterii, HSP60. 70	TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, NO (KC, KD) IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 (Mc)	Obrona p-bakt, grzyb. akt. MC, Th1 Th2
TLR 3	ds RNA	IFN- β	Obrona p-wirus.
TLR 4	LPS i kwas lipotejchowy, HSP	TNF α , IFN- β IL-1, IL-6, IL-10,, IL-13, NO	Obrona p-bakt, p-wirus. P-grzyb, apoptoza
TLR 5	flagellina	TNF α , IFN- β IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ , NO	dojrzewanie KD
TLR 6	składniki bakteryjnej ściany komórkowej, ssRNA	TNF α ,	Obrona p-bakt, p-wirus. P-grzyb
TLR 7	małe syntetyczne cząsteczki wirusowe,	TNF α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF IL-1, IL-6, IL-6, IL-12, IL-18, IL-10,	Th1, dojrzewanie KD, akt. Eozyno, NK
TLR 8	małe syntetyczne cząsteczki wirusowe, HIV	TNF α , IFN- β , IFN- γ , GM-CSF IL-1, IL-6, IL-6, IL-12, IL-18, IL-10,	TH-1, dojrzewanie KD
TLR 9	niemetylowane CpG, IgG-chromatyna	IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12	TH-1, dojrzewanie KD
TLR 10	?	?	

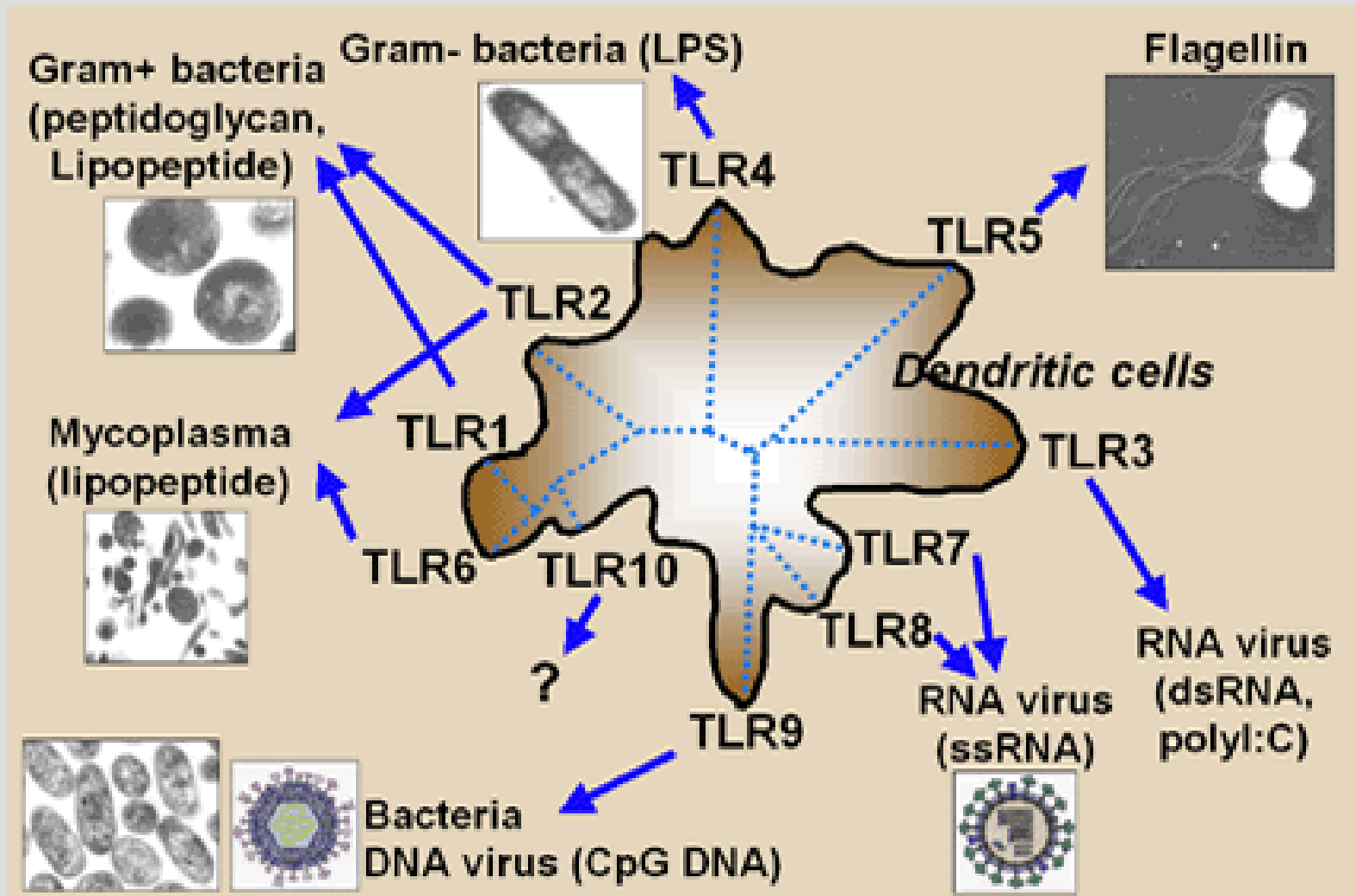
AZS a geny odporności nieswoistej

Locus	Gen	Funkcja	Fenotyp	Populacja	Asocjacja?
4q32	TLR-2	LPS-R	Ciężkie AD	D	+
3p21.3	TLR-9	Niemetylow. CpG (n.leki)	AD (IAD)	GB, D	+
3p21.3	CD-14	LPS-R	AD	GB,Cz,De	+++
8p23	HBD-2	Peptyd p-bakt	A	USA	+
16q12	CARD15 /NOD2	Rozp bakt G(+), PG	AD	D	+

Novak i wsp. Allergy 2007

- ▶ Polimorfizm -1237 C/T promotora genu TLR9 wykazuje asocjację z AD (intrinsic AD=brak $\uparrow$ IgE)
- ▶ Warunkuje powstanie miejsca wiązania NFkB
- ▶ Genotyp TT związany z podwyższoną ekspresją TLR9
- ▶ Hiperaktywacja TLR9 prowadzi do AD niezależnej od IgE?

Toll-like receptors (TLR)- stymulacja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w wyniku ekspozycji na mikroorganizmy poprzez Toll-like-receptor 2 (TLR2) może zmniejszać ryzyko alergii w dzieciństwie.



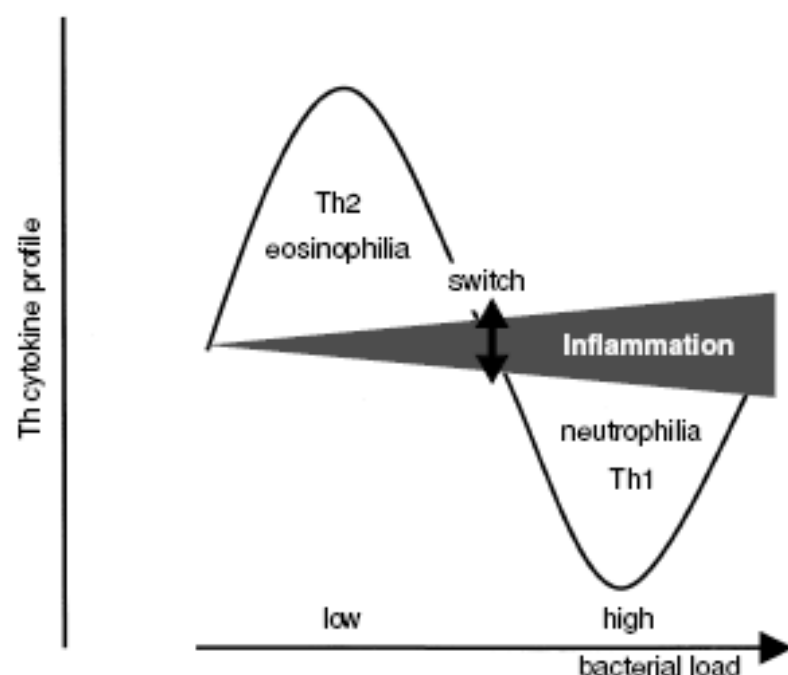


Fig. 1. The endotoxin switch. The curve represents the bimodal relationship between bacterial load in the environment and outcome of the immune response. The double pointed arrow corresponds to the occurrence of the switch from Th2 to Th1 responses.

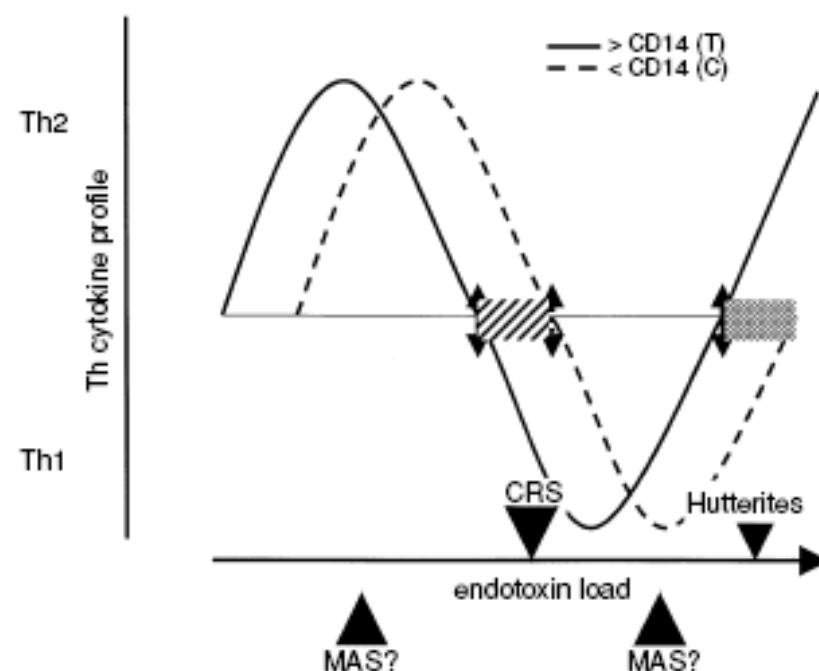
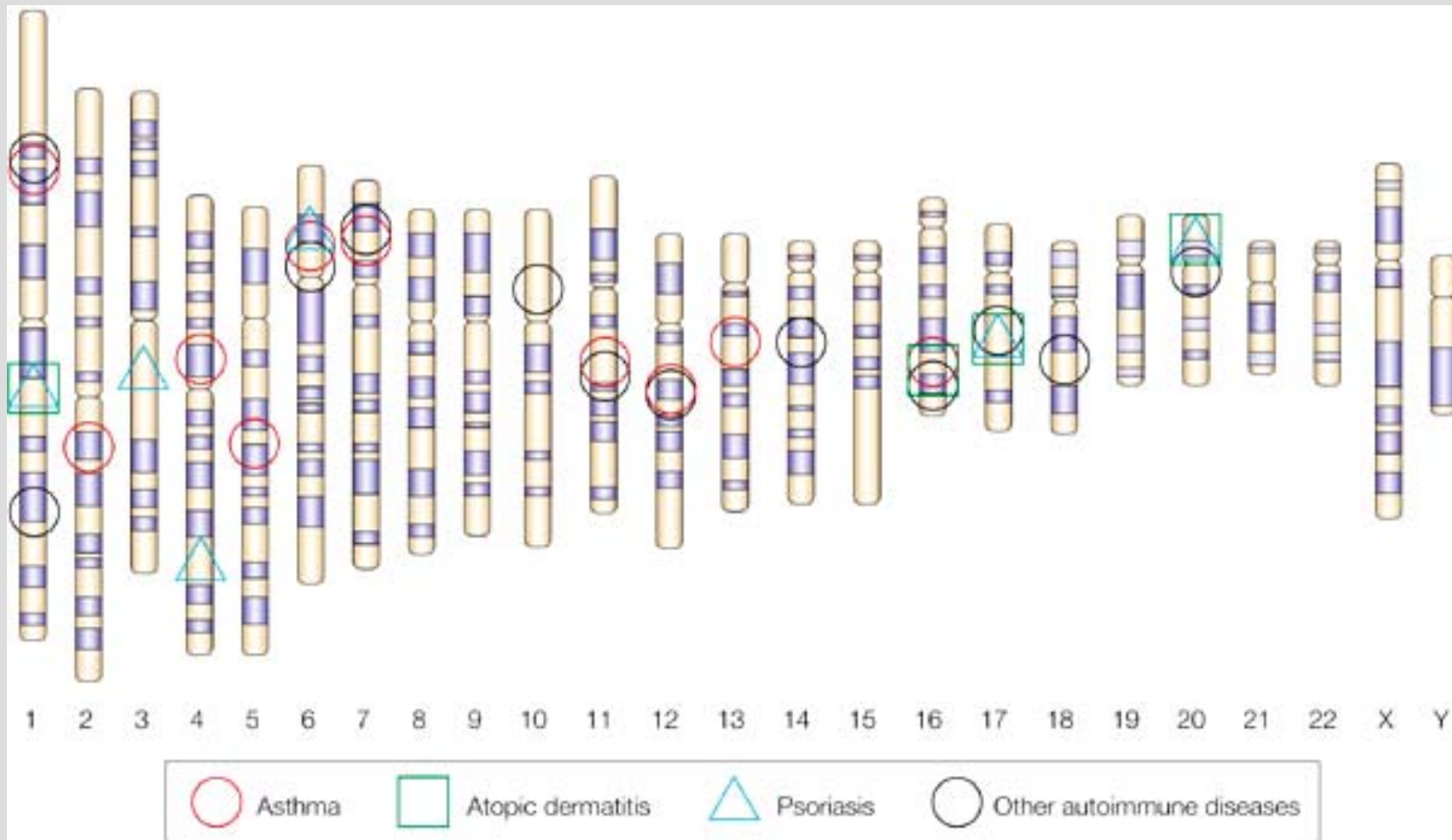


Fig. 2. CD14 SNPs and the endotoxin switch. The two curves represent CD14/-159 allele-specific relationships between endotoxin load and immune responses. The double pointed arrow corresponds to the occurrence of the switch from Th2 to Th1 responses. The hatched and dotted areas identify the window of opportunity within which genetic variation may impact on Th responses. Hypothetical levels of exposure for different populations ([1, 2, 8]) are noted on the endotoxin load axis.



Nature Reviews | Immunology

Niektóre geny AZS wykazują wspólną lokalizację z genami astmy, łuszczycy i niektórych chorób autoimmunologicznych (SLE, ch. Crohna i inne).

- Wspólna lokalizacja genów AZS i szeregu chorób o podłożu immunologicznym wskazuje, iż genetyczna komponenta choroby nie jest swoista ani dla tkanki czy choroby lecz jest związana z ogólnym zaburzeniem mechanizmów regulujących procesy immunologiczne.
- Klinicznie odmienne choroby autoimmunologiczne mogą być kontrolowane przez wspólne geny podatności na chorobę

Becker K.G. Diabetes, 1999, 48:1353-58.

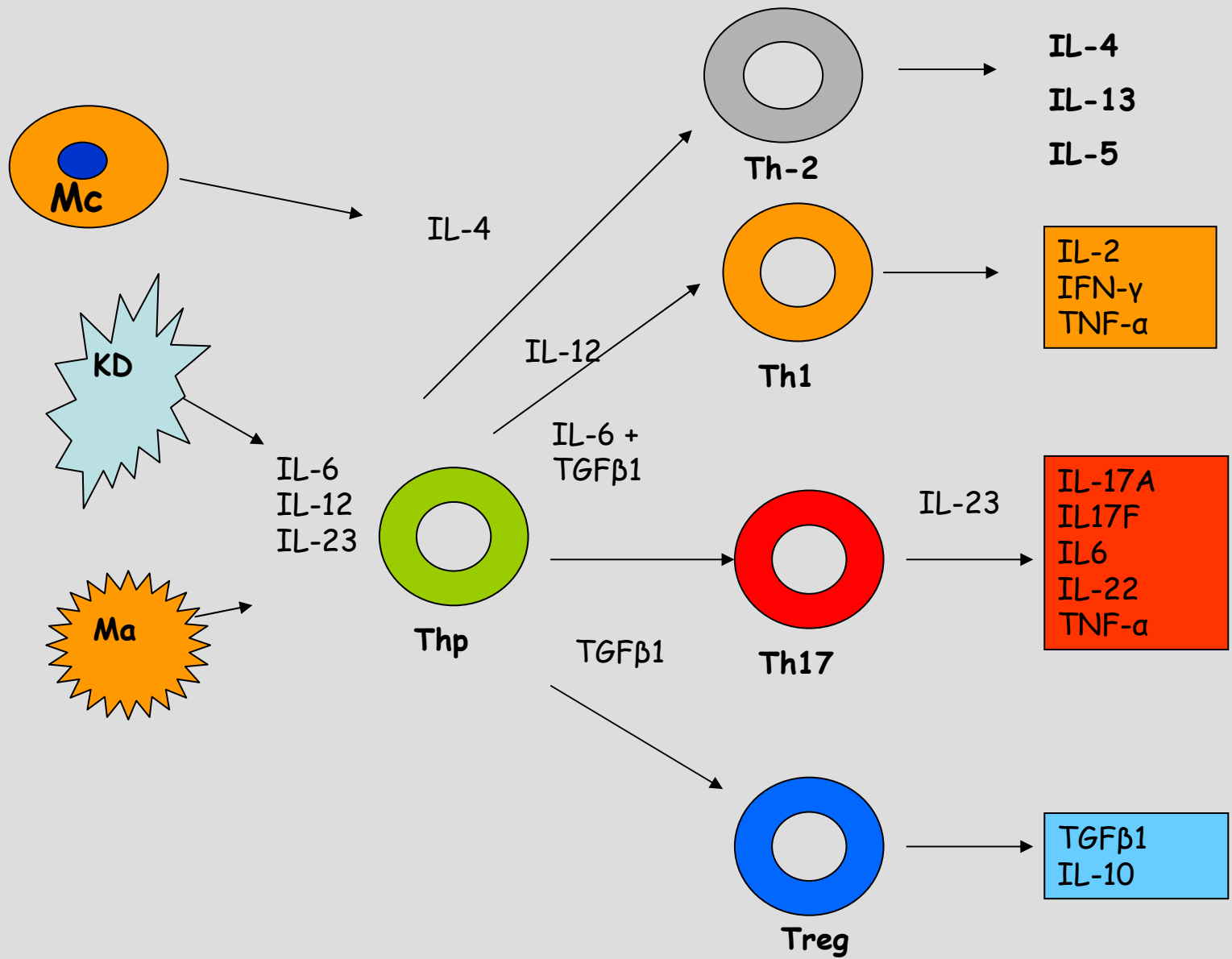
Becker i Barnes , JID, 2001 117:1325-27.

Podsumowanie

- ▶ AZS jest chorobą wielogenową (wieloczynnikową).
- ▶ Do tej pory nie został zidentyfikowany gen (geny) AZS
- ▶ Zidentyfikowano 6 regionów zawierających geny AZS
 - ATOD1 - 3q21
 - ATOD2 - 1q21
 - ATOD3 - 17q11-q24
 - ATOD4 - 20p
 - ATOD5 - 13q12-q14
 - ATOD6 - 5q31-q33
- ▶ Dla 19 genów wykazano w różnych populacjach asocjację z AZS
- ▶ Główne geny AZS:
 - Geny IL-4, IL-13 i ich receptorów
 - Gen SPINK-5
 - Gen filagryny
 - Gen STAT-6
 - Geny PPR (TLR2, TLR4, CD-14)
- ▶ Część regionów chromosomowych zawierających geny podatności na AZS jest wspólnych dla AZS, astmy, łuszczycy i innych chorób autoimmunologicznych.

Perspektywy badań genetycznych w AZS

- ▶ Brak wieloośrodkowych metanaliz
- ▶ Brak analiz odziedziczania haplotypów
- ▶ Brak wytypowanie polimorfizmów genów zwiększających podatność
- ▶ Analiza haplotypów
 - Geny cytokin: TNF, IL-12B, IL-4, IL-13, IL-23
 - Geny receptorów: IL-12R, IL-4/13R
 - Receptory odp. niesw. (TIR -2,-4, CD-14, PGR)





Dziękuję Państwu za uwagę

