

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

**Daniel P. Potaczek**

**Zmienność genetyczna łańcucha  $\alpha$  receptora IgE  
o wysokim powinowactwie (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ) w chorobach  
o podłożu alergicznym oraz w populacji**

*Praca doktorska*

**Promotor: Prof. dr hab. Marek Sanak**

Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych UJ CM  
Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Andrzej Szczeklik

Kraków, 2006

*Pragnę złożyć podziękowania:*

*Promotorowi, Panu Profesorowi  
Markowi Sanakowi, Kierownikowi  
Zakładu Biologii Molekularnej i  
Genetyki Klinicznej za cenne rady,  
uwagi i całą pomoc okazaną mi w  
trakcie prowadzenia badań i pisania  
niniejszej pracy.*

*Panu Profesorowi Andrzejowi  
Szczeklikowi, Kierownikowi II Katedry  
Chorób Wewnętrznych za umożliwienie  
mi przeprowadzenia niniejszego  
projektu i wsparcie w trakcie jego  
wykonywania oraz cenne rady i uwagi  
merytoryczne.*

*Pani Profesor Ewie Niżankowskiej-  
Mogilnickiej, Kierownikowi Kliniki  
Pulmunologii za cenne uwagi i całą  
okazaną mi pomoc i wsparcie.*

*Pracownikom Zakładu Biologii  
Molekularnej i Genetyki Klinicznej za  
okazaną pomoc.*

*Wszystkim Pracownikom II Katedry  
Chorób Wewnętrznych, którzy pomogli  
mi w realizacji niniejszego projektu.*

<b>1</b>	<b>Wstęp</b> .....	1
1.1	Wprowadzenie .....	1
1.2	Receptory IgE .....	1
1.2.1	Receptor IgE o niskim powinowactwie (FcεRII) .....	1
1.2.2	Receptor IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI) .....	3
1.2.2.1	Ekspresja FcεRI .....	3
1.2.2.2	Budowa FcεRI .....	3
1.2.2.2.1	Podjednostka α (FcεRIα) .....	4
1.2.2.2.2	Podjednostka β (FcεRIβ) i podjednostka γ (FcεRIγ) .....	5
1.2.2.3	Sygnalizacja przez FcεRI .....	5
1.2.2.4	Funkcje biologiczne FcεRI .....	6
1.2.2.4.1	Odporność przeciwpasożytnicza .....	6
1.2.2.4.2	Alergia IgE zależna (typ I nadwrażliwości) .....	6
1.2.2.4.3	Prezentacja antygeny .....	7
1.2.2.5	Budowa genów dla podjednostek FcεRI, kontrola ich ekspresji genetycznej i zagadnienia ich zmienności genetycznej.....	7
1.2.2.5.1	Budowa genów dla podjednostek FcεRI i kontrola ich ekspresji genetycznej .....	7
1.2.2.5.1.1	Gen kodujący FcεRIα ( <i>FCERIA</i> ) .....	7
1.2.2.5.1.2	Gen kodujący FcεRIβ ( <i>FCERIB</i> ) .....	9
1.2.2.5.1.3	Gen kodujący FcεRIγ ( <i>FCERIG</i> ) .....	10
1.2.2.5.2	Zagadnienia zmienności genów kodujących FcεRI .....	10
1.2.2.5.2.1	Zmienność genetyczna <i>FCERIA</i> .....	10
1.2.2.5.2.2	Zmienność genetyczna <i>FCERIB</i> .....	11
1.2.2.5.2.3	Zmienność genetyczna <i>FCERIG</i> .....	12
1.2.2.6	Regulacja FcεRI .....	12
1.3	Astma .....	13
1.4	Przewlekła pokrzywka idiopatyczna .....	14
1.5	Przewlekły alergiczny nieżyt nosa .....	15
1.6	Nadwrażliwość na aspirynę .....	15
1.6.1	Astma aspirynowa .....	15
1.6.2	Pokrzywka z nadwrażliwością na aspirynę .....	17
1.6.3	Zmienność genów kodujących FcεRI a nadwrażliwość na aspirynę .....	17
1.7	Przeciwciała przeciw IgE i(lub) przeciw FcεRI .....	18
<b>2</b>	<b>Założenia i cele pracy</b> .....	20
<b>3</b>	<b>Materiały i metody</b> .....	21
3.1	Grupy badane .....	21
3.1.1	Grupa chorych .....	21
3.1.2	Grupa kontrolna .....	22
3.2	Metodyka.....	23

3.2.1	Badania genetyczne .....	23
3.2.1.1	Plan badań genetycznych .....	23
3.2.1.2	Izolacja DNA .....	24
3.2.1.3	Zaprojektowane startery reakcji PCR .....	24
3.2.1.4	Warunki polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) ..	27
3.2.1.5	Metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) .....	29
3.2.1.6	Technika polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA (SSCP) .....	31
3.2.1.7	Sekwencjonowanie pośrednie .....	34
3.2.1.7.1	Klonowanie .....	34
3.2.1.7.2	Sekwencjonowanie .....	38
3.2.1.7.3	Potwierdzanie obecności polimorfizmu metodą RFLP .....	40
3.2.1.8	Genotypowanie .....	40
3.2.1.9	Lokalizacja genu .....	41
3.2.2	Badania autoimmunologiczne .....	41
3.2.2.1	Test skórny surowicy autologicznej (ASST) .....	41
3.2.2.2	Test uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych (BHR-Test) .....	42
3.2.3	Badanie w kierunku nadwrażliwości na aspirynę .....	42
3.2.4	Inne oznaczenia .....	43
3.2.4.1	Oznaczanie całkowitych stężeń IgE w surowicy .....	43
3.2.4.2	Inne badania laboratoryjne .....	43
3.3	Analiza statystyczna .....	43
<b>4</b>	<b>Wyniki</b> .....	45
4.1	Poszukiwanie zmienności genu <i>FCERIA</i> .....	45
4.1.1	Promotor proksymalny oraz eksony 1–5 („stare” regiony genu) .....	45
4.1.1.1	Promotor proksymalny .....	45
4.1.1.2	Eksony 1–5 .....	46
4.1.2	Promotor dystalny oraz eksony 1A i 2A („nowe” regiony genu) .....	48
4.1.2.1	Promotor dystalny .....	48
4.1.2.2	Ekson 1A .....	48
4.1.2.3	Ekson 2A .....	55
4.2	Genotypowanie .....	56
4.2.1	Genotypowanie – polimorfizmy częste (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C) .....	56
4.2.2	Genotypowanie – polimorfizm rzadki (–12663 A>G) .....	56
4.2.3	Genotypowanie – analiza haplotypowa 4 częstych polimorfizmów (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C) .....	58
4.3	Cztery częste polimorfizmy genu <i>FCERIA</i> (–18674/–18675	

	delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C) a całkowite stężenie IgE w surowicy i eozynofilia bezwzględna .....	60
4.3.1	Analiza oddzielna .....	60
4.3.2	Analiza haplotypowa .....	63
4.4	Zmienność genetyczna genu <i>FCERIA</i> a zjawiska autoimmunologiczne .....	65
4.5	Nadwrażliwość na aspirynę a polimorfizmy genu <i>FCERIA</i> ...	66
<b>5</b>	<b>Dyskusja</b> .....	68
5.1	Poszukiwanie zmienności genu <i>FCERIA</i> .....	68
5.2	Częstości wariantów allelicznych genetycznych <i>FCERIA</i> ....	70
5.3	Zmienność genetyczna <i>FCERIA</i> i nadwrażliwość na aspirynę .....	72
5.4	Warianty alleliczne genu <i>FCERIA</i> i zjawiska autoimmunologiczne .....	73
5.5	Zmienność genetyczna <i>FCERIA</i> a całkowite stężenie IgE w surowicy .....	75
5.6	Możliwe implikacje terapeutyczne zmienności genetycznej <i>FCERIA</i> .....	77
<b>6</b>	<b>Wnioski</b> .....	80
<b>7</b>	<b>Streszczenie</b> .....	82
7.1	Wstęp .....	82
7.2	Cele .....	82
7.3	Materiały i metody .....	83
7.4	Wyniki .....	83
7.5	Wnioski .....	85
<b>8</b>	<b>Summary</b> .....	86
8.1	Background .....	86
8.2	Objectives .....	86
8.3	Materials and Methods .....	86
8.4	Results .....	87
8.5	Conclusions .....	88
<b>9</b>	<b>Zestawienie skrótów</b> .....	89
<b>10</b>	<b>Piśmiennictwo</b> .....	91

# 1 Wstęp

## 1.1 Wprowadzenie

Reakcja alergiczna typu natychmiastowego jest zależna od obecności specyficznych przeciwciał klasy IgE. Przeciwciała te, zwane dawniej reaginami, obecne są na powierzchni komórek tucznych, gdzie są silnie związane z receptorem IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI). Spinanie tak umiejscowionych cząsteczek IgE przez alergen wywołuje degranulację mastocytów i uwalnianie miejscowych mediatorów, takich jak histamina czy leukotrieny, wywołujących objawy alergiczne. Na Rycinie 1 pokazano rolę FcεRI w rozwoju reakcji nadwrażliwości typu I.

## 1.2 Receptory IgE

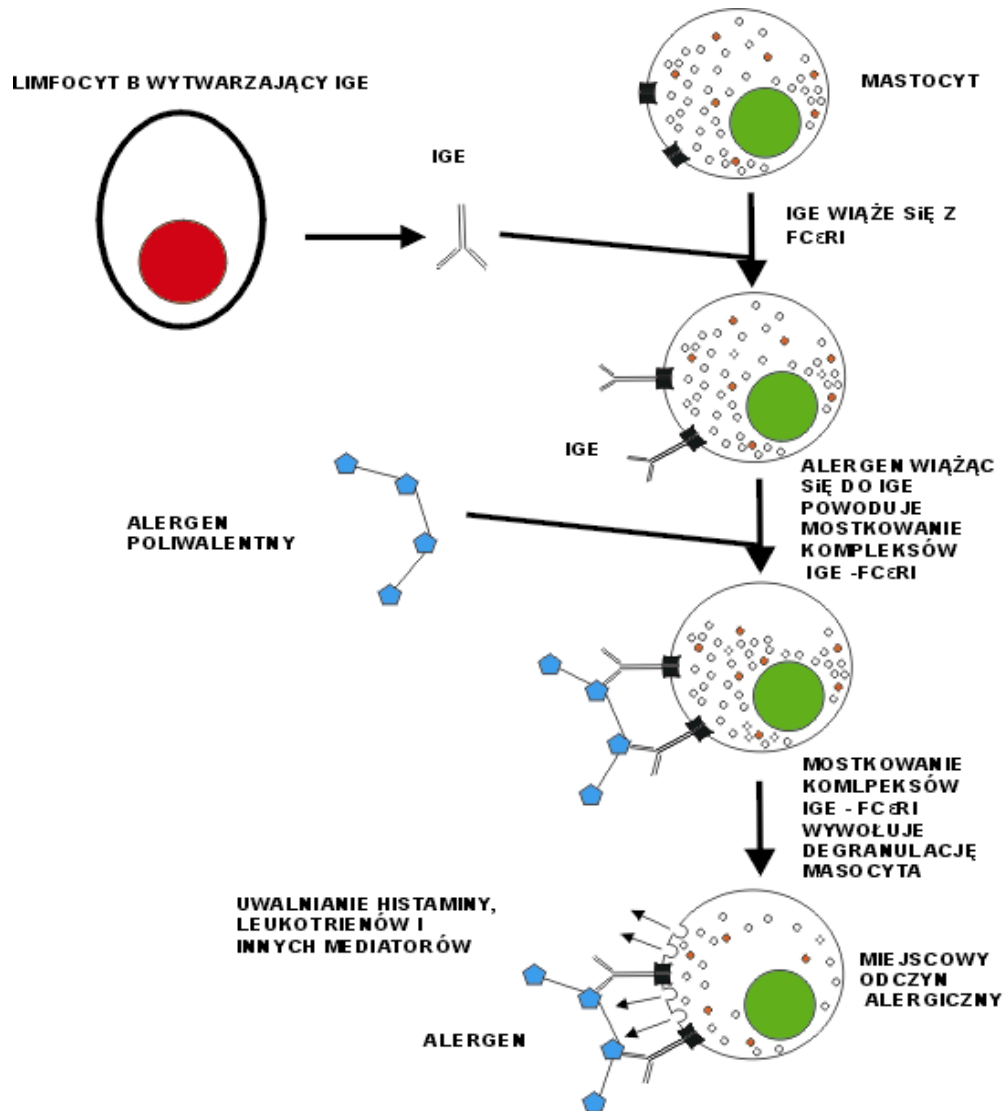
Znane są dwa rodzaje receptorów dla IgE: receptor o wysokim powinowactwie (FcεRI) oraz receptor o niskim powinowactwie (FcεRII).

### 1.2.1 Receptor IgE o niskim powinowactwie (FcεRII)

Receptor IgE o niskim powinowactwie (FcεRII) jest złożonym z jednego łańcucha (321 aminokwasów) białkiem błonowym typu II o masie 45 kDa, którego ekspresję stwierdza się na powierzchni limfocytów T i B, monocytów, makrofagów, keratynocytów, płytek krwi, komórek dendrytycznych, limfocytów NK i granulocytów zasadochłonnych [1–7].

Interakcje FcεRII z IgE i CD21 odgrywają istotną rolę w regulacji stężenia IgE oraz aktywacji i różnicowania limfocytów B. Co ciekawe FcεRII bierze udział zarówno w zwiększaniu jak i zmniejszaniu wytwarzania IgE i stanowi „dwukierunkowy przełącznik” homeostazy IgE. Ponadto FcεRII

pełni wiele innych funkcji modulujących odpowiedź immunologiczną, takich jak: prezentacja antygeny, aktywacja i różnicowanie limfocytów T, działania prozapalne [1–7].



**Rycina 1.** Rola receptora IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI) w rozwoju reakcji nadwrażliwości typu I.

## 1.2.2 Receptor IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI)

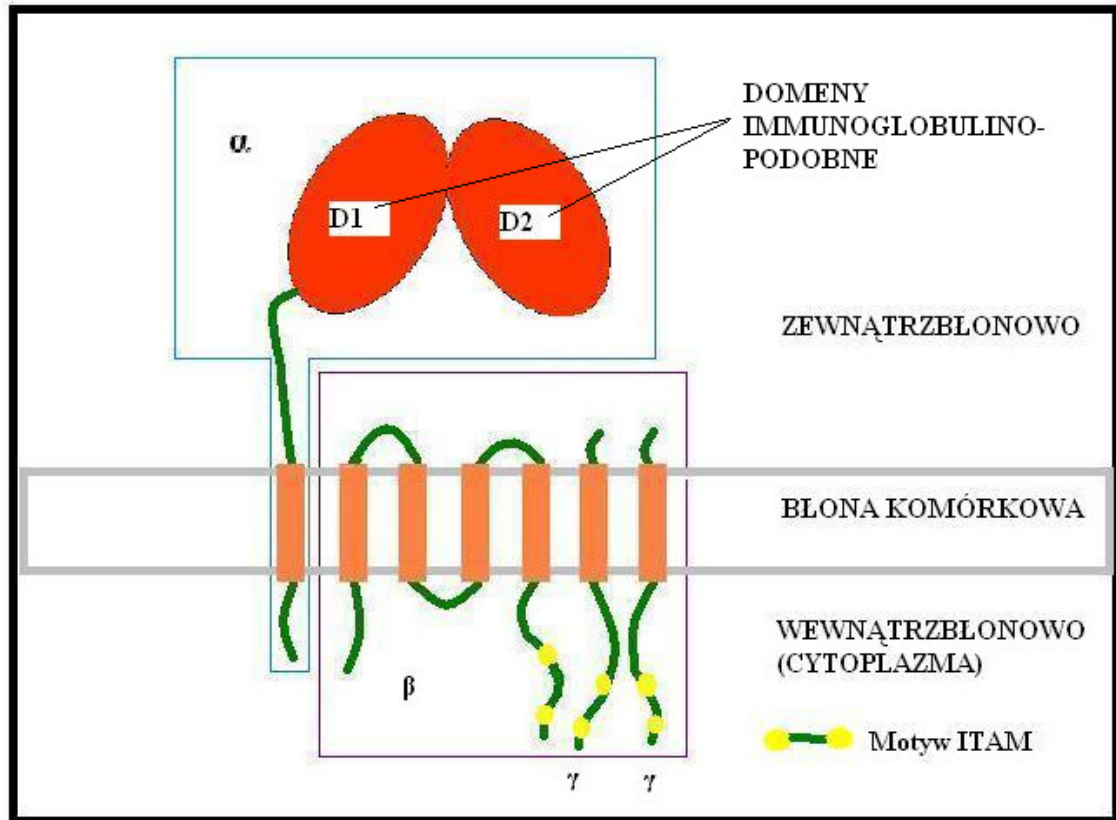
### 1.2.2.1 Ekspresja FcεRI

Początkowo uważano, że ekspresja ludzkiego FcεRI ograniczona jest do komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych. W toku dalszych badań okazało się, że występuje on także na powierzchni komórek Langerhansa, monocytów, komórek dendrytycznych. Przedmiotem kontrowersji i trwających dyskusji jest ekspresja FcεRI na powierzchni ludzkich granulocytów kwasochłonnych, granulocytów obojętnochłonnych i płytek krwi [8–16]. Ekspresja FcεRI u gryzoni ograniczona jest do mastocytów, bazofilii oraz komórek nie-B, nie-T [9].

### 1.2.2.2 Budowa FcεRI

U gryzoni cząsteczka FcεRI składa się obligatoryjnie z 4 podjednostek: 1 podjednostki  $\alpha$ , 1 podjednostki  $\beta$  i 2 podjednostek  $\gamma$  (heterotetramer  $\alpha\beta\gamma_2$ ). U ludzi sytuacja jest bardziej skomplikowana. FcεRI występujący na mastocytach i bazofilach ma podobnie jak u gryzoni budowę heterotetrameryczną, o tym samym składzie podjednostek ( $\alpha\beta\gamma_2$ ). Jak się natomiast wydaje, FcεRI występujący na powierzchni monocytów, komórek dendrytycznych i komórek Langerhansa pozbawiony jest podjednostki  $\beta$  i ma mniej stabilną strukturę heterotrimeryczną, obejmującą 1 łańcuch  $\alpha$  oraz 2 połączone ze sobą mostkami dwusiarczkowymi łańcuchy  $\gamma$  ( $\alpha\gamma_2$ ) [8,9,15,17–20]. Poglądowy schemat budowy FcεRI przedstawiono na Rycinie 2.





**Ryc. 2. Schemat receptora dla IgE o wysokim powinowactwie.**  
**W niebieskiej ramce część wiążąca antygen.**  
**W ramce fioletowej część odpowiedzialna za transdukcję sygnału.**

#### 1.2.2.2.1 Podjednostka $\alpha$ (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ )

Należący do nadrodziny immunoglobulin łańcuch  $\alpha$  receptora IgE o wysokim powinowactwie (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ) składa się z dwóch zewnątrzkomórkowych domen immunoglobulinopodobnych (D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>), hydrofobowego regionu przezbłonowego oraz krótkiego, obdarzonego dodatnim ładunkiem łańcucha cytoplazmatycznego (Rycina 2). Masa cząsteczkowa polipeptydu Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  wynosi 33 kDa, a uwzględniając reszty cukrowe – 45 kDa (podjednostka  $\alpha$  jest bogato glikozylowana) [3,9,21–23]. Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  stanowi część receptora bezpośrednio odpowiedzialną za wiązanie fragmentu Fc cząsteczki IgE, które to odbywa się poprzez dwie ułożone

przeciwrównoległe domeny immunoglobulinopodobne D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>. Stanowią one jedyną część FcεRI nie mającą bezpośredniego kontaktu z błoną komórkową lub wnętrzem komórki [9,24–26].

#### 1.2.2.2 Podjednostka β (FcεRIβ) i podjednostka γ (FcεRIγ)

Podjednostka β receptora IgE o wysokim powinowactwie (FcεRIβ) składa się z czterech domen przezbłonowych oddzielających N- i C-końcowy łańcuch wewnątrzkomórkowy. Podjednostka γ (FcεRIγ) jest zbudowana z części przezbłonowej i łańcucha cytoplazmatycznego (Rycina 2).

Zarówno FcεRIβ, jak i FcεRIγ posiadają w swojej części cytoplazmatycznej konserwatywne motywy ITAM (białkowa domena aktywująca się pod wpływem kinazy tyrozynowej), poprzez które wchodzi w interakcje z białkami sygnałowymi. W przeciwieństwie do FcεRIγ, motywy ITAM należące do FcεRIβ nie uczestniczą w samym procesie generowania przekazywanego sygnału, ale stanowią element go wzmacniający (3–5-krotnie) [3,5,27–33].

#### 1.2.2.3 Sygnalizacja przez FcεRI

Cząsteczka IgE wiąże się z FcεRI w stosunku 1:1 tworząc kompleksy IgE-FcεRI [9,19,22,25,34,35]. Związanie alergenu poliwalentnego do kilku cząsteczek IgE należących do takich kompleksów zlokalizowanych na powierzchni mastocytów lub bazofilii uruchamia kaskadę sygnałową. W skrócie, następuje agregacja podjednostek receptora i fosforylacja cytoplazmatycznych motywów ITAM przez kinazy związane z receptorem (Lyn, Syk). Aktywacji ulegają związane z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej kompleksy Gab2 i LAT, co z kolei prowadzi do aktywacji kinazy PI3K i fosfolipaz PLCγ1 i PLCγ2. Dochodzi do pobudzenia kinazy

PKC i zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$ , co doprowadza ostatecznie do degranulacji komórki tucznej lub granulocyta zasadochłonnego [3,9,34–42].

#### 1.2.2.4 Funkcje biologiczne FcεRI

##### 1.2.2.4.1 Odporność przeciwpasożytnicza

W związku z dowiedzionym znaczeniem IgE w odporności przeciwpasożytniczej, prowadzono także badania nad możliwą rolą FcεRI w tym procesie. Wykazano brak roli FcεRI w odporności immunologicznej przeciwko zakażeniu *Schistosoma masoni*. Udowodniono jednak, że w przypadku tego zakażenia FcεRI kontroluje procesy patologiczne wywołane przez pasożyta w organizmie żywiciela, takie jak tworzenie ziarniniaków i włóknienie w wątrobie. FcεRI może także odgrywać rolę w IgE-zależnych mechanizmach odporności przeciwko zakażeniu kleszczem *Haemophysalis longicornis* [9,43,44].

##### 1.2.2.4.2 Alergia IgE zależna (typ I nadwrażliwości)

FcεRI odgrywa kluczową rolę w pośredniczeniu IgE-zależnej aktywacji komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych. Spinanie kompleksów IgE-FcεRI zlokalizowanych na powierzchni mastocytów i bazofilii prowadzi do uruchomienia kaskady sygnałowej w tych komórkach, prowadzącej ostatecznie do ich degranulacji i uwalniania mediatorów reakcji alergicznej, takich jak histamina czy leukotrieny. W konsekwencji wywołuje to objawy nadwrażliwości typu I, leżącej u podłoża wielu chorób alergicznych. Nie istnieją alternatywne w stosunku do FcεRI mechanizmy

pośredniczenia reakcji alergicznej typu natychmiastowego [3,8,9,21,22,25,31,34].

#### 1.2.2.4.3 Prezentacja antygeny

Występująca u ludzi na powierzchni monocytów, komórek dendrtycznych i komórek Langerhansa forma trimeryczna FcεRI ( $\alpha\gamma_2$ ) posiada zdolność prezentacji antygeny. Proces ten odgrywa rolę w pobudzaniu limfocytów T i uruchamianiu pierwotnej, jak i FcεRI-zależnej, wtórnej odpowiedzi komórkowej. Najprawdopodobniej tak pobudzone limfocyty T stymulują wytwarzanie swoistej IgE oraz pośredniczą w reakcjach nadwrażliwości typu późnego w tkankach ekspozowanych na alergen [9,13–15,45].

#### 1.2.2.5 Budowa genów dla podjednostek FcεRI, kontrola ich ekspresji genetycznej i zagadnienia ich zmienności genetycznej

##### 1.2.2.5.1 Budowa genów dla podjednostek FcεRI i kontrola ich ekspresji genetycznej

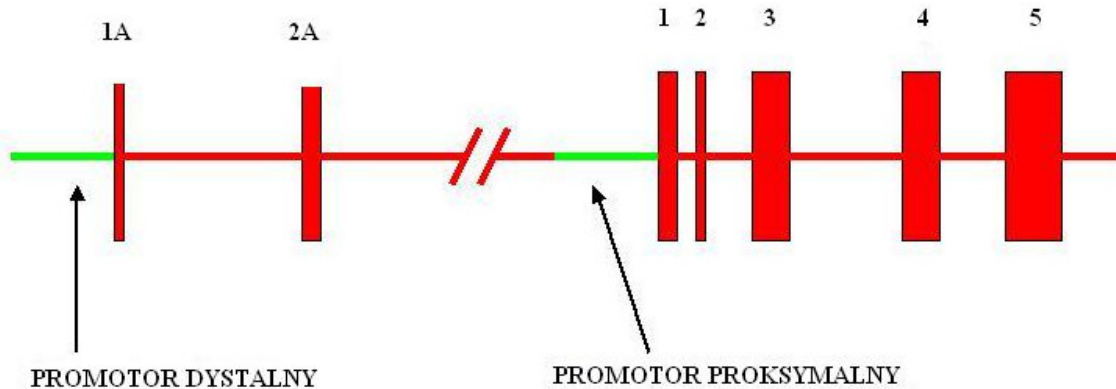
Każda z trzech podjednostek FcεRI kodowana jest przez odrębny gen.

##### 1.2.2.5.1.1 Gen kodujący FcεRIα (*FCERIA*)

Gen *FCERIA* zlokalizowany jest na chromosomie 1q23. Chociaż sekwencję kodującą *FCERIA* ustaliły dwie niezależne grupy już w roku 1988, to przez długi czas szczegóły jego budowy oraz regulacji pozostawały nieznanne [46–48]. Początkowo uważano, że w skład *FCERIA* wchodzi pięć eksonów (1–5) i jeden region kontrolny, zajmujące łącznie obszar około 6 kpz [46–49]. W toku dalszych badań prowadzonych przez

Nishiyamę i wsp. wykryto dwa dodatkowe eksony oraz nowy region regulatorowy [50–52]. Eksony te nazwano „1A” i „2A”. Znajdują się one w odległości około 18,4 i 12,6 kpz przed eksonem 1. Ekson 1A liczy 335 pz, natomiast ekson 2A jest znacznie krótszy i obejmuje jedynie 38 pz. Eksony te nie zawierają sekwencji kodujących [50–52]. Od strony 5’ eksonu 1A zlokalizowano obecność dodatkowego regionu regulatorowego nazwanego „promotorem dystalnym” [50–52]. Dla odróżnienia pierwotnie odkryty, główny region promotorowy sąsiadujący z eksonem 1 określono jako „promotor proksymalny” [50–52]. Na Rycinie 3 przedstawiono schemat budowy genu *FCERIA*.

Ekspresja *FCERIA* podlega kontroli obu wymienionych regionów regulatorowych [50–57]. Promotor proksymalny odpowiada za ekspresję konstytutywną, a mechanizmy jego regulacji są bardzo zbliżone u ludzi i u myszy. Aktywują go czynniki transkrypcyjne GATA-1 i PU.1 (swoiste dla komórek hematopoetycznych) oraz YY1 (występujący w licznych typach komórek i posiadający wiele różnych funkcji), natomiast czynnik Elf-1 (należący wraz z PU.1 do rodziny Ets) wywiera działanie represyjne [52–57]. Transkrypcja poprzez promotor dystalny ma charakter indukowany, regulowany u ludzi przez interleukinę-4, choć jak dotąd nie jest znany pośredniczący w tym hipotetyczny aktywator promotora dystalnego. Znane są natomiast supresory promotora dystalnego. Są to: PU.1, YY1 i Elf-1 [50–52].



**Ryc. 3. Schemat genu łańcucha  $\alpha$  receptora o wysokim powinowactwie dla IgE. W postaci ponumerowanych prostokątów przedstawiono eksony.**

#### 1.2.2.5.1.2 Gen kodujący Fc $\epsilon$ RI $\beta$ (*FCER1B*)

Gen kodujący Fc $\epsilon$ RI $\beta$  lokalizuje się na chromosomie 11q13. Ma długość około 7 kpz i zawiera 7 eksonów. Jego regulacja ma odmienny charakter u ludzi i gryzoni, związany prawdopodobnie z odmienną dystrybucją tkankową Fc $\epsilon$ RI $\beta$ . W mastocytach myszy transkrypcja genu podlega swoistej aktywacji przez czynnik GATA-1, posiadający cztery miejsca wiązania w regionie promotorowym. U ludzi, promotor *FCER1B* jest aktywowany przez czynnik transkrypcyjny Oct-1 (występujący powszechnie w różnych typach komórek) wiążący się do bogatej w parę AT sekwencji w regionie 5'UT, natomiast wiążący się w obrębie sekwencji intronowej pomiędzy eksonami 3 i 4 czynnik MZF wywiera działanie supresyjne [8,52,57–62].

#### 1.2.2.5.1.3 Gen kodujący FcεRIγ (*FCER1G*)

Gen kodujący FcεRIγ (*FCER1G*) zlokalizowany jest na chromosomie 1q23. Obejmuje 4 kpz i zawiera pięć eksonów [8,63].

#### 1.2.2.5.2 Zagadnienia zmienności genów kodujących FcεRI

##### 1.2.2.5.2.1 Zmienność genetyczna *FCERIA*

Dotychczas opublikowano jedynie trzy badania dotyczące zmienności genetycznej *FCERIA* [64–66]. Shikanai i wsp. [64] przeprowadzili badanie przesiewowe w rejonach eksonów 1–5 i promotora proksymalnego w grupie chorych na astmę. W obrębie promotora proksymalnego wykazali obecność trzech mutacji: dwóch względnie rzadkich (–770 A>C, –664 G>A) i jednej częściej [–335 T>C (określanej w tej pracy jako –344 C>T; Rozdział 4.1.1.1)] [64]. Następnie określili częstość wykrytych polimorfizmów w grupie chorych na astmę i zdrowej grupie kontrolnej obywateli USA pochodzenia europejskiego oraz w analogicznych grupach Afro-Amerykanów. Nie wykazali różnic w częstościach allelicznych odkrytych polimorfizmów pomiędzy grupami chorych na astmę i grupami kontrolnymi [64]. Stwierdzili natomiast częstsze występowanie homozygot –344 CC w grupie chorych na astmę z mniejszymi całkowitymi stężeniami IgE w surowicy [64].

Również w zakresie regionu promotora proksymalnego, Hasegawa i wsp. [65] wykryli obecność polimorfizmu –66 T>C (określanego w tej pracy jako –95 T>C; Rozdział 4.1.1.1). Zaobserwowali rzadsze niż u osób zdrowych występowanie allelu –95 C w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry w populacji japońskiej [65]. W przeprowadzonych

badaniach czynnościowych polimorfizmu –95 T>C wykazali wyższą aktywność promotora proksymalnego w przypadku obecności allelu T, co wiąże się najprawdopodobniej z występowaniem dodatkowego miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego GATA-1 [65].

W trzecim opublikowanym badaniu nad zmiennością genetyczną *FCERIA*, Bae i wsp. [66] badali znaczenie obu odkrytych wcześniej polimorfizmów (–344 C>T i –95 T>C) w etiologii przewlekłej pokrzywki idiopatycznej z i bez nadwrażliwości na aspirynę. Stwierdzili częstsze występowanie allelu –344 T w grupie chorych na przewlekłą pokrzywkę idiopatyczną z nadwrażliwością na kwas acetylosalicylowy niż w grupie chorych bez nadwrażliwości na aspirynę i zdrowej grupie kontrolnej [66]. Allel –95 C występował częściej u chorych na przewlekłą pokrzywkę z nadwrażliwością na aspirynę niż u chorych bez nadwrażliwości na aspirynę. Nie stwierdzono natomiast różnic częstości allelicznych polimorfizmu –95 T>C pomiędzy chorymi na pokrzywkę z nadwrażliwością na aspirynę i zdrową grupą kontrolną [66]. Promotor proksymalny zawierający allel –344 T charakteryzował się większą aktywnością transkrypcyjną [66].

Znane są zetem jak dotąd cztery polimorfizmy genu *FCERIA* [8,64–66].

#### 1.2.2.5.2.2 Zmienność genetyczna *FCER1B*

W przeciwieństwie do genu *FCERIA*, wiele uwagi poświęcono natomiast roli zmienności genu *FCER1B* w etiologii chorób alergicznych [8,67–70]. Historia tych badań rozpoczęła się od wykrycia sprzężenia pomiędzy występowaniem atopii i chromosomem 11q13 [71,72] i stwierdzenia sprzężenia pomiędzy znajdującym się w tej lokalizacji chromosomowej genem *FCER1B* i atopią [73,74]. Od tego czasu powstały liczne prace dotyczące roli zmienności genetycznej *FCER1B* w etiologii i patogenezie



chorób alergicznych [8,62, 66–70, 75–94]. Jak na razie poznano 38 wariantów polimorficznych genu *FCER1B* [8]. Polimorfizmy *FCER1B* wiązano z atopią [75,77,83,87], całkowitymi stężeniami IgE w surowicy [78,84], astmą [76,79,82,88,89,93,94], nadreaktywnością oskrzeli [77,83], alergicznym nieżytem nosa [86], atopowym zapaleniem skóry [80] i nadwrażliwością na aspirynę [94].

#### 1.2.2.5.2.3 Zmienność genetyczna *FCER1G*

Istnieje tylko jedno opublikowane badanie dotyczące zmienności genetycznej *FCER1G* [8,63]. Poszukiwano w nim polimorfizmów *FCER1G* w populacjach chorych na toczenia rumieniowatego układowego i w zdrowej grupie kontrolnej. Stwierdzono, że gen *FCER1G* jest bardzo konserwatywny pod względem sekwencji i znaleziono tylko jedną jego mutację, obecną w postaci heterozygotycznej u jednego z badanych [8,63].

#### 1.2.2.6 Regulacja FcεRI

Regulację ekspresji genów poszczególnych podjednostek omówiono powyżej.

Jak się wydaje, ważną rolę w regulacji ekspresji FcεRI na powierzchni komórek odgrywa podjednostka β. Przyłączanie się FcεRIβ wraz z FcεRIγ do łańcuchów α na terenie siateczki śródplazmatycznej zapobiega ich degradacji, a umożliwia dojrzewanie (poprzez glikozylację w aparacie Golgiego) i wędrówkę białka FcεRIα na powierzchnię błony komórkowej. Ostatnio wykryto powstający na drodze alternatywnego *splicingu* wariant β<sub>T</sub> podjednostki β. W przeciwieństwie do klasycznej formy FcεRIβ, wariant β<sub>T</sub> zapobiega powierzchniowej ekspresji łańcucha α (a przez to całego FcεRI) poprzez blokowanie jego dojrzewania [3,8,60].

Ważnym elementem regulacji ekspresji FcεRI jest jego interakcja z IgE. Wykazano, że wiązanie IgE z receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek zapobiega ich degradacji. Uważa się, że samo przyłączanie się IgE do FcεRI wyzwała sygnalizację do wnętrza komórki, podobną, ale o dużo mniejszym nasileniu niż w przypadku tej wywoływanej spinaniem kompleksów IgE-FcεRI przez alergeny poliwalentne. Sygnały te zapobiegają degradacji FcεRI, zwiększając tym samym ich ekspresję [3,95,96].

Niedawno wykazano również zdolność TGF-β1 do zmniejszania ekspresji FcεRI i supresji czynności mastocytów [97].

### 1.3 Astma

Astma jest wieloczynnikową zapalną chorobą dolnych dróg oddechowych, w której na predyspozycje genetyczne nakładają się wpływy środowiskowe [8,67–70,98–101]. Przewlekłe zapalenie, obrzęk błony śluzowej, nadprodukcja śluzu, nadreaktywność i napady skurczu mięśni gładkich oskrzeli są źródłem objawów takich jak świsty, kaszel, uczucie ucisku w klatce piersiowej i duszność. Przewlekły charakter choroby może prowadzić do bliznowacenia zmienionych zapalnie oskrzeli, będącego przyczyną trwałego i nieodwracalnego ich uszkodzenia i ograniczenia przepływu powietrza [8,98–101]. Astmę możemy podzielić na astmę atopową (wewnątrzpochodną) i nieatopową (zewnątrzpochodną) [98–101]. W astmie atopowej proces zapalny zapoczątkowany jest przez reakcję alergenu wziewnego (roztocza kurzu domowego, pyłki traw, sierść zwierząt, itd.) ze swoistymi IgE zakotwiczonymi na FcεRI granulocytów zasadochłonnych i komórek tucznych. Reakcja alergenu ze swoistą IgE prowadzi to do uwalniania z tych komórek mediatorów reakcji alergicznej (takich jak histamina), wyzwalających typowe objawy astmy. Postać ta

charakteryzuje się początkiem objawów w dzieciństwie i młodym wieku (najczęściej), obecnością współtowarzyszących innych chorób atopowych (atopowe zapalenie skóry, katar sienny), tendencją do rodzinnego występowania, zaostrzeniami po ekspozycji na alergen, dodatnimi wynikami punktowych testów skórnych ze swoistymi alergenami, jak również obecnością w surowicy krwi alergenowo swoistych IgE [8,98–106].

W wyniku nawracających infekcji w przebiegu astmy nieatopowej dochodzi do rozwoju przewlekłego zapalenia w drogach oddechowych, zniszczenia nabłonka oskrzeli i uwolnienia mediatorów, podobnie jak w astmie atopowej. Astma nieatopowa rozpoczyna się zwykle po 30. roku życia i ma najczęściej przebieg przewlekły i postępujący. Astma atopowa może po pewnym czasie upodabniać się do astmy nieatopowej [98–101].

Szczególne postacie astmy stanowią astma aspirynowa (Rozdział 1.6.1) i astma zawodowa.

#### 1.4 Przewlekła pokrzywka idiopatyczna

Przewlekłą pokrzywkę idiopatyczną definiuje się jako codzienne (lub prawie codzienne) przez co najmniej 6 tyg. występowanie na skórze zmian o charakterze krótkotrwałych (<24 godz.) swędzących bąbli, po wykluczeniu możliwych fizycznych przyczyn ich powstawania [107–109]. Główną rolę w patogenezie choroby odgrywa degranulacja mastocytów skóry i uwalnianie histaminy i innych mediatorów naczynioruchowych wywołujących objawy kliniczne. Co ciekawe, u większości chorych nie udaje się zidentyfikować swoistych alergenów i IgE odpowiedzialnych za aktywację kompleksów IgE-FcεRI zlokalizowanych na powierzchni mastocytów [107–109].

## 1.5 Przewlekły alergiczny nieżyt nosa

Alergiczny nieżyt nosa definiuje się jako objawowe zaburzenie czynności nosa wywołane pośredniczonym przez IgE zapaleniem, rozwijającym się wskutek ekspozycji błony śluzowej nosa na alergen [110–115]. Do objawów alergicznego zapalenia nosa należą wodnisty wyciek z nosa, katar, kichanie, swędzenie i upośledzenie drożności nosa. Przewlekłym alergicznym nieżytem nosa określa się występowanie objawów przez ponad 4 dni tygodnia, przez ponad 4 tygodnie w ciągu roku [110,111,113,115].

## 1.6 Nadwrażliwość na aspirynę

Aspiryna i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) mogą wywoływać reakcje anafilaktoidalne, przejawiające się nadprodukcją leukotrienów cysteinylowych. Objawy kliniczne takich reakcji wywołane są zahamowaniem aktywności cyklooksygenazy-1 (COX-1), przy jednoczesnej dobrej tolerancji wybiórczych inhibitorów cyklooksygenazy-2 (COX-2). Objawy nadwrażliwości na aspirynę mogą lokalizować się w płucach i oskrzelach (astma), przewodzie pokarmowym, górnych drogach oddechowych (polipy nosa) i skórze (pokrzywka). Komórkami krytycznymi dla tych niepożądanych reakcji są w płucach eozynofile i mastocyty, natomiast w skórze przypuszczalnie tylko mastocyty [116–118].

### 1.6.1 Astma aspirynowa

Astma aspirynowa jest szczególną postacią astmy, dotyczącą około 10% chorych na astmę atopową i nieatopową. Jej wystąpienie poprzedzone jest często utrzymującym się wiele lat wodnistym katarzem i obecnością

polipów nosa. Czynnikiem spustowym rozpoczynającym astmę aspirynową jest przyjęcie kwasu acetylosalicylowego lub innego NLPZ. Od tego momentu każda próba spożycia NLPZ wywołuje katar, łzawienie oczu oraz napady duszności, które mogą być groźne dla życia [116,119–129].

Uważa się, że początek rozwoju choroby stanowi infekcja wirusowa lub uszkodzenie błony śluzowej dróg oddechowych, pobudzające migracją i aktywację komórek odczynu zapalnego (głównie mastocytów i granulocytów kwasochłonnych) na terenie górnych i dolnych dróg oddechowych. Produkty COX-1 i COX-2 obejmują prostaglandynę D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) w komórkach tucznych oraz prostaglandynę E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) we wszystkich komórkach biorących udział w tym procesie. PGD<sub>2</sub> pośredniczy skurcz mięśni gładkich dróg oddechowych i rozkurcz naczyń krwionośnych. Z kolei PGE<sub>2</sub> hamuje częściowo (choć nie do końca skutecznie) 5-lipooksygenazę (5-LO) i białko FLAP (białko aktywujące 5-lipooksygenazę) i degranulację mastocytów. Następuje zwiększenie ekspresji receptorów leukotrienów cysteinyłowych (Cys-LT<sub>1</sub>). Aspiryna i inne NLPZ hamują COX-1, główny enzym kontrolujący wytwarzanie PGE<sub>2</sub>, co umożliwia nieograniczone wytwarzanie leukotrienów i uwalnianie gotowych mediatorów z komórek tucznych i eozynofili. Wywołuje to objawy oddechowe nadwrażliwości na aspirynę. Działanie leukotrienów w górnych drogach oddechowych zachodzi poprzez receptory Cys-LT<sub>1</sub> i częściowo Cys-LT<sub>2</sub>, natomiast komórki mięśni gładkich dolnych dróg oddechowych wykazują ekspresję głównie Cys-LT<sub>1</sub>. W górnych drogach oddechowych ważną rolę odgrywa uwalniana z mastocytów histamina, natomiast jej znaczenie w przebiegu choroby w dolnych drogach oddechowych jest niewielkie lub żadne [116,119–129].

### 1.6.2 Pokrzywka z nadwrażliwością na aspirynę

Aspiryna wywołuje lub zaostrza pokrzywkę przewlekłą u 20–40% chorych. Pokrzywkowa reakcja skórna objawia się w ciągu 15 min do 24 godz. (przeciętnie 1–4 godz.) od przyjęcia aspiryny lub innego NLPZ i ustępuje w czasie od kilku godz. do dwóch dni, choć czasem może utrzymywać się nawet przez dwa tygodnie [116,130–133].

Choć etiologia pokrzywki wywoływanej i(lub) zaostrzanej przez aspirynę nie jest do końca jasna, to przypuszcza się, że jej mechanizm jest podobny jak w przypadku astmy aspirynowej. U chorych na pokrzywkę aspirynową podstawowe stężenie leukotrienu E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) w moczu jest zwiększone, a przyjęcie NLPZ prowadzi do nasilenia wytwarzania leukotrienów cysteinylowych, których główne źródło stanowią jak się wydaje komórki tuczne i granulocyty kwasochłonne. Wydaje się zatem, że objawy pokrzywki aspirynowej reprezentują reakcję niealergiczną, w której szybki spadek stężenia PGE<sub>2</sub> powoduje degranulację mastocytów i wzmożenie wywarzania leukotrienów cysteinylowych, co ostatecznie prowadzi do wystąpienia wykwitów skórnych [116,130–133].

### 1.6.3 Zmienność genów kodujących FcεRI a nadwrażliwość na aspirynę

Zagadnieniom genetycznym nadwrażliwości na aspirynę poświęcono wiele badań [66,92,94,133–139], także tych dotyczących zmienności genetycznej *FCER1B* i *FCER1A*. Stwierdzono, że polimorfizm –109 T>C *FCER1B* zwiększa ekspresję FcεRIβ w mastocytach prowadząc do nasilenia uwalniania mediatorów prozapalnych w drogach oddechowych i przez to może się przyczyniać do większej podatności na rozwój astmy aspirynowej [94]. Polimorfizmy *FCER1B* nie odgrywają jednak roli w patogenezie pokrzywki aspirynowej [92]. Relacjonowano natomiast

możliwy wpływ polimorfizmów -344 C>T i -95 T>C *FCERIA* na patogenezę pokrzywki aspirynowej (Rozdział 1.2.2.5.2.1) [66].

### 1.7 Przeciwciała przeciw IgE i(lub) przeciw FcεRI

Chociaż uważa się, że degranulacja mastocytów odgrywa kluczową rolę w rozwoju objawów pokrzywki, to u większości chorych nie udaje się wykryć żadnych swoistych czynników „spustowych”. W ostatnich latach wykazano jednak, że śródskórne podanie surowicy autologicznej wywołuje natychmiastową degranulację mastocytów z powstawaniem bąbli pokrzywkowych i zaczerwienienia [107,108,130,140–144]. Ustalono następnie, że przyczyną powstawania takiego odczynu jest obecność w surowicy autoprzeciwciał klasy IgG przeciw FcεRI i(lub) IgE, występujących u około jednej trzeciej chorych na przewlekłą pokrzywkę idiopatyczną. Takie autoprzeciwciała mogą mieć charakter czynnościowy lub nie posiadać żadnej znanej aktywności. Te pierwsze wywołują *in vitro* uwalnianie histaminy z granulocytów zasadochłonnych zdrowych dawców i komórek tucznych skóry [107,108,130,140–144]. Początkowo uważano, iż aktywacja mastocytów odbywa się przez bezpośrednie spinanie FcεRI lub IgE-FcεRI przez autoprzeciwciała. Obecnie wydaje się jednak, że pewną rolę w pobudzaniu mastocytów może także odgrywać receptor dopełniacza. Mechanizm działania autoprzeciwciał przeciw IgE i(lub) przeciw FcεRI pozostaje zatem niejasny i wymaga dalszych badań [107,108,130,140–144]. Obecność autoprzeciwciał przeciw IgE i(lub) przeciw FcεRI wykazano również u chorych na atopowe zapalenie skóry [145].

Autoprzeciwciała przeciw IgE i(lub) przeciw FcεRI obserwowano także u chorych na pokrzywkę aspirynową. Nie jest jednak jasne jaką rolę odgrywają zjawiska autoimmunologiczne w przebiegu tej formy pokrzywki

i jaki jest ich związek z nadwrażliwością na kwas acetylosalicylowy [130]. Co ciekawe, już wcześniej opisywano obecność zjawisk autoimmunologicznych u chorych z nadwrażliwością na NLPZ, choć o innym charakterze. Szczeklik i wsp. stwierdzili obecność przeciwciał przeciw cytoplazmie neutrofilów (ANCA) oraz przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) u chorych na astmę aspirynową [146,147].



## 2 Założenia i cele pracy

Cele badania obejmowały:

- 1). przesiewowe poszukiwanie mutacji w zakresie regionu promotora dystalnego, eksonu 1A, eksonu 2A, eksonów 1–5 i regionu promotora proksymalnego genu *FCERIA* w heterogennej grupie badanej obejmującej chorych na astmę, astmę aspirynową, przewlekłą pokrzywkę idiopatyczną lub pokrzywkę aspirynową;
- 2). określenie częstości znanych i nowych polimorfizmów genu *FCERIA* w grupie chorych na astmę, astmę aspirynową, przewlekłą pokrzywkę idiopatyczną, pokrzywkę aspirynową, przewlekły alergiczny nieżyt nosa i pospolitą alergię pyłkową, jak i w dobranej względem płci i wieku kontrolnej grupie populacyjnej;
- 3). ustalenie zależności między wariantami genetycznymi *FCERIA* a wskaźnikami alergii (IgE, eozynofilia bezwzględna), nadwrażliwością na aspirynę, obecnością zjawisk autoimmunologicznych [autoprzeciwciała przeciw FcεRI i(lub) IgE];
- 4). analiza genetyczna cech ilościowych (IgE) w oparciu o haplotypy badanych polimorfizmów.

## 3 Materiały i metody

### 3.1 Grupy badane

#### 3.1.1 Grupa chorych

Pokrzywkę określano jako przewlekłą, jeżeli wykwity skórne występowały codziennie lub prawie codziennie przez ponad 6 tygodni [109]. Przewlekły alergiczny nieżyt nosa rozpoznawano jeżeli jego objawy obserwowano przez ponad 4 dni tygodnia, przez ponad 4 tygodnie w ciągu roku [110]. Astmę rozpoznawano zgodnie z kryteriami GINA (Aktualizacja z 2002 roku i Rewizja z 2005 roku) [98,99]. U chorych na astmę choroba miała przebieg stabilny i u wszystkich pacjentów wynik FEV<sub>1</sub> w spirometrii podstawowej wynosił >80%. W badanej grupie chorych na astmę dozwolone było przyjmowanie jedynie wziewnych steroidów oraz  $\beta_2$ -mimetyków długodziałających. Wszyscy chorzy na choroby alergiczne zaprzeczali przyjmowaniu steroidów ogólnoustrojowych lub leków przeciwhistaminowych w ciągu 3 tygodni poprzedzających badanie.

Główna grupa chorych na choroby alergiczne obejmowała 154 osoby chore na: astmę (n = 88), pokrzywkę przewlekłą (n = 50), przewlekły alergiczny nieżyt nosa (n = 5) i pospolitą alergią pyłkową (n = 11). Atopię [definiowaną jako całkowite stężenie IgE w surowicy >100 IU/ml i(lub) dodatni wynik punktowych testów skórnych w kierunku 6 pospolitych alergenów wziewnych] stwierdzono u 116 spośród 154 badanych. Wykonana u chorych z nawet niewielkim podejrzeniem nadwrażliwości na aspirynę (n = 121) doustna próba z kwasem acetylosalicylowym wykazała jej obecność u 54 osób chorych na astmę lub pokrzywkę. Pozostałą charakterystykę grupy zamieszczono w Tabeli 1.

W przypadku rzadkiego polimorfizmu -12663 A>G pomniejszona grupa badana obejmowała 99 osób chorych na astmę (n = 50) lub pokrzywkę (n = 49). W tej grupie testy skórne były dodatnie u 44 spośród 99 badanych, a atopię (definiowaną jak powyżej) stwierdzono u 70 spośród 99 pacjentów. Wykonana u wszystkich chorych w tej grupie doustna próba prowokacyjna z kwasem acetylosalicylowym wykazała obecność nadwrażliwości na aspirynę u 47 spośród 99 badanych. W Tabeli 2 zamieszczono pozostałe cechy charakterystycznej tej podgrupy.

### 3.1.2 Grupa kontrolna

Główna grupa kontrolna obejmowała 154 osoby pochodzące z losowej próby populacyjnej mieszkańców Krakowa (n = 550). Tabela 1 przedstawia charakterystykę tej grupy.

W przypadku polimorfizmu -12663 A>G pomniejszona grupa kontrolna obejmowała 99 osób, dobranych z tej samej próby populacyjnej. Charakterystyka tej podgrupy znajduje się w Tabeli 2.

Grupa kontrolna (n = 154) (Tabela 1) oraz pomniejszona grupa kontrolna dla polimorfizmu -12663 A>G (n = 99) (Tabela 2) zostały dobrane względem płci i wieku.

**Tabela 1.** Charakterystyka badanych grup – grupy główne.

	Grupa chorych na choroby alergiczne (n = 154)	Grupa kontrolna (n = 154)	<i>P</i>
Wiek (lata)	40,4 ± 1,1	40,2 ± 1,1	0,87
Płeć (M:F)	48/106	48/106	1,0
Całkowite stężenie IgE w surowicy (IU/ml)	122,0 ± 256,5	30,5 ± 78,2	<0,000001
Eozynofilia bezwzględna (/μl)	162,0 ± 299,0	–	–

**Tabela 2.** Charakterystyka badanych grup – grupy pomniejszone, badane pod kątem polimorfizmu –12663 A>G.

	Grupa chorych na choroby alergiczne ( <i>n</i> = 99)	Grupa kontrolna ( <i>n</i> = 99)	<i>P</i>
Wiek (lata)	44,9 ± 1,3	44,6 ± 1,3	0,81
Płeć (M:F)	29/70	29/70	1,0
Całkowite stężenie IgE w surowicy (IU/ml)	101,0 ± 221,3	26,4 ± 56,0	<0,0001
Eozynofilia bezwzględna (/ $\mu$ l)	147,0 ± 237,2	–	–

## 3.2 Metodyka

### 3.2.1 Badania genetyczne

#### 3.2.1.1 Plan badań genetycznych

Pierwszy etap badań genetycznych obejmował przesiewowe poszukiwanie zmienności genetycznych w najbardziej istotnych regionach genu *FCERIA* (wszystkie eksony, oba regiony regulatorowe) metodą polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA (SSCP). W drugim etapie, w przypadku znalezienia odmiennych wzorców migracji techniką SSCP, określano jakościowo charakter podejrzewanej zmienności genetycznej z zastosowaniem techniki sekwencjonowania pośredniego (matryca do reakcji sekwencjonowania została uzyskana drogą klonowania bakteryjnego insertów pochodzących z DNA genomowego). Trzeci etap badań obejmował określenie częstości allelicznej i rozkładu genotypowego wykrytych polimorfizmów w obu badanych grupach. W czwartym etapie

dokonano analizy częstości allelicznych, genotypów i haplotypów oznaczanych polimorfizmów, a także analizy zależności pomiędzy parametrami jakościowymi i ilościowymi a otrzymanymi genotypami i haplotypami o nieznannej fazie gametycznej (Rycina 4).

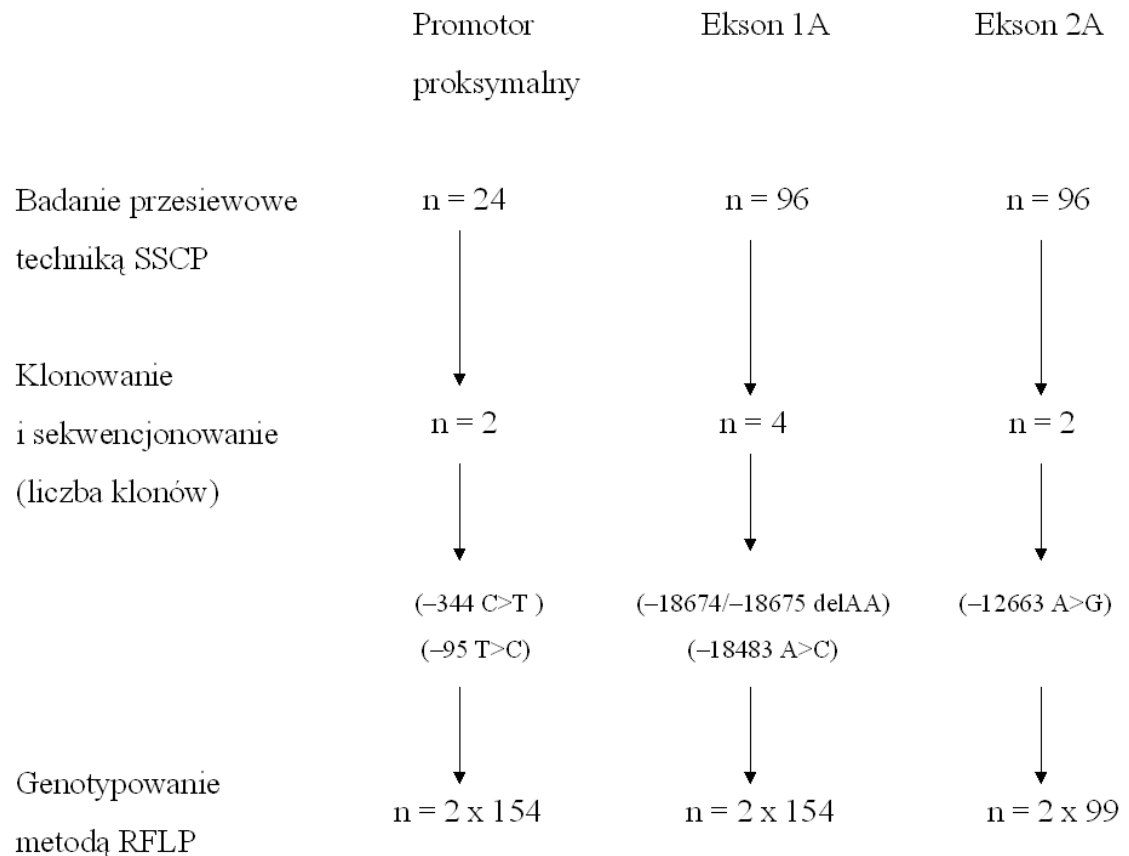
### 3.2.1.2 Izolacja DNA

Genomowe DNA izolowano metodą nieenzymatyczną z leukocytów z krwi obwodowej, pobieranej do próbek z zawartością wersenianu disodowego (EDTA). Do próbek krwi pełnej dodawano 1/100 objętości 6% dekstranu w celu sedimentacji krwinek białych i odstawiano w temperaturze 4°C na około 1 godzinę. Po upływie tego czasu zbierano bogatokomórkowy nasącz i odwirowywano [2 000 RPM (obrotów na minutę), 10 min]. Następnie usuwano nasącz, a osad komórek zalewano 0,4 ml DNAzolu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), środka lizującego będącego roztworem izotiocyjanianu guanidyny. Po lizie komórek, DNA wytrącano 95% alkoholem etylowym dodawanym w objętości 0,2 ml. Wyizolowane DNA płukano kilkakrotnie w objętości 0,5 ml 70% alkoholu etylowego i suszono w cieplarni w 37°C przez około 30 min. Po wysuszeniu, DNA rozpuszczano 350µl wody podwójnie destylowanej. Tak otrzymany materiał przechowywano w temperaturze -20°C.

### 3.2.1.3 Zaprojektowane startery polimerazowych reakcji łańcuchowych (PCR)

W Tabeli 3 przedstawiono wszystkie startery zaprojektowane (z zastosowaniem programu Primer3, dostępnego na stronie [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) i

zsyntetyzowane (TIB Molbiol, Poznań, Polska) dla celów niniejszego badania.



**Rycina 4.** Schemat metodyki poszukiwania i identyfikowania zmienności genetycznych na przykładzie 5 badanych polimorfizmów genu kodującego FcεRI (*FCERIA*). Badania genotypu techniką RFLP wykonano w równolicznych grupach badanej i kontrolnej.

**Tabela 3.** Startery zaprojektowane dla niniejszego badania.

Startery sensowne	Startery antysensowne
1. ACC TGG CAT ATG TTT GGT ATT CAG	A. TCA TGG ACT CCT GGT GCT TAC T
2. GCC TAT ATT TGA AGC CTT AGA T	B. CAC AGT AAA GGT TCC TAC CC
3. TAA AGA AGA CTG CTG GAC ACT A	C. AAG TGA TGG GAC GAA GAA
4. AAG CCT AGA CAG TTT TCA ATG ACT	D. CTT CAG ATG AGC CAT CCC T
5. GCG TGG CTC TCT TTT CTC TAT TCA	E. TCT CTT CCT TCC CCT GCT ATG G
6. TCA GTT CCC AAG ATG AAT TAT GTT	F. CAA GCT GTG TTT GAC AAT TGA GTA
7. GGA GAA GGA AGC ACT TTC CA	G. CCA GCC TTC AGG TTC TAC CTT
8. TCT CAT TGG AGT TAT TAG GCA CAA	H. GTG TGG CCA TCA CCC TTT AC
9. TTA CCA CAG CAA GAC AAG CA	I. CTC AGT CCT TTC ATG CCT TTT
10. GCT GAT GGG TTA ACC AGA <u>TGT</u> G*	J. ACT CCA ACA ATC CCC AAC AG
11. TGC AGA TTT CAA GAG CTG TG	K. CTC AAG CCA AAT GAG <u>CCC</u> A**

\*Starter mutagenny (nukleotyd podkreślony) wprowadzający miejsce restrykcyjne dla endonukleazy *NmuCI*.

\*\* Starter mutagenny (nukleotyd podkreślony) wprowadzający miejsce restrykcyjne dla endonukleazy *Hsp92II*.

#### 3.2.1.4 Warunki reakcji PCR

Polimerazowe reakcje łańcuchowe (PCR) dla celów niniejszego badania przeprowadzono w termocyklerze T3 thermocycler (Biometra, Getynga, Niemcy) z użyciem polimerazy *Taq* firmy Finnzymes (Espoo, Finlandia) oraz dideoksynukleotydów firmy Fermentas (Wilno, Litwa).

Stosowano jedne z trzech wymienionych poniżej warunków reakcji:

##### A. PCR-1.

Cykl termiczny:

- |                        |               |
|------------------------|---------------|
| 1. denaturacja wstępna | 94°C, 5 min   |
| 2. denaturacja         | 94°C, 30 sek. |
| 3. hybrydyzacja        | 58°C, 30 sek. |
| 4. elongacja           | 72°C, 1 min   |
| 5. elongacja końcowa   | 72°C, 10 min  |

Etapy 2–4 powtarzały się w 34 cyklach.

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej obejmowała:

10 mM Tris-HCl

50 mM KCl

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

5 pmol każdego z danej pary starterów

0,2 mmol każdego nukleotydu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,8 U polimerazy *Taq*

0,1 µg DNA genomowego

do 25 µl wody podwójnie destylowanej



## B. PCR-2

Cykl termiczny:

1. denaturacja wstępna 94°C, 5 min
2. denaturacja 94°C, 30 sek.
3. hybrydyzacja 59°C, 30 sek.
4. elongacja 72°C, 1 min
5. elongacja końcowa 72°C, 10 min

Etapy 2–4 powtarzały się w 34 cyklach.

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej i obejmowała:

10 mM Tris-HCl

50 mM KCl

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

5 pmol każdego z danej pary starterów

0,2 mmol każdego nukleotydu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,8 U polimerazy *Taq*

2% DMSO

0,1 µg DNA genomowego

do 25 µl wody podwójnie destylowanej

## C. PCR-3

Cykl termiczny:

1. denaturacja wstępna 94°C, 5 min
2. denaturacja 94°C, 1 min
3. hybrydyzacja 58°C, 30 sek.
4. elongacja 72°C, 1 min
5. elongacja końcowa 72°C, 10 min

Etapy 2–4 powtarzały się w 25 cyklach.

Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej i obejmowała:

10 mM Tris-HCl

50 mM KCl

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

5 pmol każdego ze starterów „M13 Forward”, „M13 (-20) Reverse”\*

0,2 mmol każdego nukleotydu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,8 U polimerazy *Taq*

niewielką ilość bakterii przeniesionych z kolonii

do 25 µl wody podwójnie destylowanej

\*„M13 Forward”: GTA AAA CGA CGG CCA G; „M13 (-20) Reverse”:  
CAG GAA ACA GCT ATG AC (TOPO TA-Cloning Kit, Invitrogen,  
Carlsbad, CA, USA)

Jakość amplifikacji wszystkich typów reakcji PCR oceniano z zastosowaniem przeprowadzanej w aparacie marki Biometra (Getynga, Niemcy) elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (Agarose SFR, Amresco, Solon, OH, USA) z dodatkiem bromku etydy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), po obciążeniu próbek buforem Loading Dye Solution (Fermentas, Wilno, Litwa) i względem markera długości pBR322 DNA/*AluI* Marker (Fermentas, Wilno, Litwa).

#### 3.2.1.5 Metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)

Układy doświadczalne techniki polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) wykorzystane w niniejszej pracy przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4.** Układy techniki polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) stosowane w niniejszym badaniu.

	Mutacja	Zastosowane startery	Warunki amplifikacji	Zastosowana endonukleaza restrykcyjna	Warunki trawienia (ilość enzymu, temperatura, czas)	Długości fragmentów restrykcyjnych
RFLP-1	-344 C>T	„1” + „A”	„PCR-2”	<i>MnII</i> (Fermentas, Wilno, Litwa)	37°C, cała noc	C: 220, 93, 62, 12 T: 220, 155, 15
RFLP-2	-95 T>C	„10” + „B”	„PCR-1”	<i>NmuCI</i> (Fermentas, Wilno, Litwa)	37°C, cała noc	T: 252 C: 232, 20
RFLP-3	-12663 A>G	„8” + „H”	„PCR-1”	<i>TaqI</i> (Fermentas, Wilno, Litwa)	65°C, 6 godz.	A: 193 G: 111, 82
RFLP-4	-18803 A>G	„7” + „G”	„PCR-2”	<i>Bsp143I</i> (Fermentas, Wilno, Litwa)	37°C, cała noc	A: 299, 64, 26 G: 325, 64
RFLP-5	-18674/- 18675 delAA	„7” + „G”	„PCR-2”	<i>Hpy188I</i> (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)	37°C, cała noc	I*: 326, 63 D*: 230, 94, 63
RFLP-6	-18632 A>T	„7” + „K”	„PCR-1”	<i>Hsp92II</i> (Promega, Madison, WI, USA)	37°C, cała noc	A: 158, 44, 16 T: 174, 44
RFLP-7	-18583 T>A	„7” + „G”	„PCR-2”	<i>TruII</i> (Fermentas, Wilno, Litwa)	65°C, 6 godz.	T: 216, 140, 33 A: 356, 33
RFLP-8	-18483 A>C	„11” + „J”	„PCR-1”	<i>XceI</i> (Fermentas, Wilno, Litwa)	37°C, cała noc	A: 119, 100 C: 219

\*"I" oznacza obecność sekwencji AA w *loci* -18674/-18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji

Wszystkie reakcje przeprowadzono z użyciem 2U odpowiedniej endonukleazy i buforu zalecanego przez jej producenta. W każdym przypadku trawieniu w objętości całkowitej 10  $\mu$ l poddawano 5  $\mu$ l produktu odpowiedniej reakcji PCR, z wyjątkiem RFLP-1, gdzie objętości te wynosiły odpowiednio 15  $\mu$ l i 10  $\mu$ l.

### 3.2.1.6 Technika polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA (SSCP)

Wszystkie doświadczenia metodą polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA (SSCP) wykonano w systemie DNA Pointer System (Kucharczyk TE, Warsaw, Poland). Istotę metody SSCP przedstawiono na Rycinie 5.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w żelu polikarylamidowym o składzie:

10 ml 40% akrylamidu ACRYL/BIS 29:1 (Amresco, Solon, OH, USA)

2 ml glicerolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2 ml buforu TBE 10x

20  $\mu$ l TEMED-u (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden)

200  $\mu$ l 10% APS-u\* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)\*\*

do 40 ml wody podwójnie destylowanej

\*nadsiarczan amonu

\*\*świeżo przygotowany

Produkt odpowiedniej amplifikacji denaturowano z zastosowaniem Buforu Denaturującego MSSCP (Kucharczyk TE, Warszawa, Polska). Do 6  $\mu$ l odpowiedniego produktu amplifikacji dodawano 9  $\mu$ l Denaturanta A po czym całość denaturowano przez 5 min w temperaturze 65°C. Następnie

próbkę umieszczano niezwłocznie w łaźni lodowej i do całości dodawano 3  $\mu$ l Denaturanta B. Tak przygotowane próbki nakładano natychmiast na żel. Rozdział elektroforetyczny odbywał się w trzech zakresach temperatur (30°C, 20°C i 10°C) w następującym schemacie:

1. 0→30°C, 5 min
2. 30°C, 30 min
3. 30→20°C, 5 min
4. 20°C, 30 min
5. 20→10°C, 5 min
6. 10°C, 45–195 min (proporcjonalnie do długości amplitonu)

Żelu wybarwiano z zastosowaniem zestawu Silver Stain (Kucharczyk TE, Warszawa, Polska). Bezpośrednio po elektroforezie żel umieszczano na ok. 5–10 min w 150 ml 10% roztworu alkoholu etylowego, a następnie dwukrotnie inkubowano przez 3 min w 40 ml 5% wodnego roztworu kondensatu utrwalacza. Kolejny krok obejmował 10 min inkubacji w 40 ml świeżo przygotowanego 1% wodnego roztworu  $\text{Ag}^+$  kondensatu, po czym żel trzykrotnie płukano przez 10 sek. w objętości ok. 200 ml wody podwójnie destylowanej. Następnie dodawano 3–5-krotnie po 100 ml świeżo przygotowanego wodnego roztworu wywołującego (zawierającego w 500 ml: 40 ml odczynnika A oraz 88  $\mu$ l odczynnika B). Po otrzymaniu odpowiedniego obrazu reakcję zatrzymywano dodając 100 ml 10% kwasu octowego. Żel trzykrotnie płukano w 200 ml wody podwójnie destylowanej (15 sek., 10 min, 10 min), po czym umieszczano na 24 godz. w celu wysuszenia w folii zestawu Dryout (Kucharczyk TE, Warszawa, Polska). Analizy porównawczej poszczególnych ścieżek rozdziału na żelu dokonywano na negatoskopie. Układy techniki polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA (SSCP) wykorzystane w niniejszym badaniu przedstawiono w Tabeli 5.



**Tabela 5.** Układy techniki polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA (SSCP) wykorzystane w niniejszym badaniu.

Badany region genu	Zastosowane startery	Warunki amplifikacji	Długość ampliconu	Ilość badanych osób
SSCP-1 Promotor dystalny	„9” + „I”	„PCR-1”	245	96
SSCP-2 Ekson 1A	„7” + „G”	„PCR-2”	389 (387*)	96
SSCP-3 Ekson 2A	„8” + „H”	„PCR-1”	193	96
SSCP-4 Promotor proksymalny	„1” + „A”	„PCR-2”	390	24
SSCP-5 Ekson 1	„2” + „B”	„PCR-1”	194	96
SSCP-6 Ekson 2	„3” + „C”	„PCR-1”	152	96
SSCP-7 Ekson 3	„4” + „D”	„PCR-2”	381	96
SSCP-8 Ekson 4	„5” + „E”	„PCR-2”	385	96
SSCP-9 Ekson 5	„6” + „F”	„PCR-2”	316	96

\*jeśli obecna jest delecja w *loci* –18674/–18675 delAA

### 3.2.1.7 Sekwencjonowanie pośrednie

#### 3.2.1.7.1 Klonowanie

Przeznaczony do sekwencjonowania fragment genu *FCERIA* amplifikowano drogą odpowiedniej reakcji PCR (Rozdziały 3.2.1.3, 3.2.1.4, 3.2.1.6). Uzyskane w ten sposób fragmenty DNA wprowadzano do wektora plazmidowego (ligacja) przy użyciu zestawu TOPO TA-Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Rycina 6). Skład mieszaniny reakcyjnej obejmował:

3 µl produktu PCR

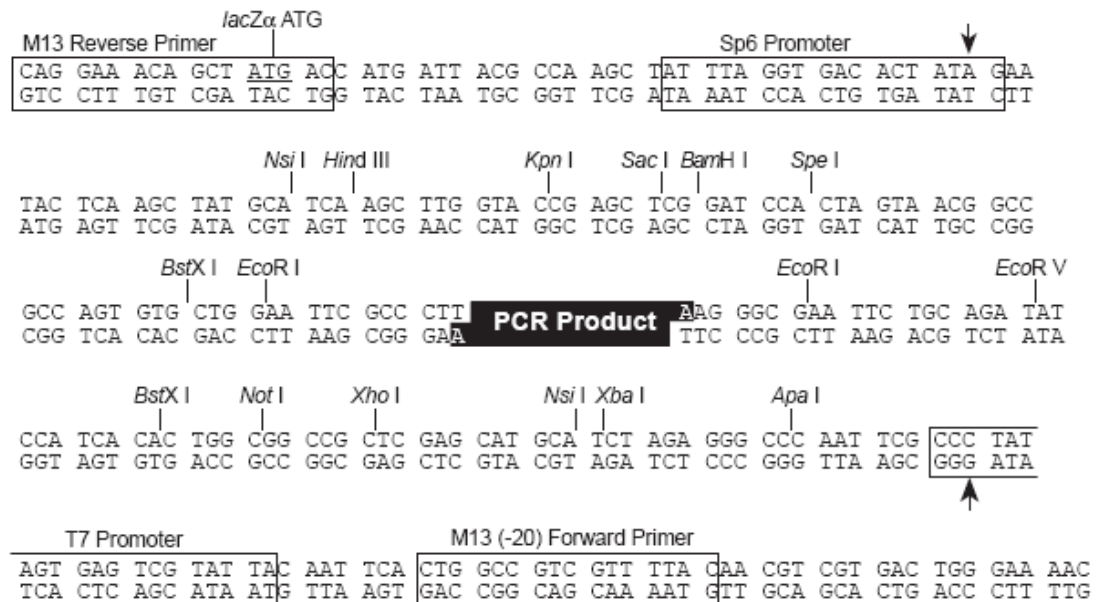
0,2 M NaCl

0,01 M MgCl<sub>2</sub>

10 ng wektora pCRII-TOPO

do 6 µl wody podwójnie destylowanej

Uzyskaną mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Po rozmrożeniu na lodzie 50 µl kompetentnych bakterii *E. coli*, dodawano do nich objętość 2 µl produktu ligacji i tak otrzymaną mieszaninę pozostawiono na lodzie na dalsze 30 min. Próbkę umieszczano następnie na 30 sek. w łaźni wodnej o temperaturze 42°C, po czym znowu schładzano na lodzie. Zawieszono w 250 µl medium S.O.C. i pozostawiono na 60 min w wytrząsarce w temperaturze 37°C.

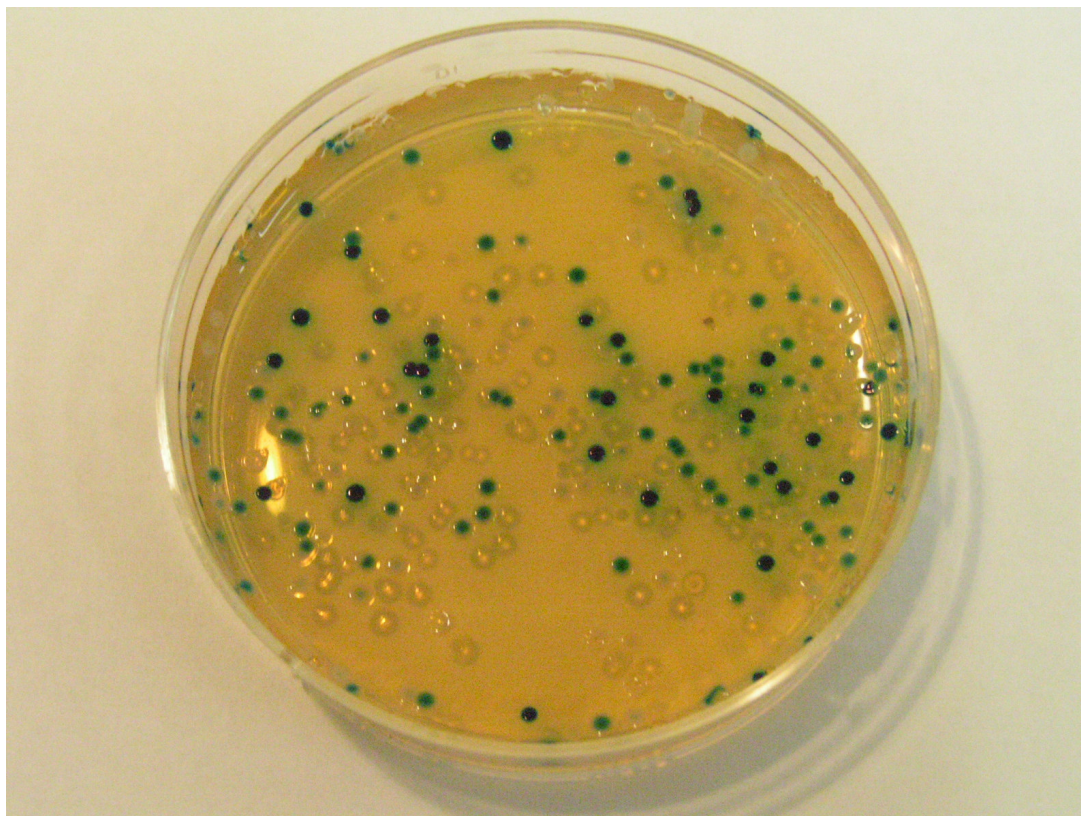


**Rycina 6.** Fragmenty flankujące plazmidu stosowanego w niniejszym badaniu (z materiałów dostarczanych przez producenta).

Dzień wcześniej przygotowano podłoże do hodowli bakterii *E. coli* rozpuszczając tabletki LB Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w wodzie podwójnie destylowanej (1 tabl./50 ml wody). Otrzymany roztwór



poddawano autoklawowaniu, a po schłodzeniu dodawano do niego kanamycynę (10 mg/ml), tak aby jej stężenie końcowe wynosiło 50 µg/ml. Tak przygotowaną mieszaninę wylewano na szalki Petriego i pozostawiono do zastygnięcia. W dniu transfekcji, zachowując warunki jałowe (komora laminarna), rozprowadzano na powierzchni podłoża 20 µl substratu dla β-galaktozydazy (X-gal, 40 mg/ml) oraz 5 µl analogu laktozy (IPTG). Szalki pozostawiono do wyschnięcia. Na tak przygotowanym podłożu rozprowadzano 150 µl medium S.O.C. z zawieszonymi w nim bakteriami, po czym inkubowano przez całą noc w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu na powierzchni podłoża obserwowano obecność białych lub niebieskich kolonii bakteryjnych (Rycina 7). Te pierwsze odpowiadały klonom bakterii zawierającym plazmid z inkorporowanym właściwym produktem PCR (bardzo rzadko z nieswoistym produktem tejże reakcji), natomiast te drugie odpowiadały bakteriom zawierającym plazmidy bez żadnego insertu. Obecność odpowiedniego fragmentu plazmidu zawierającego insert potwierdzano w wybranych koloniach bakteryjnych reakcją PCR („PCR-3”) z zastosowaniem zewnętrznych starterów plazmidowych [„M13 Forward” i „M13 (-20) Reverse”]. Obecność odpowiedniego insertu potwierdzano właściwą dla danego insertu metodą PCR (Rozdziały 3.2.1.3, 3.2.1.4, 3.2.1.6). Odmienność tych reakcji PCR od omówionych w Rozdziale 3.2.1.4 polegała na tym, że matrycę stanowiło nie genomowe DNA, ale plazmidy z wklonowanymi insertami obecne w niewielkiej ilości bakterii przeniesionych do mieszaniny reakcyjnej PCR z wybranej, oznakowanej kolonii za pomocą jałowego, drewnianego patyczka. Wyniki obu typów PCR odczytano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (odczynnik – Rozdział 3.2.1.4).



**Rycina 7.** Hodowla bakteryjna zawierająca: kolonie białe zawierają plazmidy z wklonowanym insertem, natomiast kolonie niebieskie – bez wklonowanego insertu.

Tak wyselekcjonowane, wybrane kolonie przenoszono do próbek zawierających po 3 ml roztworu medium płynnego przygotowanego wcześniej poprzez rozpuszczenie tabletek LB BROTH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w wodzie destylowanej (1 tabl./50 ml wody) i dodanie kanamycyny (10 mg/ml) do stężenia końcowego 50  $\mu$ g/ml. Próbkę inkubowano przez całą noc w wytrząsarce w temperaturze 37°C.

DNA plazmidowe izolowano z bakterii za pomocą zestawu do izolacji Plasmid Mini (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). W tym celu osad z 3 ml hodowli zawieszano w 200  $\mu$ l roztworu L1. Następnie dodawano 200  $\mu$ l roztworu L2, delikatnie mieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 3 min, po upływie których dodawano 400  $\mu$ l roztworu

zobojętniającego GL3 i ponownie delikatnie mieszano, po czym odwirowywano (15 000 RPM, 10 min). Nadsącz przenoszono do kolumny, którą umieszczono w nowej probówce i odwirowywano (15 000 RPM, 1 min). Następnie kolumnę umieszczano w próbówce, dodawano 500  $\mu$ l roztworu W i odwirowywano (15 000 RPM, 1 min). Kolumnę ponownie przenoszono do próbówki, dodawano 700  $\mu$ l roztworu A1 i odwirowywano (15 000 RPM, 2 min). Kolumnę osuszano, umieszczano w nowej probówce, dodawano 60  $\mu$ l wody podwójnie destylowanej i pozostawiono na 3 min w temperaturze pokojowej, po czym odwirowywano (12 000 RPM, 1 min). Tak oczyszczone plazmidowe DNA przechowywano w temperaturze 4°C. Obecność właściwego plazmidu potwierdzano w rozdziale na 1% żelu agarozowym produktu trawienia oczyszczonego DNA plazmidowego restryktazą *SacI* (Fermentas, Wilno, Litwa) w temperaturze 37°C przez całą noc. Elektroforezę przeprowadzano z zastosowaniem odczynników opisanych w Rozdziale 3.2.1.4 [z wyjątkiem markera długości – Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker (Fermentas, Wilno, Litwa)]. Stężenie oczyszczonego plazmidu mierzono spektrofotometrycznie (Gene Quant II, Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) przy absorbancji wynoszącej 260 nm.

#### 3.2.1.7.2 Sekwencjonowanie

Wszystkie reakcje sekwencjonowania wykonywano przy użyciu zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); we wszystkich stosowano zewnętrzne w stosunku do insertu startery plazmidowe „M13 Forward” lub „M13 (-20) Reverse” z zestawu TOPO TA-Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Rycina 6). Dla każdego klonu plazmidu (insertu) wykonywano osobne reakcje z każdym z tych starterów.

Skład 20 µl mieszaniny reakcyjnej był następujący:

8 µl Terminator Ready Reaction Mix

0,5 µg plazmidu

3,2 pmol startera „M13 Forward” lub „M13 (-20) Reverse”

do 20 µl wody podwójnie destylowanej

Reakcje przeprowadzano w termocyklerze GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) w następującym cyklu:

1. wstępna denaturacja 96°C, 1 min
2. denaturacja 96°C, 10 sek.
3. hybrydyzacja 54°C, 5 sek.
4. elongacja 65°C, 4 min
5. zatrzymanie reakcji 4°C.

Etapy 2–4 powtarzały się w 25 cyklach.

Do 20 µl produktu powyższej reakcji dodawano 5 µl 125 mM EDTA i 55 µl 100% alkoholu etylowego, po czym inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Następnie próbki odwirowywano (15 000 RPM, 15 min, 4°C), po czym usuwano nadsącz, a osad zalewano 60 µl 70% alkoholu etylowego. Próbki ponownie odwirowywano (15 000 RPM, 1 min, 4°C), a następnie usuwano nadsącz. Osad osuszano poprzez pozostawienie otwartych probówek w temperaturze 4°C przez 30 min. Pozostały na dnie probówki osad rozpuszczano w 5 µl buforu ładującego zawierającego w stosunku 5:1:

formamid dejonizowany

dekstran niebieski (50mg/ml) i EDTA (25mM, pH = 8,0).

Całość denaturowano przez 5 min w temperaturze 92°C. Rozdział tak przygotowanych próbek przeprowadzano z zastosowaniem sekwenatora ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) na żelu poliakrylamidowym o składzie:

4 ml 40% akrylamidu ACRYL/BIS 29:1 (Amresco, Solon, OH, USA)  
14,4 g mocznika  
5 ml buforu TBE 10 x  
20 µl TEMED-u (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden)  
200 µl 10% APS-u (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)\*  
do 40 ml wody podwójnie destylowanej.

\*świeżo przygotowany

### 3.2.1.7.3 Potwierdzanie obecności polimorfizmu metodą RFLP

W czasie klonowania bakteryjnego produktów PCR niejednokrotnie dochodzi do powstawania dodatkowych, niepożądanych mutacji wprowadzanych przez polimerzę *Taq* lub systemy bakteryjne. Istnienie polimorfizmu wykrytego w sekwencjonowaniu pośrednim potwierdzano wykonaniem odpowiedniej techniką RFLP (Tabela 4) na macierzystym DNA genomowym sekwencjonowanych próbek. W przypadku braku zgodności wyników RFLP i sekwencjonowania wykonywano porównawcze RFLP ampliconów otrzymanych odpowiednią metodą PCR (Tabela 4) na matrycy próbki DNA genomowego i pochodzącego od niej insertu plazmidowego. Obecność zmienności jedynie w produkcie PCR otrzymanym na bazie insertu plazmidowego potwierdzała, że mutacja wykryta sekwencjonowaniem jest wynikiem błędu klonowania, a nie odpowiada istnieniu mutacji w DNA genomowym.

### 3.2.1.8 Genotypowanie

Wykryte polimorfizmy genotypowano z zastosowaniem techniki RFLP tak jak to przedstawiono w Rozdziale 3.2.1.5 i Tabeli 4.

### 3.2.1.9 Lokalizacja genu

Wszystkie primery, amplikony i polimorfizmy zlokalizowano względem sekwencji referencyjnej „*Homo sapiens* chromosome 1 genomic contig” pobranej ze strony:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=NT\\_079484](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=NT_079484).

### 3.2.2 Badania autoimmunologiczne

#### 3.2.2.1 Test skórny surowicy autologicznej (ASST)

Test skórny surowicy autologicznej wykonano w podgrupie 88 chorych na astmę lub pokrzywkę. Krew żylną pobierano do jałowych, szklanych probówek bez dodatku akceleratora wykrzepiania i pozostawiano na 30 minut pozwalając na utworzenie się skrzepu. Surowicę oddzielano poprzez odwirowanie (500 xg, 15 min). Następnie niezwłocznie wykorzystywano 0,05 ml jałowej, świeżej surowicy autologicznej do wykonania próby śródskórnej. Surowicę wstrzykiwano w dłoniową część przedramienia. Jako ujemną kontrolę wykonywano śródskórne wstrzyknięcie 0,9% soli fizjologicznej, a jako kontrolę dodatnią test punktowy z histaminą. Odczytów dokonywano po 15, 30 i 60 min. Za wynik dodatni przyjmowano obecność bąbla o średnicy większej o co najmniej 1,5 mm od średnicy bąbla w miejscu śródskórnego podania kontrolnego roztworu soli fizjologicznej.

### 3.2.2.2 Test uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych (BHR-Test)

W celu klasyfikacji autoprzeciwciał przeciwko FcεRI i(lub) IgE wykonano test uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych u 97 chorych na pokrzywkę lub astmę. Granulocyty zasadochłonne pochodzące od zdrowego dawcy inkubowano z próbkami surowicy pochodzącą od osób badanych w trzech rozcieńczeniach: 50%, 25% i 12,5%. Uwalnianie histaminy (BHR) wyrażano jako procent całkowitej zawartości histaminy w badanej próbce. Wynik testu uważano za dodatni jeżeli BHR przekraczała 12%.

Testy ASST i BHR-T zostały wykonane poza laboratorium, w ośrodku dysponującym dużym doświadczeniem w ich wykonywaniu (Laboratory of Medical Allergology, Allergy Clinic, National University Hospital, Kopenhaga, Dania) [107,143].

### 3.2.3 Badanie w kierunku nadwrażliwości na aspirynę

U chorych z najmniejszymi podejrzeniami nadwrażliwości na aspirynę wykonywano badanie w kierunku nadwrażliwości na kwas acetylosalicylowy. Doustną próbę prowokacyjną z aspiryną przeprowadzano w ciągu dwóch kolejnych dni. W pierwszym dniu podawano co 1 godzinę po jednej z 3 kapsułek zawierających placebo (laktozę). Właściwą próbę prowokacyjną wykonywano w drugim dniu podając co 1 godzinę następujące dawki kwasu acetylosalicylowego: 71 mg, 117 mg i 312 mg (dawka kumulacyjna 500 mg/dobę). FEV<sub>1</sub> i odczyny skórne badano przed rozpoczęciem próby oraz co 15 minut aż do upływu 6 godzin od podania ostatniej dawki placebo lub kwasu acetylosalicylowego.

Wynik próby uważano za dodatni w przypadku zmniejszenia się FEV<sub>1</sub> o co najmniej 20% w porównaniu z wartością wyjściową i(lub) wystąpienia nasilonych objawów pozaoskrzelowych (głównie: wodnisty wyciek z nosa, blokada nosa, zaczerwienienie skóry twarzy i górnej części klatki piersiowej, obrzęk powiek, nudności i skurcze żołądka). Protokół przeprowadzenia próby powstał w oparciu o uprzednio publikowane [133,148,149].

### 3.2.4 Inne oznaczenia

#### 3.2.4.1 Oznaczanie całkowitych stężeń IgE w surowicy

W grupie chorych i w kontrolnej próbie populacyjnej oznaczono całkowite stężenie IgE w surowicy z zastosowaniem metody immunonefelometrii lateksowej (Dade Behring, Marburg, Niemcy).

#### 3.2.4.2 Inne badania laboratoryjne

W grupie chorych oznaczono w krwi pobranej na EDTA eozynofilię bezwzględną z zastosowaniem konwencjonalnej metody laboratoryjnej.

### 3.3 Analiza statystyczna

Wiek przedstawiono jako średnią  $\pm$  standardowy błąd średniej (SEM), natomiast wartości całkowite stężenia IgE w surowicy i eozynofilii bezwzględnej jako medianę  $\pm$  rozstęp międzykwartyłowy (IQR), z wyjątkiem stężeń IgE na Rycinie 27, podanych jako średnia  $\pm$  SEM wartości po transformacji logarytmicznej. Porównania statystyczne wykonywano z zastosowaniem odpowiednio testu t-Studenta dla prób



niezależnych, testu  $\chi^2$  lub dokładnego testu Fishera. Rozkład całkowitego stężenie IgE w surowicy i eozynofilii bezwzględnej nie był rozkładem normalnym, dlatego przed wykonaniem porównań statystycznych dane te poddano transformacji logarytmicznej.

Faktyczne rozkłady genotypów wszystkich badanych polimorfizmów porównano z obliczonymi na podstawie reguły Hardy'ego-Weinberga. Do obliczenia prawdopodobieństwa nierównowagi sprzężeń 4 częstych polimorfizmów genu *FCERIA*, odtworzenia częstości haplotypowych, obliczenia wartości  $F_{ST}$  (odzwierciedlającej sparowany dystans genetyczny) oraz wykonania testu zróżnicowania populacji (test nieprzypadkowego rozkładu haplotypów w próbach populacyjnych) zastosowano program Arlequin wersja 3.01 dostępny na stronie internetowej <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/> [150]. Do oceny zależności haplotypów 4 częstych polimorfizmów *FCERIA* o nieznannej fazie gametycznej i całkowitego stężenia IgE w surowicy zastosowano program Qtphase, pozwalający na analizę cech ilościowych względem genotypów i(lub) haplotypów u osób niespokrewnionych. Program ten umożliwia wykonanie testów kondycjonujących względem wybranego markera genetycznego, zarówno jako haplotypu, jak również genotypu, jeśli marker ten wykazuje zależność z cechą jakościową lub pozostaje w nierównowadze sprzężeń z badanymi *loci*. Obliczenia te wykonano niezależnie w grupie chorych i populacyjnej grupie kontrolnej. Program stanowi część pakietu Unphased dostępnego na stronie <http://portal.litbio.org/Registered/Option/unphased.html> [151].

## 4 Wyniki

### 4.1 Poszukiwanie zmienności genu *FCERIA*

#### 4.1.1 Promotor proksymalny oraz eksony 1–5 („stare” regiony genu)

##### 4.1.1.1 Promotor proksymalny

Badanie techniką SSCP („SSCP-4”, region promotora proksymalnego) z następnym sekwencjonowaniem pośrednim (i RFLP) potwierdziło obecność dwóch znanych wcześniej polimorfizmów zlokalizowanych w tym regionie genu (–335 C>T oraz –66 T>C) [64,65]. Decydując się na ujednolicenie mianownictwa tych polimorfizmów, zgodnie z międzynarodowymi zaleceniami, ponumerowano je względem miejsca inicjacji translacji. W związku z tym polimorfizm –66 T>C [65] określono jako –95 T>C, natomiast polimorfizm –335 C>T [64] jako –344 C>T. Rycina 8 przedstawia fragment sekwencji genu *FCERIA* z zaznaczeniem obu miejsc polimorficznych.

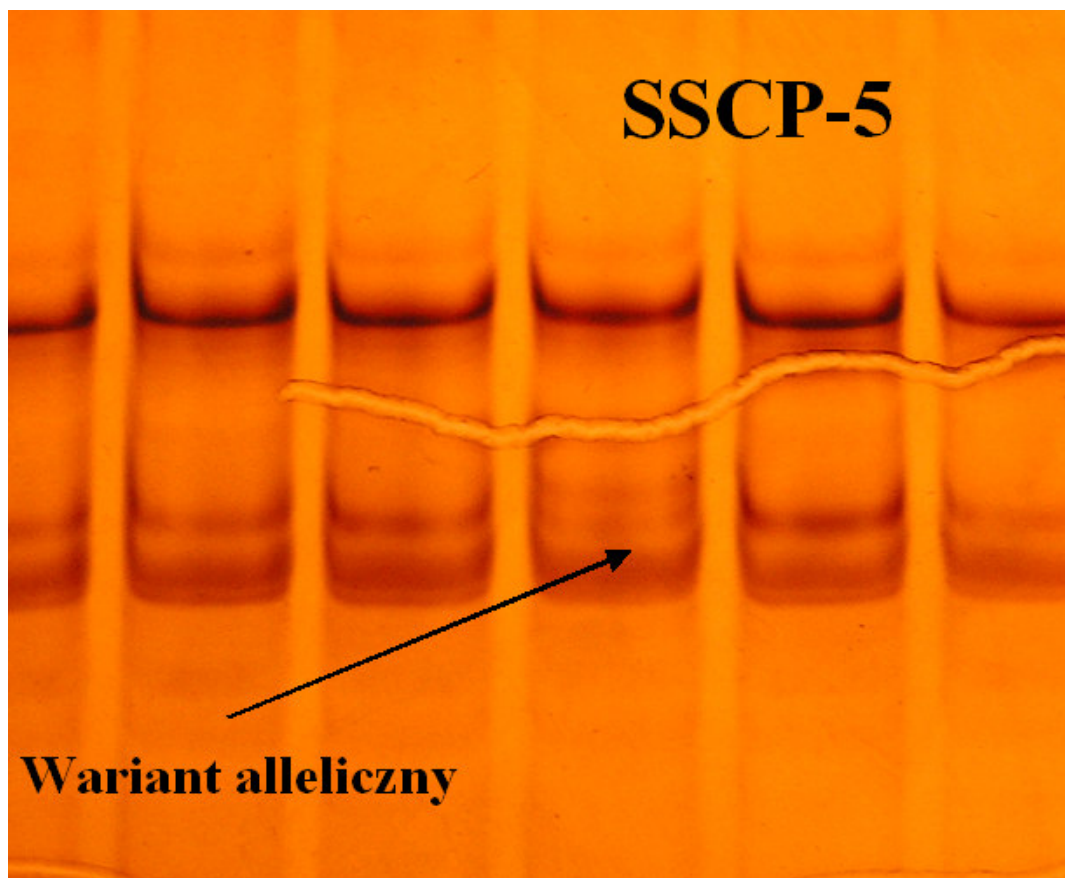
```
5721541 tataggatta ttgtgaaaaa taaatgaaat atcagattta tttaggataa cacctggcat
5721601 atgtttggta ttcagtaatt agttgctgct gttttattct gcXctccctt gcatcccact
5721661 tttctaagtt gtaactaaa tagttgtaca cagattgaca gattaagaaa ggcttgtgat
5721721 tgtgctagac ctatgcctct ctctcaccag attccagggtg tatatgtgga ggtgggatag
5721781 ggagtggagt aagtgggtaa atattaaatt gccagttgg gcaccatcct gaatattatc
5721841 tctaaagaaa gaagcaaac caggcacagc tgatgggtta accagatatg aYacagaaaa
5721901 catttccttc tgctttttgg ttttaagcct atatttgaag ccttagatct ctccagcaca
5721961 gtaagcacca ggagtccatg aagaagZctcctgccat ggaatcccct actctactgt
```

**Rycina 8.** Fragment genu *FCERIA* zawierający region promotora proksymalnego i polimorfizmy zlokalizowane na jego obszarze. Na **niebiesko** zaznaczono polimorfizm –344 C>T („X”), natomiast na **czerwono** polimorfizm –95 T>C („Y”). Na **zielono** – miejsce inicjacji translacji.

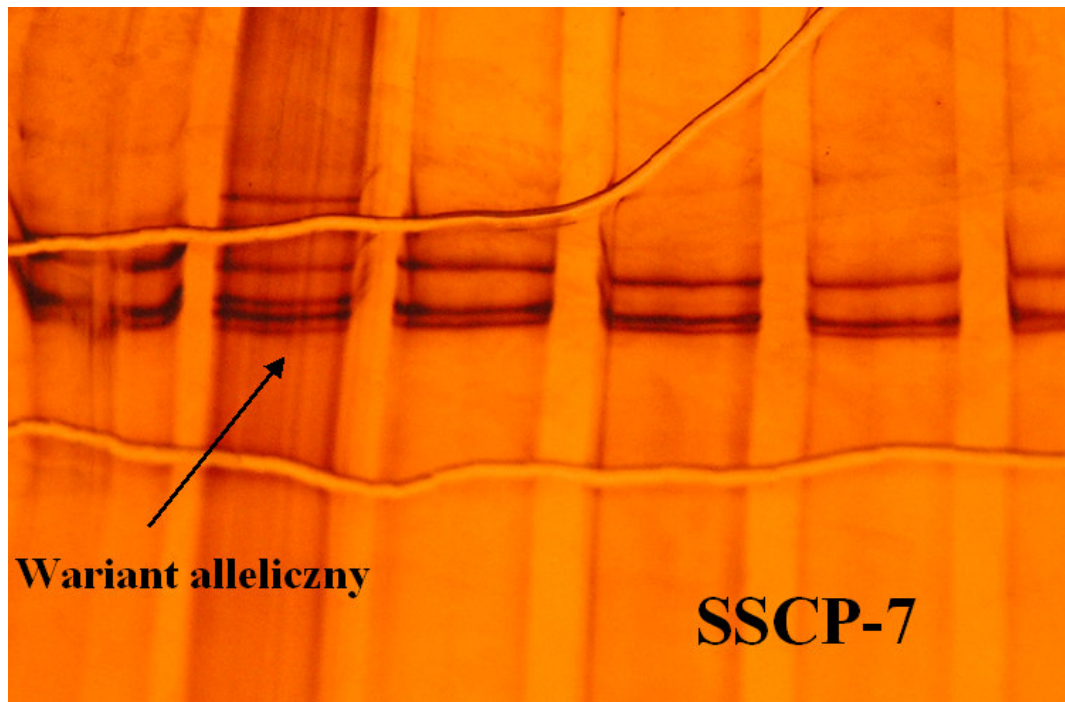
#### 4.1.1.2 Eksony 1–5

W doświadczeniach „SSCP-5” (region ekson 1) oraz „SSCP-7” (ekson 3) wykryto pojedyncze zmienności (1/96) o obrazie rozdziału odpowiadającym heterozygotom (Rycina 9, Rycina 10), jednak ze względu na ich niezwykle rzadkość nie były one dalej badane.

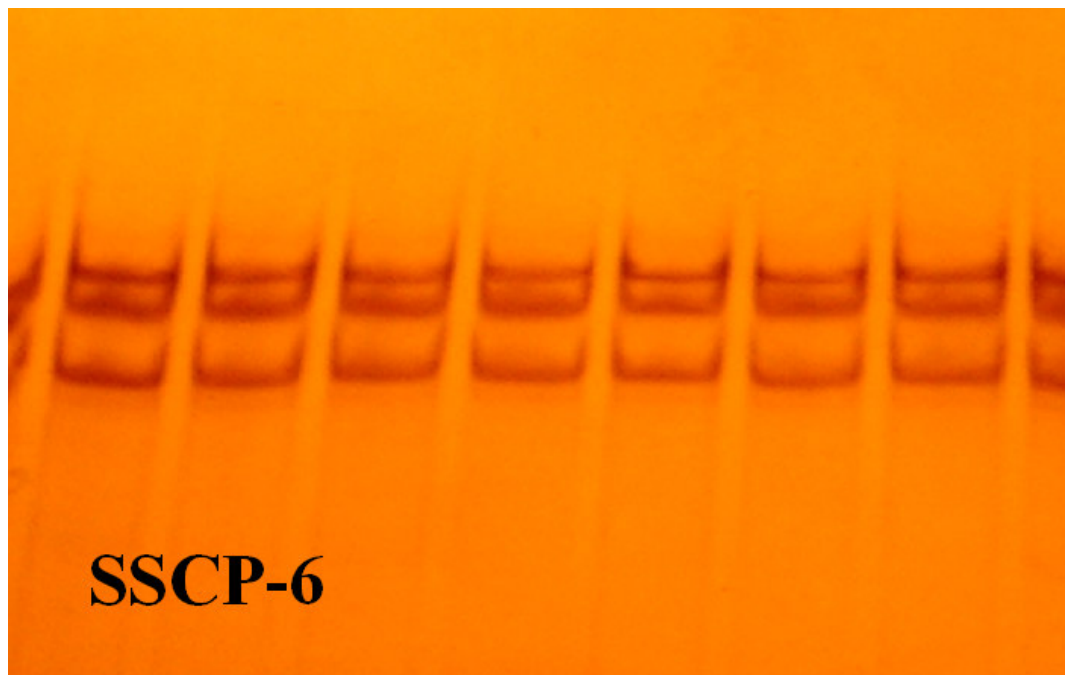
W zakresie eksperymentów „SSCP-6” (ekson 2), „SSCP-8” (ekson 4) i „SSCP-9” (region eksonu 5) nie stwierdzono obecności żadnych zmienności. Na Rycinie 11 pokazano przykładowy wynik doświadczenia „SSCP-6”.



**Rycina 9.** Pojedyncza zmienność znaleziona w doświadczeniu „SSCP-5”.



**Rycina 10.** Pojedyncza zmienność znaleziona w doświadczeniu „SSCP-7”.

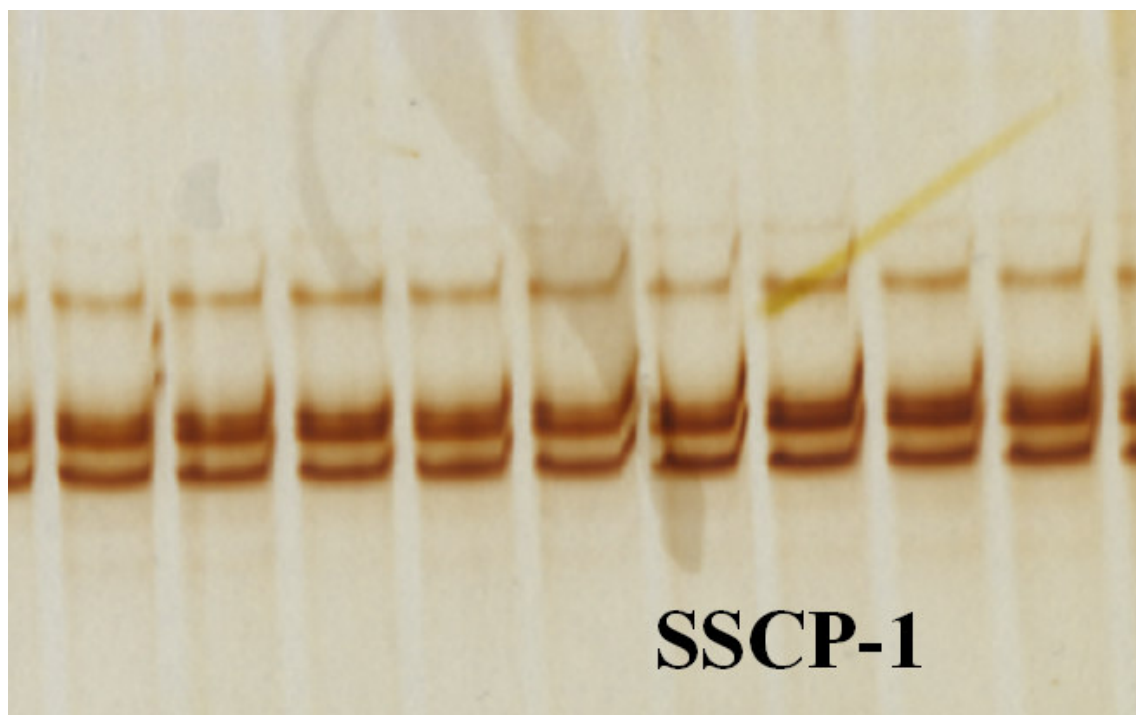


**Rycina 11.** Doświadczenie „SSCP-6” – brak zmienności.

#### 4.1.2 Promotor dystalny oraz eksony 1A i 2A („nowe” regiony genu)

##### 4.1.2.1 Promotor dystalny

Doświadczenie „SSCP-1” nie wykazało obecności zmienności w zakresie badanego regionu promotora dystalnego. Na Rycinie 12 pokazano monomorficzny obraz eksperymentu „SSCP-1”.

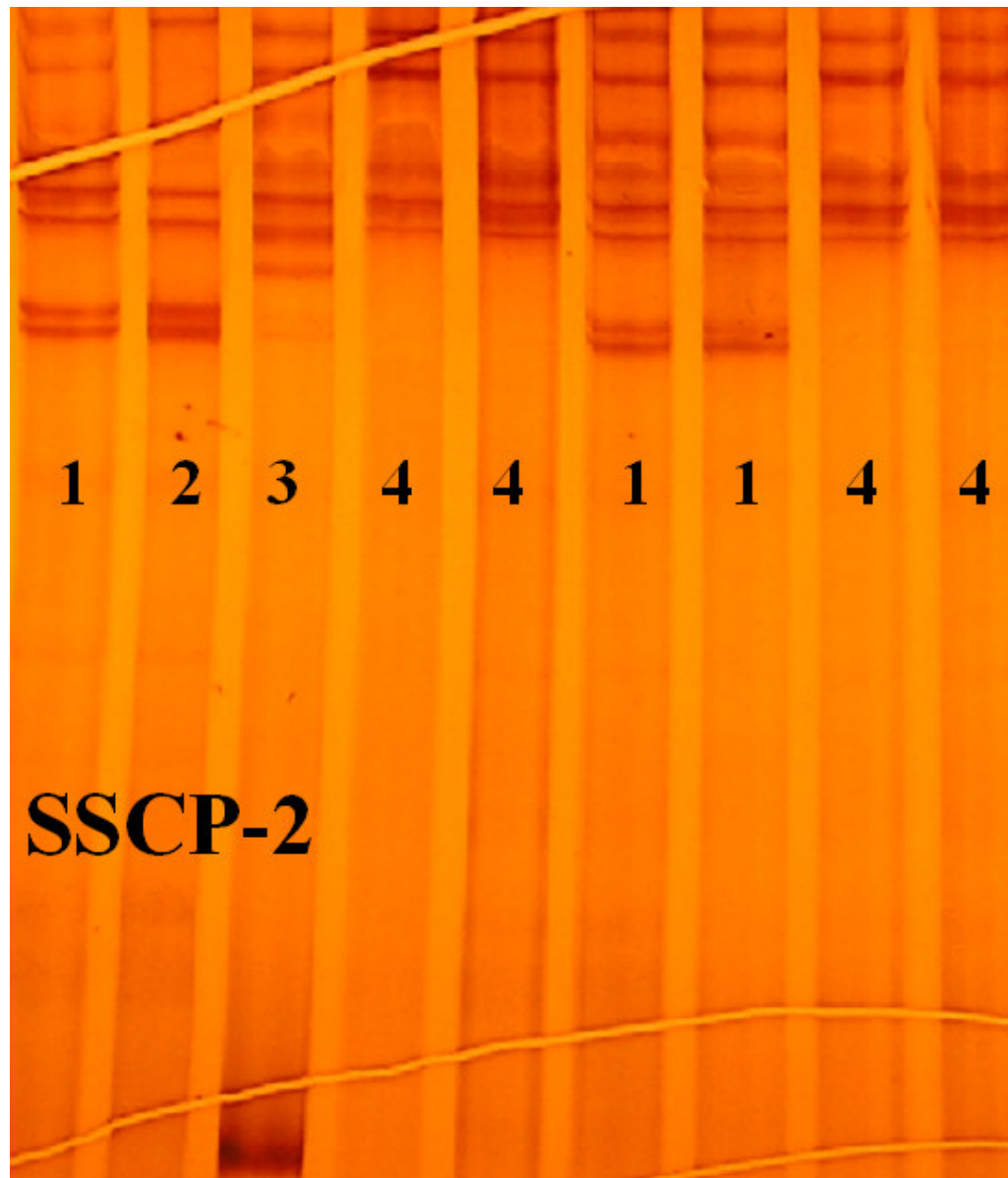


**Rycina 12.** Doświadczenie „SSCP-1” – nie uwidoczniono obecności zmienności.

##### 4.1.2.2 Ekson 1A

Eksperyment „SSCP-2”, obejmujący region promotora dystalnego dał złożony wynik rozdziału wskazujący na obecność prawdopodobnie dwóch polimorfizmów (obecność >3 różnych obrazów rozdziału). Rycina 13

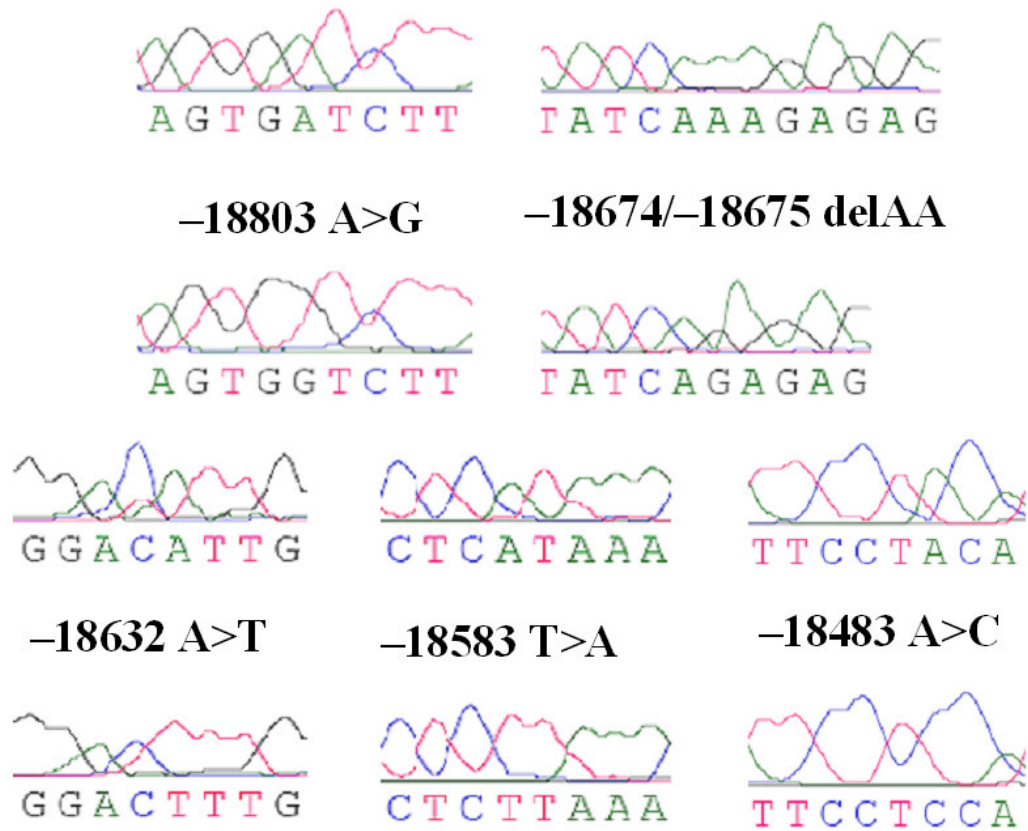
przedstawia przykład takiego rozdziału zawierający 4 różne wzorce elektroforetyczne.



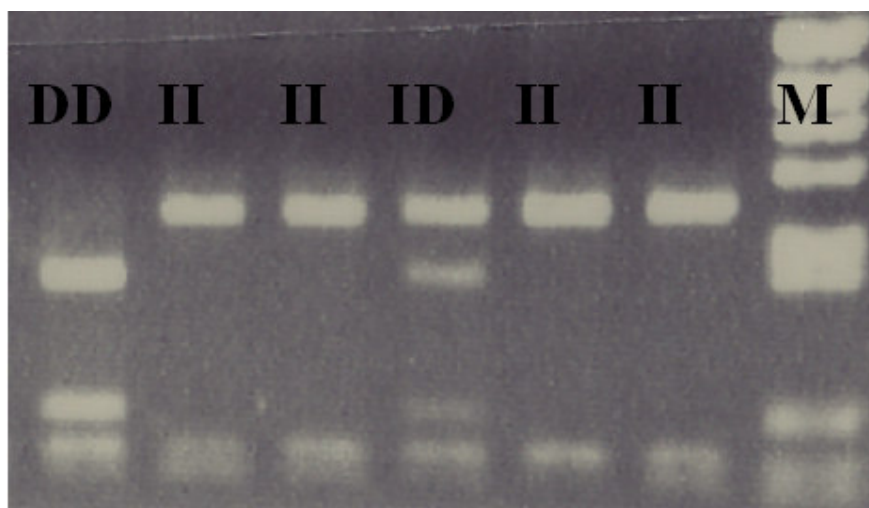
**Rycina 13.** Przykład doświadczenia „SSCP-2” zawierający 4 różne wzorce rozdziału („1”-„4”).

Co ciekawe, sekwencjonowanie pośrednie tego fragmentu wykazało jednak obecność 5 różnych mutacji (Rycina 14).



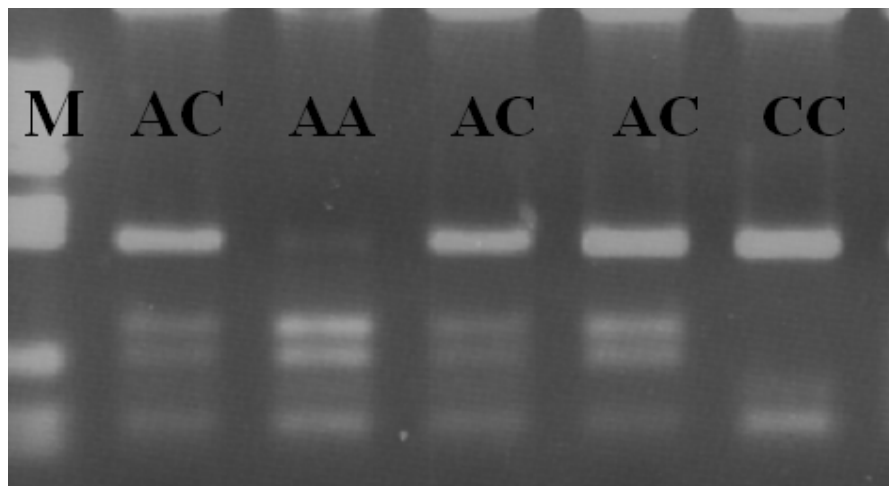


**Rycina 14.** Mutacje znalezione w wyniku sekwencjonowania klonów wybranych w oparciu o eksperyment „SSCP-2”.



**Rycina 15.** Genotypowanie polimorfizmu -18674/-18675 delAA metodą RFLP („RFLP-5”).

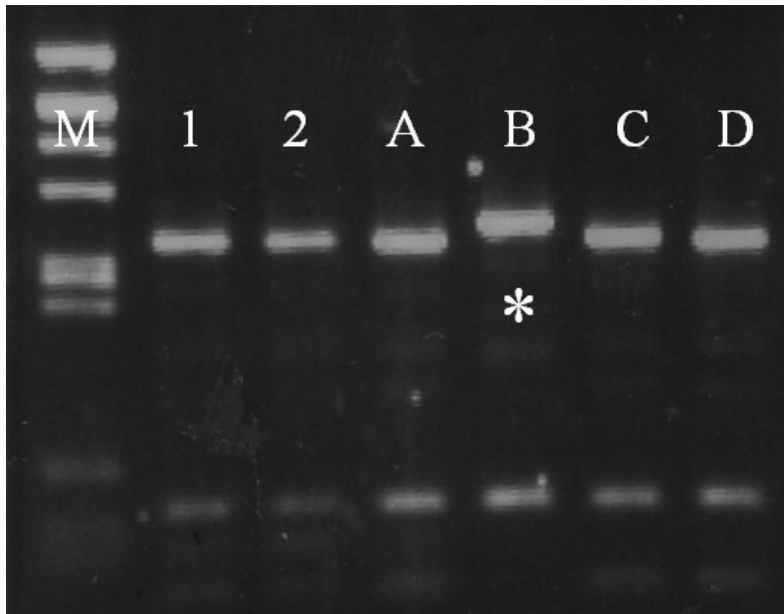
Jak się jednak okazało, jedynie 2 (–18674/–18675 delAA, „RFLP-5”; –18483 A>C, „RFLP-8”) spośród wykrytych 5 mutacji uzyskały potwierdzenie w badaniu RFLP próbek DNA genomowego (Rycina 15, Rycina 16).



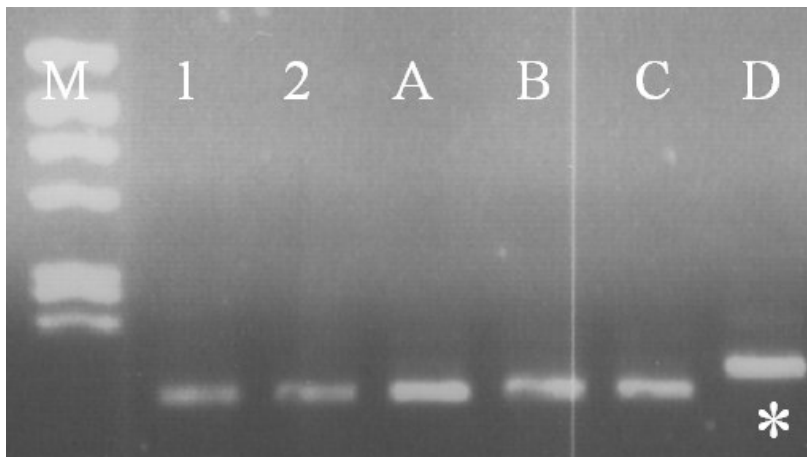
**Rycina 16.** Genotypowanie polimorfizmu –18483 A>C metodą RFLP („RFLP-8”). „M” – marker długości DNA pBR322 DNA/*Alu*I.

W związku z tym, rozważając możliwość powstania pozostałych 3 mutacji (–18803 A>G, –18632 A>T, –18583 T>A) wskutek błędów klonowania, dokonano w ich przypadku porównawczego RFLP produktów amplifikacji na matrycy macierzystych próbek DNA genomowego oraz na matrycy insertów plazmidowych (–18803 A>G, „RFLP-4”; –18632 A>T, „RFLP-6”; –18583 T>A, „RFLP-7”). We wszystkich trzech przypadkach potwierdzono bakteryjne pochodzenie mutacji, ponieważ w każdym z nich technika RFLP potwierdziła istnienie mutacji tylko w jednym z insertów, a wykluczyła jej istnienie w jego macierzystym DNA genomowym (Rycina 17, Rycina 18, Rycina 19).

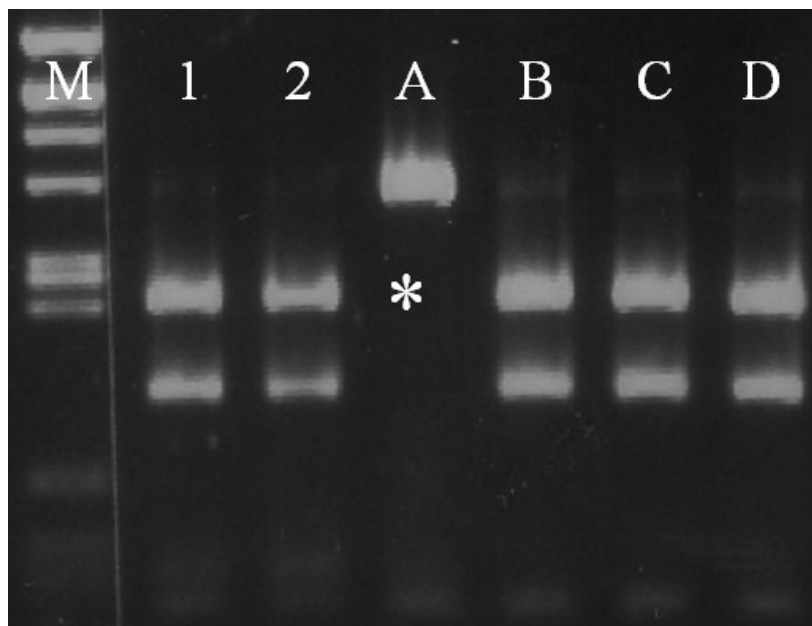




**Rycina 17.** Porównawcze RFLP („RFLP-4”) produktów amplifikacji na matrycy macierzystych próbek DNA genomowego („1” i „2”) oraz na matrycy insertów plazmidowych („A”–„D”). Obecność mutacji –18803 A>G („\*”) wykazano jedynie w insercie plazmidowym, w którym została ona wykryta podczas sekwencjonowania.



**Rycina 18.** Porównawcze RFLP („RFLP-6”) produktów amplifikacji na matrycy macierzystych próbek DNA genomowego („1” i „2”) oraz na matrycy insertów plazmidowych („A”–„D”). Obecność mutacji –18632 A>T („\*”) wykazano jedynie w insercie plazmidowym, w którym została ona wykryta podczas sekwencjonowania.



**Rycina 19.** Porównawcze RFLP („RFLP-7”) produktów amplifikacji na matrycy macierzystych próbek DNA genomowego („1” i „2”) oraz na matrycy insertów plazmidowych („A”–„D”). Obecność mutacji –18583 T>A („\*”) wykazano jedynie w insercie plazmidowym, w którym została ona wykryta podczas sekwencjonowania.

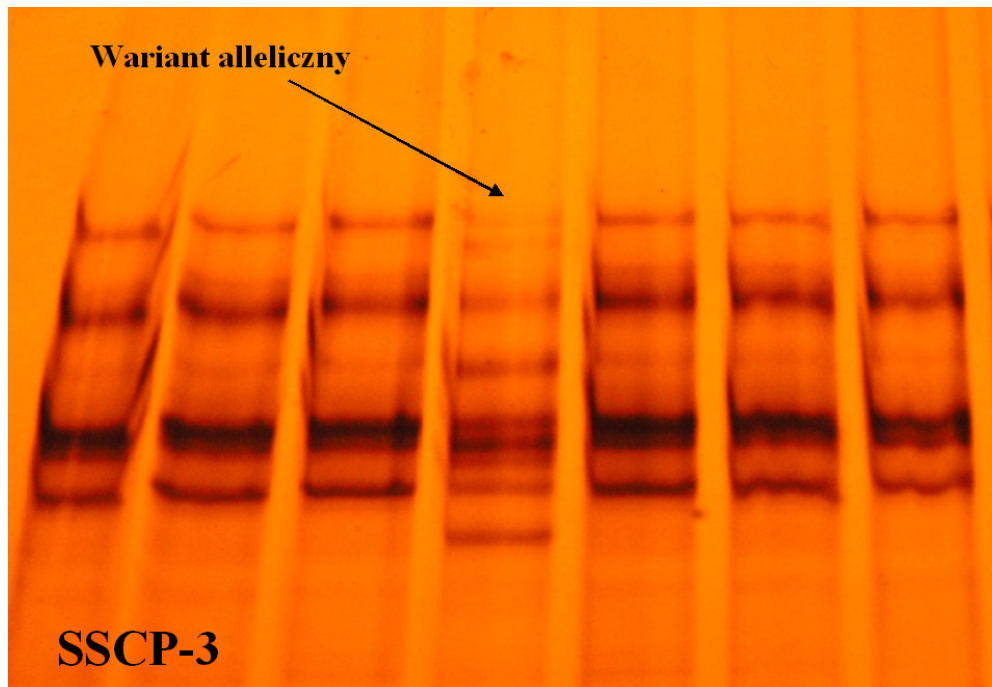
Rycina 20 przedstawia fragment genu *FCERIA* zawierający sekwencję eksonu 1A wraz z dwoma potwierdzonymi miejscami polimorficznymi (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C). Genotypy tych dwóch polimorfizmów otrzymane techniką RFLP (–18674/–18675 delAA, „RFLP-5”; –18483 A>C, „RFLP-8”) z okazały się zgodne z obrazami SSCP („SSCP-2”). Na przykład obrazy „1”–„4” na Rycinie 13 odpowiadały następującym kombinacjom genotypów –18674/–18675 delAA + –18483 A>C: „1” – II + AC, „2” – II + CC, „3” – ID + AC oraz „4” – II + AA (gdzie „I” oznacza obecność sekwencji AA w loci –18674/–18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji).

```

5703121 aaaagcactc gctgcttctg accttggaac taggaaggag aaggaagcac tttccagata
5703181 gtgatcttta aaaggcatga aaggactgag tctactcaga gaaagcaggt gaaaaaacct
5703241 tgtattcaag aggcatttac aacggaagca aaaacacaca aaatgagaaa aatccagttc
5703301 tctctaatat cXXagagagc ctcaaattgt tgctatgttc ctgaggcttg ggacattggc
5703361 tcatttggtc tgagaagtgg cccagggaaa aaaatacagt ctcttaaact gcagatttca
5703421 agagctgtgt atatttattt tcccaagga gaagagaatc cctctgcccc aagtctcctg
5703481 agatcatcct tttgagaatt cctYcatgct actaagaggt aaggaaggta gaacctgaag
5703541 gctggtctca agaatttcat tagaaatgtg ggctcgctgat gaaggagatg ttttcatttg

```

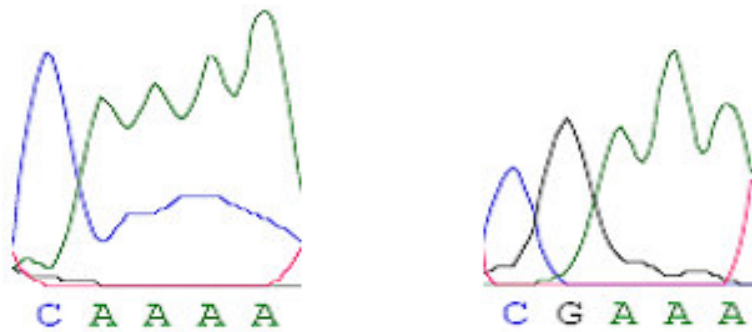
**Rycina 20.** Fragment genu *FCERIA* zawierający sekwencję eksonu 1A (na czerwono) i wykryte w jego obszarze polimorfizmy. Na żółto zaznaczono polimorfizm –18674/–18675 delAA („XX”), natomiast na granatowo polimorfizm –18483 A>C („Y”).



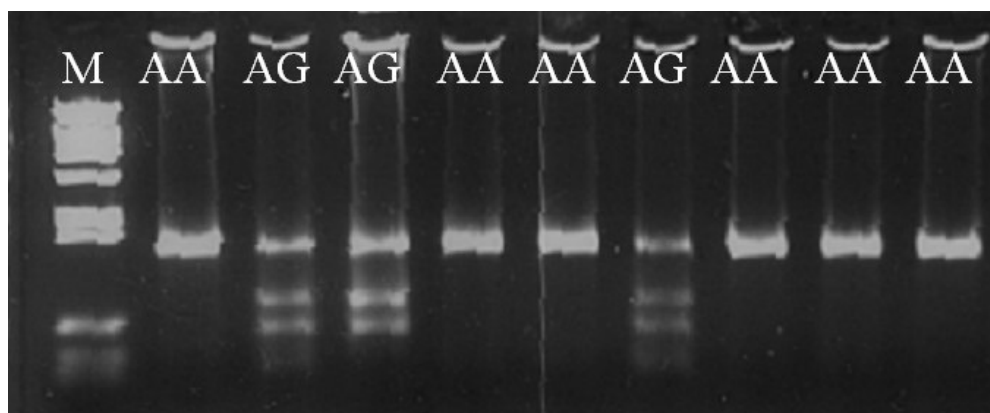
**Rycina 21.** Przykład zmienności obserwowanej w doświadczeniu „SSCP-3”.

#### 4.1.2.3 Ekson 2A

Badanie metodą SSCP („SSCP-3”) przeprowadzone w zakresie regionu eksonu 2A dało obraz odpowiadający najprawdopodobniej obecności jednego, dość rzadkiego polimorfizmu (Rycina 21). Przeprowadzone następnie sekwencjonowanie pośrednie wykazało obecności mutacji – 12663 A>G zlokalizowanej niedaleko końca 5’ eksonu 2A (Rycina 22). RFLP („RFLP-3”) próbek macierzystych DNA genomowego potwierdziło obecność tego polimorfizmu (Rycina 23).



**Rycina 22.** Obraz sekwencjonowania mutacji wykrytej na podstawie eksperymentu „SSCP-3”.



**Rycina 23.** Genotypowanie polimorfizmu –12663 A>G metodą RFLP („RFLP-3”). Na Rycinie 24 pokazano mutację –12663 A>G w kontekście eksonu 2A.

```

5709241 gtctcattgg agttattagg cacaatcaaa tctaattaat tttgatttta taaaattaat
5709301 caatttaatt ttatcttctg ttcXaaattc ttttcagtct ccagcatcct ccacctgtct
5709361 accaccgagc atggggtaag tttatggctc cagtggcttg ttatgtgttg ggaggtaaag
5709421 ggtgatggcc acactactca catcctccc tcttcagat atcagccct tccttgagag

```

**Rycina 24.** Fragment genu *FCERIA* zawierający sekwencję eksonu 2A (na zielono) i wykryty na jego obszarze polimorfizm. Na żółto zaznaczono polimorfizm –12663 A>G („X”).

## 4.2 Genotypowanie

Rozkłady genotypów w przypadku wszystkich badanych polimorfizmów nie odbiegały od obliczonych w oparciu o regułę Hardy’ego-Weinberga na podstawie częstości allelicznych (wszystkie  $P > 0,05$ ).

### 4.2.1 Genotypowanie – polimorfizmy częste (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C)

Rozkłady genotypów i częstości alleliczne były w przypadku każdego z polimorfizmów: –18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C zbliżone w grupie pacjentów z alergią i w populacyjnej grupie kontrolnej (wszystkie  $P > 0,05$ ). Szczegółowe dane (rozkłady genotypów i częstości alleliczne) przedstawiono w Tabeli 6.

### 4.2.2 Genotypowanie – polimorfizm rzadki (–12663 A>G)

Allel rzadszy polimorfizmu –12663 A>G (G) stwierdzono jedynie w formie heterozygotycznej u 3/96 (częstość 0,015) pacjentów z alergią oraz 4/96 (częstość 0,02) osób z kontrolnej grupy populacyjnej ( $P = 1,0$ ).

**Tabela 6.** Rozkład genotypów oraz częstości alleliczne polimorfizmów –18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C.

Polimorfizm	Chorzy na choroby alergiczne ( <i>n</i> = 154)				Populacyjna grupa kontrolna ( <i>n</i> = 154)				<i>P</i>
	Dystrybucja genotypów, <i>n</i> (%)				Dystrybucja genotypów, <i>n</i> (%)				
	Częstość allelu rzadszego				Częstość allelu rzadszego				
–18674/–18675 delAA*	II	ID	DD	D	II	ID	DD	D	0,93
	109 (70,8)	41 (26,6)	4 (2,6)	0,16	107 (69,5)	42 (27,3)	5 (3,2)	0,17	
–18483 A>C	AA	AC	CC	C	AA	AC	CC	C	0,39
	42 (27,3)	76 (49,3)	36 (23,4)	0,48	52 (33,8)	73 (47,4)	29 (18,8)	0,43	
–344 C>T	CC	CT	TT	T	CC	CT	TT	T	0,46
	46 (29,9)	74 (48,0)	34 (22,1)	0,46	56 (36,4)	69 (44,8)	29 (18,8)	0,41	
–95 T>C	TT	TC	CC	C	TT	TC	CC	C	0,77
	83 (53,9)	59 (38,3)	12 (7,8)	0,27	84 (54,6)	55 (35,7)	15 (9,7)	0,28	

\*"I" oznacza obecność sekwencji AA w *loci* –18674/–18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji.

#### 4.2.3 Genotypowanie – analiza haplotypowa 4 częstych polimorfizmów (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C)

W związku z nieznaną fazą gametyczną obliczenie dokładnych mierników nierównowagi sprzężeń ( $D$ ,  $D'$  oraz  $r^2$ ) nie było możliwe. W wykonanym teście prawdopodobieństwa wykazano jednak, iż w obu grupach badanych wszystkie 4 polimorfizmy (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C) pozostawały względem siebie w nierównowadze sprzężeń (sprzężenie istniało pomiędzy dowolną parą z tych 4 polimorfizmów) o dużym prawdopodobieństwa (wszystkie  $P \leq 0,0002$ ) choć o nieznaney wielkości (Tabela 7).

**Tabela 7.** Sprzężenia pomiędzy poszczególnymi polimorfizmami –18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C (grupa pacjentów za alergią/ kontrolna grupa populacyjna).

	–18674/–18675 delAA*	–18483 A>C	–344 C>T	–95 T>C
–18674/–18675 delAA*	x	+/+	+/+	+/+
–18483 A>C	+/+	x	+/+	+/+
–344 C>T	+/+	+/+	x	+/+
–95 T>C	+/+	+/+	+/+	x

+, sprzężenie pomiędzy danymi 2 polimorfizmami przy  $P \leq 0,0002$ .

\*"I" oznacza obecność sekwencji AA w loci –18674/–18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji.

Przeprowadzona rekonstrukcja haplotypów wykazała istnienie 8 możliwych haplotypów (Tabela 8). Zarówno wartość  $F_{ST}$  ( $F_{ST} = 0,0001$ ;  $P = 0,35$ ), jak i test dokładny częstości haplotypów ( $P = 0,91$ ) wykazały brak statystycznie znamiennych różnic pomiędzy grupą chorych z chorobami alergicznymi i populacyjną grupą kontrolną. Również porównanie prostym test  $\chi^2$  częstości przewidywanych haplotypów nie wykazało różnic pomiędzy oboma grupami ( $P = 0,52$ ).

**Tabela 8.** Szacowany rozkład haplotypów przy znanych genotypach w *loci* -18674/-18675 delAA, -18483 A>C, -344 C>T i -95 T>C.

Haplotyp					Chorzy na choroby alergiczne ( $n = 154$ )		Populacyjna grupa kontrolna ( $n = 154$ )	
	-18674/- 18675 delAA*	-18483 A>C	-344 C>T	-95 T>C	$\approx n$	$\approx \%$	$\approx n$	$\approx \%$
Ht1	D	C	C	T	1	0,004	-	-
Ht2	D	C	C	C	-	-	1	0,003
Ht3	D	C	T	T	48	0,155	51	0,166
Ht4	I	A	C	C	83	0,269	84	0,273
Ht5	I	A	C	T	74	0,240	90	0,292
Ht6	I	A	T	T	3	0,010	3	0,010
Ht7	I	C	C	T	8	0,025	6	0,020
Ht8	I	C	T	T	91	0,296	72	0,237
Suma					308,0	100	308,0	100

\*"I" oznacza obecność sekwencji AA w *loci* -18674/-18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji.



4.3 Cztery częste polimorfizmy genu *FCERIA* (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C) a całkowite stężenie IgE w surowicy i eozynofilia bezwzględna

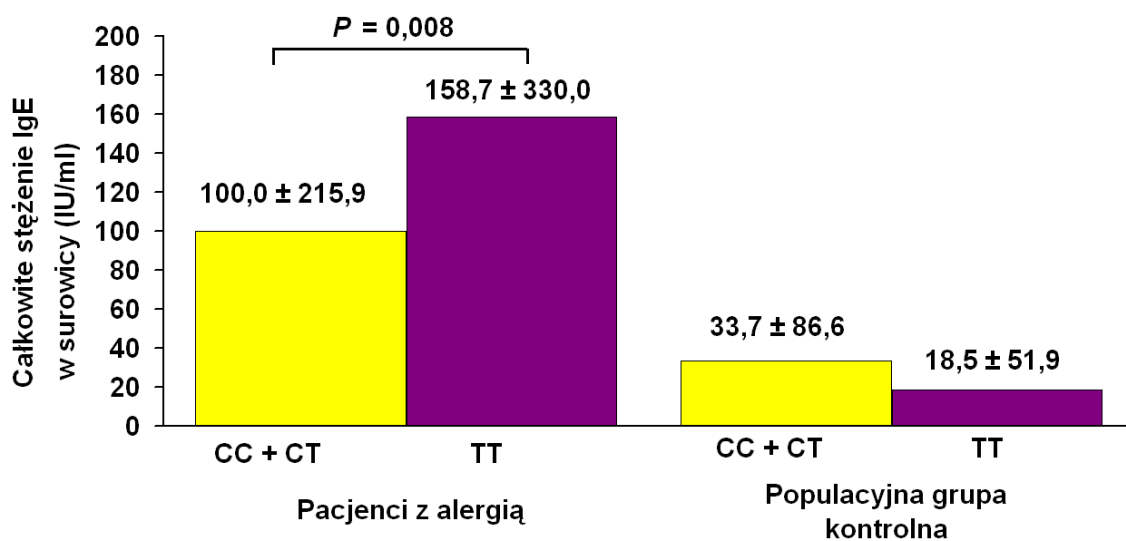
#### 4.3.1 Analiza oddzielna

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że w grupie chorych na choroby alergiczne osoby z genotypem –344 TT miały większe całkowite stężenia IgE w surowicy ( $158,7 \pm 330,0$  IU/ml) niż nosiciele allelu –344 C ( $101,0 \pm 213,8$  IU/ml;  $P = 0,008$ ) (Tabela 9, Rycina 25). Zależność ta nie występowała w kontrolnej grupie populacyjnej (odpowiednio  $18,5 \pm 51,9$  IU/ml vs  $33,7 \pm 86,6$  IU/ml;  $P = 0,46$ ) (Tabela 9, Rycina 25). W grupie pacjentów chorych na choroby alergiczne, całkowite stężenia IgE w surowicy były większe także u osób z genotypem –18483 CC ( $156,9 \pm 329,9$  IU/ml) niż u nosicieli allelu –18483 A ( $101,0 \pm 213,8$  IU/ml) (Tabela 9, Rycina 26). Zależność ta nie osiągnęła jednak istotności statystycznej ( $P = 0,06$ ) i nie występowała w kontrolnej grupie populacyjnej (odpowiednio  $18,5 \pm 53,0$  IU/ml vs  $33,7 \pm 79,1$  IU/ml;  $P = 0,46$ ) (Tabela 9, Rycina 26). Polimorfizmy –18674/–18675 delAA i –95 T>C nie wykazywały zależności z całkowitymi stężeniami IgE w surowicy (wszystkie  $P > 0,95$ ) (Tabela 9). Żaden z 4 polimorfizmów (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T i –95 T>C) nie wykazywał zależności z wartościami eozynofilii bezwzględnej (wszystkie  $P > 0,05$ ) (Tabela 9).

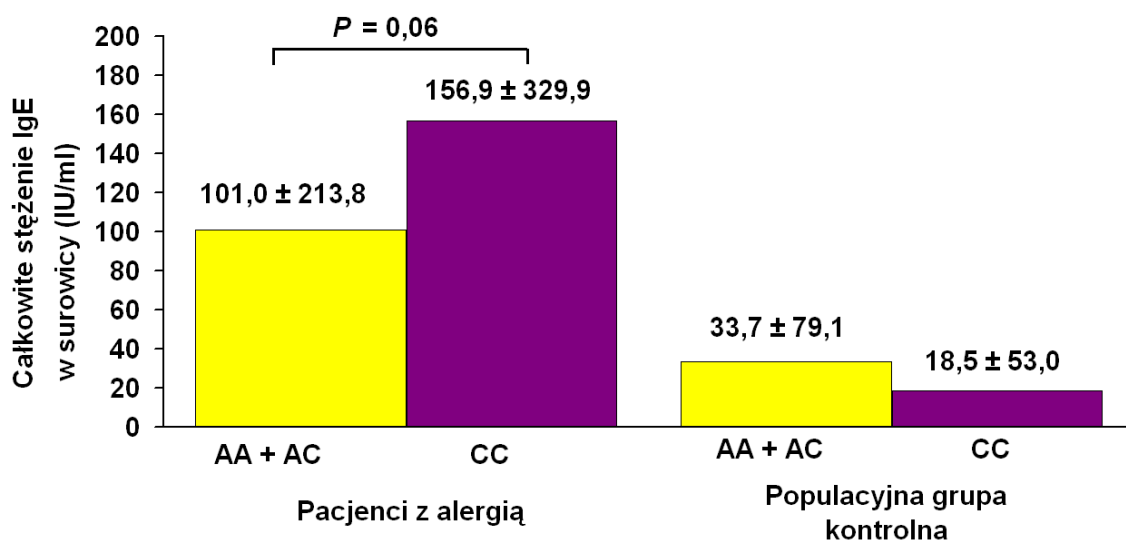
**Tabela 9.** Zmienność genetyczna genu *FCERIA* a całkowite stężenia IgE w surowicy i eozynofilia bezwzględna.

Polimorfizm (grupa genotypowa)	Grupa genotypowa polimorfizmu	Chorzy na choroby alergiczne		Populacyjna grupa kontrolna
		Eozynofilia bezwzględna (/μl)	Całkowite stężenie IgE w surowicy (IU/ml)	Całkowite stężenie IgE w surowicy (IU/ml)
-18674/-18675 delAA*				
	II	174,0 ± 374,0	119,0 ± 227,5	26,5 ± 79,2
	ID + DD	150,0 ± 228,5	138,5 ± 394,3	37,3 ± 80,5
	<i>P</i>	0,29	0,77	0,94
-18483 A>C				
	AA + AC	193,0 ± 301,3	101,0 ± 213,8	33,7 ± 79,1
	CC	126,7 ± 256,2	156,9 ± 329,9	18,5 ± 53,0
	<i>P</i>	0,1	0,06	0,56
-344 C>T				
	CC + CT	168,5 ± 296,0	100,0 ± 215,9	33,7 ± 86,6
	TT	149,5 ± 312,0	158,7 ± 330,0	18,5 ± 51,9
	<i>P</i>	0,29	0,008	0,46
-95 T>C				
	TT	161,2 ± 312,0	138,5 ± 254,8	30,9 ± 80,7
	TC + CC	168,5 ± 294,3	115,5 ± 280,3	28,5 ± 69,4
	<i>P</i>	0,37	0,45	0,55

\*"I" oznacza obecność sekwencji AA w *loci* -18674/-18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji.



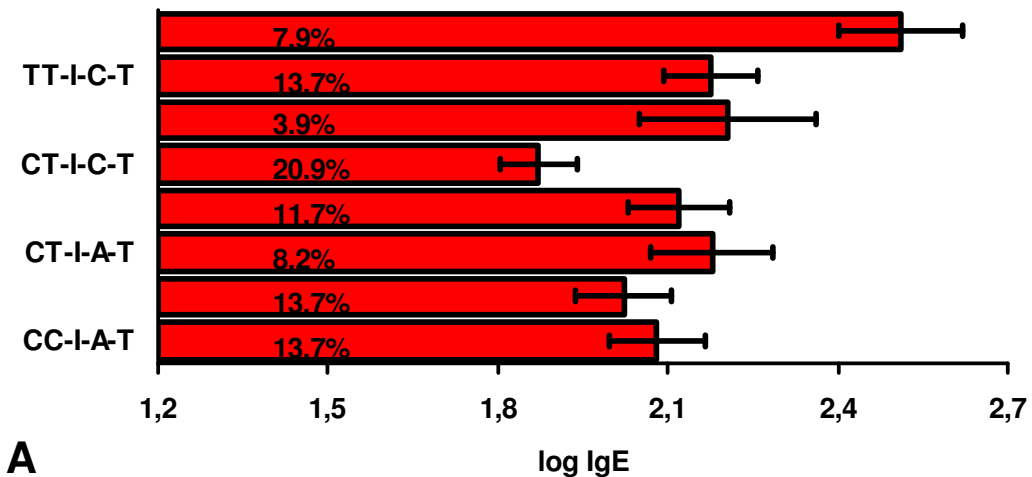
**Rycina 25.** Polimorfizm -344 C>T i całkowite stężenia IgE w surowicy w grupie chorych z alergią i w kontrolnej grupie populacyjnej.



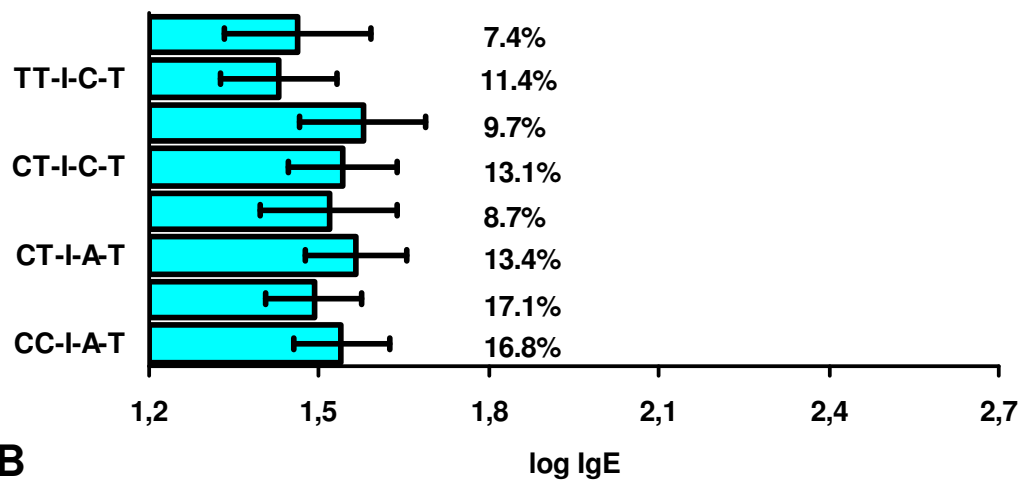
**Rycina 26.** Polimorfizm -18483 A>C i całkowite stężenia IgE w surowicy w grupie chorych z alergią i w kontrolnej grupie populacyjnej.

#### 4.3.2 Analiza haplotypowa

Testy zależności haplotypowych ujawniły korelację całkowitego stężenia IgE w surowicy jedynie z polimorfizmem -344 C>T. Całkowite stężenie IgE w surowicy skontrastowane względem haplotypów polimorfizmu -344 C>T wykazywało w teście kondycjonującym zależności pozostałych trzech polimorfizmów (-18674/-18675 delAA, -18483 A>C i -95 T>C) jedynie tendencję statystyczną ( $P = 0,08$ ). Jednakże w przypadku kondycjonowania polimorfizmów -18674/-18675 delAA, -18483 A>C i -95 T>C względem genotypu polimorfizmu -344 C>T zależność ta osiągała istotność statystyczną ( $P = 0,013$ ). Zależność w teście kondycjonującym polimorfizmów -18674/-18675 delAA, -18483 A>C i -95 T>C osiągała znaczną istotność statystyczną przy skontrastowaniu względem przeciwstawnych homozygot -344 CC vs. -344 TT (108,9 vs. 196,3 IU/ml;  $P = 0,002$ ) oraz heterozygot i homozygot zmutowanych, tj. -344 CT vs. -344 TT (91,8 vs. 196,3 IU/mL;  $P < 0,001$ ), ale nie była istotna w przypadku heterozygot i homozygot dzikich (-344 CT vs. -344 CC;  $P > 0,05$ ). Statystycznie istotnych zależności nie obserwowano w analogicznych testach przeprowadzonych w populacyjnej grupie kontrolnej (wszystkie  $P > 0,05$ ). Na Rycinie 27 przedstawiono średnie całkowite stężenia IgE w surowicy dla najczęstszych haplotypów (występujących z częstością >3% w obu badanych grupach) kondycjonowanych względem genotypu polimorfizmu -344 C>T.



**A**



**B**

**Rycina 27.** Średnie całkowite stężenia IgE (wartość logarytmowana  $\pm$  SEM) dla najczęściej występujących (o częstości  $>3\%$ ) haplotypów dla *loci* –18483 A>C, –18674/–18675 delAA i –95 T>C kondycjonowanych względem genotypu polimorfizmu –344 C>T u pacjentów z alergią („A”) i w populacyjnej grupie kontrolnej („B”). Sekwencje kondycjonowanych haplotypów (XX-Y-Z-T) podano jako genotyp polimorfizmu –344C>T (XX) oraz haplotypowe warianty polimorfizmów –18674/–18675 delAA (Y), –18483 A>C (Z) i –95 T>C (T). „I” oznacza obecność sekwencji AA w *loci* –18674/–18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji.

#### 4.4 Zmienność genetyczna genu *FCERIA* a zjawiska autoimmunologiczne

W przypadku żadnego z 4 częstych badanych polimorfizmów (-18483 A>C, -18674/-18675 delAA, -344 T>C i -95 T>C) nie obserwowano istotnych zależności pomiędzy genotypem a wynikami testu skórno surowicy autologicznej (ASST) i testu uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych (BHR-Test) (wszystkie  $P > 0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Polimorfizmy genu *FCERIA* a wyniki testów w kierunku autoreaktywności przeciwko IgE i(lub) receptorowi IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI).

Polimorfizm (grupa genotypowa)	ASST		Test BHR	
	dodatni (+)	ujemny (-)	dodatni (+)	ujemny (-)
-18674/-18675 delAA*				
II	29	36	41	26
ID + DD	11	12	13	17
		$P = 0,79$		$P = 0,1$
-18483 A>C				
AA + AC	32	36	40	33
CC	8	12	14	10
		$P = 0,76$		$P = 0,76$
-344 C>T				
CC + CT	33	37	41	34
TT	7	11	13	9
		$P = 0,53$		$P = 0,71$
-95 T>C				
TT	22	26	27	28
TC + CC	18	22	27	15
		$P = 0,89$		$P = 0,14$

\*"I" oznacza obecność sekwencji AA w *loci* -18674/-18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji.

BHR, test uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych; ASST, test skórny surowicy autologicznej.

W przypadku polimorfizmu -12663 A>G jeden z 3 nosicieli allelu G miał wynik dodatni testu skórno surowicy autologicznej, drugi miał wynik dodatni testu uwalniania histaminy, a trzeci miał oba te wyniki ujemne.

#### 4.5 Nadwrażliwość na aspirynę a polimorfizmy genu *FCERIA*

Żaden z 4 częstych polimorfizmów genu *FCERIA* (-18483 A>C, -18674/-18675 delAA, -344 C>T i -95 T>C) nie wykazywał zależności z nadwrażliwością na aspirynę (wszystkie  $P > 0,05$ ). Dystrybucję cechy względem genotypów tych polimorfizmów przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Zmienność genetyczna *FCERIA* a nadwrażliwość na aspirynę.

Polimorfizm	Nadwrażliwość na aspirynę	
	-	+
-18674/-18675 delAA*		
II	71	38
ID	28	13
DD	1	3
-18483 A>C		
AA	29	13
AC	47	29
CC	24	12
-344 T>C		
CC	31	15
CT	46	28
TT	23	11
-95 T>C		
TT	49	34
TC	42	17
CC	9	3

\*"I" oznacza obecność sekwencji AA w *loci* -18674/-18675, podczas gdy „D” oznacza brak tej sekwencji.

Co ciekawe, u wszystkich trzech nosicieli rzadkiego allelu polimorfizmu – 12663 A>G z grupy chorych z alergią potwierdzono nadwrażliwość na aspirynę.



## 5 Dyskusja

### 5.1 Poszukiwanie zmienności genu *FCERIA*

Jak dotąd zmienności genetycznej *FCERIA* poświęcono tylko trzy badania [64–66], z czego jedynie w dwóch poszukiwano nowych wariantów genu [64,65]. Poznano dotąd cztery polimorfizmy genu *FCERIA*, wszystkie zlokalizowane w obszarze promotora proksymalnego [8,64–66].

Hasegawa i wsp. [65] przeprowadzili w populacji japońskiej badanie w kierunku obecności mutacji metodą bezpośredniego sekwencjonowania w rejonie około 160 pz promotora proksymalnego oraz regionu eksonu 1, znajdując jeden polimorfizm pojedynczego nukleotydu: –66 T>C (–95 T>C) [65]. Z kolei Shikanai i wsp. [64] dokonali u obywateli USA pochodzenia europejskiego i Afro-Amerykanów przesiewowego badania w kierunku zmienności genetycznych w zakresie >1000 pz promotora proksymalnego oraz eksonów 1–5 metodą SSCP z następowym sekwencjonowaniem wybranych próbek [65]. Odkryli obecność trzech mutacji w zakresie promotora proksymalnego: –770 A>C, –664 G>A i –335 T>C (–344 C>T) oraz brak mutacji zmieniających sekwencję aminokwasową w zakresie badanych eksonów 1–5 [65]. Współobecność polimorfizmów –95 T>C i –344 C>T wykazano w populacji koreańskiej [66]. Co ciekawe, Shikanai i wsp. [64] nie wykryli w badanych grupach obywateli USA pochodzenia europejskiego i Afro-Amerykanów obecności polimorfizmu –95 T>C, choć region go zawierający był objęty zakresem badania SSCP [65]. Mogło to sugerować różnice rasowe, nie w częstości, ale w fakcie występowania polimorfizmu –344 C>T pomiędzy obywatelami USA pochodzenia europejskiego i Afro-Amerykanami a Koreańczykami.

Pierwszym celem etapu przesiewowego niniejszego badania było potwierdzenie poprzednich obserwacji dotyczących regionu promotora proksymalnego oraz eksonów 1–5 [64,65], w tym weryfikacja obecności polimorfizmu –95 T>C u osób pochodzenia europejskiego. Otrzymane wyniki potwierdziły współistnienie obu tych polimorfizmów (–95 T>C i –344 C>T) w populacji polskiej. Zatem wydaje się, że badanie Shikanai’ego i wsp. w zakresie omawianego fragmentu promotora proksymalnego miało zbyt małą czułość [64]. Jest to możliwe w przypadku badania metodą SSCP, które wykazuje dobrą swoistość w zakresie wykrywania mutacji (czasem obraz SSCP pozwala nawet na genotypowanie), jednak może nie być wystarczająco czułe by uchwycić wszystkie istniejące w analizowanym fragmencie mutacje. Te ograniczenia dotyczą także niniejszego badania. Z drugiej strony, zastosowana w niniejszym badaniu metodologia pozwala na potrójne potwierdzenie obecności wykrytych mutacji: obrazem SSCP, wynikami sekwencjonowaniem i RFLP. W zakresie eksonów 1 i 3 wykryto w SSCP po jednej pojedynczej i bardzo rzadkiej zmienności (oba 1/96), które nie były one dalej sekwencjonowane. Potwierdza to wyniki uzyskane w zakresie eksonu 1 przez Hasegawę i wsp [65] oraz przez Shikanai’ego i wsp. [64] w zakresie eksonów 1–5.

Drugim celem etapu przesiewowego niniejszego badania było poszukiwanie zmienności w zakresie nowych i jak dotąd nie badanych w tym kierunku regionów genu *FCERIA*, a mianowicie promotora dystalnego oraz eksonów 1A i 2A [50–52]. Otrzymane wyniki sugerują znaczną konserwatywność promotora dystalnego – w tym rejonie genu nie stwierdzono metodą SSCP obecność żadnej zmienności u 96 badanych osób. W obszarze eksonu 1A obserwowano natomiast istnienie 2 częstych polimorfizmów: jednego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (–18483 A>C) i jednej delecji dwunukleotydu (–18674/–18675 delAA). Te dwa polimorfizmy stanowią oryginalne odkrycie i nigdy wcześniej nie były

publikowane. Ekson 2A okazał się strukturalnie konserwatywny, niemniej jednak niedaleko końca 5' eksonu 2A stwierdzono obecność rzadkiego polimorfizmu -12663 A>G. Istnienie tej mutacji również nie było wcześniej relacjonowane.

## 5.2 Częstości wariantów allelicznych genetycznych *FCERIA*

Allel rzadki polimorfizmu -344 C>T występował w badanej grupie chorych z częstością 0,46 natomiast w grupie populacyjnej z częstością 0,43 i różnica ta nie była statystycznie istotna.

W badaniu Shikanai'ego i wsp. [64] częstość alleliczne wynosiły w grupie chorych na astmę i w grupie kontrolnej odpowiednio obywateli USA pochodzenia europejskiego 0,423 i 0,445, natomiast w przypadku Afro-Amerykanów odpowiednio 0,146 i 0,161. Różnice częstości allelicznych pomiędzy chorymi na astmę i zdrowymi osobami z grupy kontrolnej nie były statystycznie znamienne [64]. Różnice częstości allelicznych pomiędzy grupami o odmiennym pochodzeniu były natomiast statystycznie istotne zarówno w przypadku chorych na astmę, jak i zdrowej grupy kontrolnej [64]. Zatem, częstości alleliczne polimorfizmu -344 C>T uzyskane przez nas są zbliżone do uzyskanych u obywateli USA pochodzenia europejskiego, a różnią się od otrzymanych w grupach Afro-Amerykanów, podobnie jak w przypadku badania Shikanai'ego i wsp [64]. Allel C polimorfizmu -344 C>T występował rzadziej także w badanych grupach Koreańczyków [66]. U Koreańczyków chorych na pokrzywkę z nadwrażliwością na aspirynę, pokrzywkę bez nadwrażliwości na aspirynę i w zdrowej grupie kontrolnej częstości te wynosiły odpowiednio: 0,252, 0,153 i 0,178 [66].

Wariant rzadki polimorfizmu -95 T>C występował w niniejszym badaniu z częstością 0,27 u chorych oraz 0,28 w populacyjnej grupie kontrolnej, a różnica ta nie była statystycznie znamienna. W populacji japońskiej, u osób chorych na atopowe zapalenie skóry, allel rzadszy tego polimorfizmu występował z częstością 0,019, natomiast w zdrowej grupie kontrolnej 0,125 [65]. Różnica ta była statystycznie istotna [65]. W żadnej z grup nie obserwowano występowania homozygot -95 CC [65]. W populacji koreańskiej również nie stwierdzono obecności homozygot -95 CC [66]. W badaniu Bae i wsp. [66], allel rzadki polimorfizmu -95 T>C występował z częstością 0,062 w grupie chorych na pokrzywkę aspirynową, 0,016 w grupie osób chorych na pokrzywkę bez nadwrażliwości na aspirynę oraz 0,05 w zdrowej grupie kontrolnej. W przypadku obu populacji z krajów Dalekowschodnich, częstości allelu rzadkiego były zatem niższe niż w aktualnym badaniu w populacji polskiej [65,66].

Częstości alleliczne polimorfizmów -18483 A>C i -18674/-18675 delAA były nie wykazywały różnic pomiędzy badanymi przez nas grupami.

W przypadku badania japońskiego [65], polimorfizm -95 T>C wykazywał odmienne rozkłady genotypowe pomiędzy grupą chorych na atopowe zapalenie skóry i zdrową grupą kontrolną. W badaniu koreańskim [66], polimorfizmy -95 T>C i -344 C>T wykazywały zależność z pokrzywką aspirynową (Rozdział 5.3). Nie znaleziono różnic w rozkładach genotypowych i częstościach allelicznych pomiędzy grupą chorych i kontrolną grupą populacyjną w przypadku żadnego z czterech omawianych polimorfizmów (-95 T>C, -344 C>T, -18483 A>C i -18674/-18675 delAA). Nie należy jednak wyciągać na tej podstawie wniosków odnośnie zależności między badanymi polimorfizmem a poszczególnymi chorobami (astma, pokrzywka, alergiczny nieżyt nosa) wchodzącymi w skład badanej

grupy chorych. Grupie tej celowo nadano charakter heterogenny, co miało zwiększać szanse na znalezienie mutacji mogących w sposób szczególnie sprzyjać którejś z chorób. Nie możemy też przeprowadzić adekwatnych analiz dla poszczególnych podgrup chorych (astma, pokrzywka, przewlekły alergiczny nieżyt nosa) ze względu na ich małą liczebność. Nasze wyniki nie mogą być zatem traktowane jako wykluczające możliwość zależności między omawianymi polimorfizmami a chorobami występującymi u osób w badanej grupie. W celu zbadania takich zależności należy bowiem przeprowadzić badania na większych i ściślej dobranych (jedna choroba, jedna etiologia) grupach chorych.

Także rozkłady haplotypów obliczonych dla czterech częstych polimorfizmów *FCERIA* (-95 T>C, -344 C>T, -18483 A>C i -18674/-18675 delAA) były zbliżone w obu badanych przez nas grupach.

Wariant zmutowany polimorfizmu -12663 A>G występował praktycznie równie rzadko w obu badanych przez nas grupach pod kątem tej mutacji grupach. Można zatem sądzić, że jego rola patogenetyczna jest znikoma.

### 5.3 Zmienność genetyczna *FCERIA* i nadwrażliwość na aspirynę

Nadwrażliwość na aspirynę występuje u około 10% chorych na ciężką postać astmy [152,153]. Co ciekawe, relacjonowano także występowanie atopii u 70% chorych na astmę aspirynową [152,153]. Ponadto, u chorych na pokrzywkę aspirynową zidentyfikowano obecność autoprzeciwciał przeciwko FcεRI i(lub) IgE [130], z których przynajmniej część posiada zdolność wywoływania degranulacji komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych [107,108,130,140–145]. Rola powyższych obserwacji w

etiologii i patogenezie nadwrażliwości na aspirynę pozostaje jednak niewyjaśniona.

Biorąc pod uwagę opisane powyżej powiązania pomiędzy atopią, IgE i FcεRI [130,152,153] a nadwrażliwością na aspirynę zasadne wydaje się poszukiwanie możliwych zależności między wariantami allelicznymi genu kodującego podjednostkę FcεRIα (*FCERIA*) a skłonnością do nadwrażliwości na NLPZ.

Istnieje tylko jedno opublikowane badanie dotyczące zmienności genu *FCERIA* w kontekście nadwrażliwości na aspirynę [66]. Bae i wsp. [66] stwierdzili częstsze występowanie allelu -344 T u chorych na pokrzywkę aspirynową niż w grupach chorych na pokrzywkę bez nadwrażliwości na aspirynę i u osób zdrowych. W tym samym badaniu, allel -95 C występował częściej w grupie chorych na pokrzywkę z nadwrażliwością na NLPZ niż w grupie chorych bez nadwrażliwości [66].

W niniejszym badaniu nie stwierdzono żadnych różnic w rozkładach genotypów czterech częstych polimorfizmów *FCERIA* (-95 T>C, -344 C>T, -18483 A>C i -18674/-18675 delAA) między grupami chorych z i bez nadwrażliwości na kwas acetylosalicylowy. Takie wyniki pozostają zatem w sprzeczności z wynikami uzyskanymi przez Bae i wsp [66]. Wiarygodna analiza cechy względem genotypu w podgrupach chorych na astmę i pokrzywkę nie jest jednak w aktualnym badaniu możliwa ze względu na małe liczebności w podgrupach heterogennej grupy chorych na choroby alergiczne.

Co ciekawe, wszyscy nosiciele allelu -12663 G charakteryzowali się obecnością nadwrażliwości na NLPZ. Obserwacja ta może stanowić wynik przypadku, a ewentualna ocena możliwej zależności allelu -12663 G z nadwrażliwością na aspirynę wymagała by ze względu na jego rzadkie występowanie dużo większej liczebności grup.

#### 5.4 Warianty alleliczne genu *FCERIA* i zjawiska autoimmunologiczne

Zagadnienie podłoża genetycznego zjawisk autoimmunologicznych, takich jak autoprzeciwciała przeciw FcεRI i(lub) IgE, w chorobach alergicznych nie było jak dotąd badane. Autoprzeciwciała te mogą wchodzić w interakcję z FcεRI lub kompleksami FcεRI-IgE. Część z nich to przeciwciała czynnościowe, mogące uruchamiać sygnalizację przez FcεRI z jej następstwami w postaci lokalnego odczynu alergicznego [107,108,130,140–145]. Może to odgrywać rolę w rozwoju i przebiegu przewlekłej pokrzywki idiopatycznej [107,108,140–144].

Autoprzeciwciała czynnościowe wchodziły w reakcję z zewnętrzną częścią FcεRI czyli FcεRIα. W związku z tym, za zasadne uznano sprawdzenie, czy zmienność genetyczna *FCERIA* nie wpływa na wyniki dwóch testów ukierunkowanych na autoprzeciwciała przeciw FcεRI i(lub) IgE, a mianowicie testu skórno surowicy autologicznej (ASST) i testu uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych (BHR-Test) (Rozdziały odpowiednio 3.2.2.1 i 3.2.2.2).

Żaden z czterech częstych polimorfizmów genetycznych *FCERIA* (–95 T>C, –344 C>T, –18483 A>C i –18674/–18675 delAA) nie wykazywał zależności z wynikami powyższych dwóch testów. Najbardziej prawdopodobną przyczyną może być to, że wszystkie te cztery mutacje zlokalizowane są w niekodujących regionach genu, a zatem nie wpływają na sekwencję aminokwasową łańcucha FcεRIα, a tym samym na interakcje FcεRIα z IgE oraz autoprzeciwciałami.

U jednego z trzech nosicieli rzadkiego allelu –12663 G obserwowano dodatni wynik testu ASST, a u jednego dodatni wynik testu BHR-Test. W

przypadku tego polimorfizmu jakiegokolwiek wnioskowanie statystyczne jest zatem niemożliwe.

Posumowując, w badanej grupie nie obserwowano zależności między zmiennością genetyczną *FCERIA* a zjawiskami autoimmunologicznymi w postaci reaktywności autoprzeciwciał przeciw FcεRI i(lub) IgE.

### 5.5 Zmienność genetyczna *FCERIA* a całkowite stężenie IgE w surowicy

Shikanai i wsp. [64] obserwowali istotnie statystycznie częstsze występowanie genotypu -344 CC w grupie chorych na astmę z niskimi całkowitymi stężeniami IgE w surowicy. W aktualnym badaniu stwierdzono, że w heterogennej grupie chorych alergicznych osoby z genotypem -344 TT charakteryzowały się występowaniem istotnie wyższych całkowitych stężeń IgE w surowicy ( $P = 0.008$ ). Obserwacja niniejsza i grupy amerykańskiej pozostają zatem we wzajemnej zgodzie, chociaż nie korespondują ze sobą bezpośrednio [64]. Bardzo niedawno, zbliżone wyniki uzyskali także Bae i wsp. [66], którzy stwierdzili, że w grupie chorych na pokrzywkę aspirynową nosicielstwo allelu -344 T wiązało się z wyższymi całkowitymi stężeniami IgE w surowicy.

Co ciekawe, właśnie odkryty polimorfizm -18483 A>C wykazywał podobną jak polimorfizm -344 C>T zależność z całkowitymi stężeniami IgE, choć nie osiągnęła ona jednak w tym przypadku istotności statystycznej ( $P = 0.06$ ). Warto zaznaczyć, że polimorfizmy te (-18483 A>C i -344 C>T) pozostają w ścisłym sprzężeniu i wykazują bardzo podobne częstości alleliczne.

Zależność pomiędzy zmiennością genetyczną FcεRI a stężeniami IgE w surowicy relacjonowano już wcześniej [62,76,78,84,86,88]. Wszystkie te doniesienia dotyczyły jednak genu *FCER1B* [62,76,78,84,86,88]. Hizawa i



wsp. [84] oraz Cui i wsp. [88] opisali u chorych na astmę związek polimorfizmu  $-109\ C/T\ FCER1B$  z całkowitymi stężeniami IgE w surowicy, w którym największe stężenia występowały u osób z genotypem TT. U chorych na astmę i u na alergiczny nieżyt nosa obserwowano pośrednią zależność pomiędzy całkowitymi stężeniami IgE w surowicy a polimorfizmem  $Glu237Gly\ FCER1B$  [76,86], oraz bezpośredni związek między tym polimorfizmem i całkowitymi stężeniami IgE u osób zdrowych [62].

Ewentualny mechanizm kontrolowania stężenia IgE przez zmienności genów *FCERIA* i *FCER1B* pozostaje niejasny. Wiadomo, że całkowite stężenia IgE w surowicy korelują z ekspresją FcεRI (ocenianą jako ekspresja FcεRIα) na powierzchni komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych, ale także granulocytów kwasochłonnych i komórek dendrytycznych [3,8,9,95,96,155–158]. Uważa się, że IgE spełnia rolę regulacyjną w stosunku do FcεRI [3,8,95,96]. Dowodów na to dostarczają obserwacje, iż obecność i wiązanie IgE do FcεRI powoduje zwiększenie ich ekspresji [95,96,159]. Co więcej, terapia z zastosowaniem przeciwciała anti-IgE (omalizumabu) powoduje zmniejszenie ekspresji FcεRI na wielu różnych typach komórek [154–158], stanowiące efekt wtórny do wywołanej działaniem omalizumabu redukcji całkowitych stężeń IgE w surowicy [8,155–158]. Jak się bowiem przypuszcza, wiązanie IgE do FcεRI uruchamia pewnego stopnia sygnalizację nawet pod nieobecność alergenu spinającego kompleksy IgE-FcεRI, powodującą zwiększenie ekspresji FcεRI na powierzchni błony komórkowej [3,8,12,95,96].

Jak zatem wyjaśnić zależność pomiędzy wariantami genetycznymi *FCERIA* i *FCER1B* a całkowitymi stężeniami IgE w surowicy? Być może nie tylko IgE oddziałuje na FcεRI, ale również FcεRI zlokalizowane w mastocytach i bazofilach wywierają efekt na IgE [8]. Sugeruje się na przykład istnienie pętli sprzężenia zwrotnego, w którym pobudzone przez

IgE receptory FcεRI indukują w obecności alergenu zwiększone wytwarzanie interleukiny-4 przez granulocyty zasadochłonne i komórki tuczne, która następnie powoduje przełączanie limfocytów B na wytwarzanie IgE [8]. Według tej teorii, ewentualne różnice w ekspresji genów podjednostek FcεRI wywołane zmiennościami genetycznymi mogłyby wpływać stężenie IgE w surowicy. W przypadku genu *FCER1B* zaproponowano już taki mechanizm, w którym wersja regionu regulatorowego zawierająca bardziej aktywne allele polimorfizmów mogłaby odpowiadać za większą ekspresję receptora FcεRI, a przez to większe stężenia IgE i w surowicy i skłonność do atopii. Podobną hipotezę można wysnuć w przypadku obserwowanej przez nas zależności pomiędzy genotypem -344 TT a zwiększonymi całkowitymi stężeniami IgE w surowicy. Potwierdzenie takiej tezy wymagałoby jednak wykonania wnikliwych badań czynnościowych odkrytych polimorfizmów, jak również udowodnienia istnienia pętli sprzężenia zwrotnego, w której FcεRI pobudza wytwarzanie IgE. Pierwszym takim krokiem jest niedawno opublikowane badanie Bae i wsp., w którym wykazano większą aktywność transkrypcyjną promotora proksymalnego zawierającego allel -344 T [66]. Istnienie podobnego sprzężenia zwrotnego można także zasugerować w przypadku komórek, takich jak komórki dendrytyczne, komórki Langerhansa, w którym rolę akceleratora mogłoby odgrywać zwiększenie prezentacji antygeny przez te komórki, nasilające następnie reakcję alergiczną i zwrócić prezentację antygeny.

#### 5.6 Możliwe implikacje terapeutyczne zmienności genetycznej *FCERIA*

Ponieważ FcεRI obecny na bazofilach i mastocytach stanowi niezbędny element sekwencji rozwoju reakcji nadwrażliwości typu I, a FcεRI znajdujący się na powierzchni komórek dendrytycznych, komórek

Langerhansa i mastocytów odgrywa ważną rolę regulatorową, wydaje się, że perspektywę dalszych badań nad genetyką i zmiennością genetyczną *FcεRI* wyznaczać będzie farmakogenetyka.

W przypadku genu *FCERIA* uważa się za celowe wynalezienie substancji, które mogłyby wpływać na aktywność transkrypcyjną genu [52,154]. Taki lek mógłby zmniejszać aktywność promotora proksymalnego lub promotora dystalnego genu *FCERIA* i tym samym obniżać ekspresję białka kluczowego dla rozwoju reakcji atopowej [52,154]. Szczególnie istotne jest zatem poznanie budowy (sekwencji) i regulacji genu [46–57], a także jego zmienności genetycznych [64–66], mogących wpływać na odmienne wiązanie czynników transkrypcyjnych czy też wprowadzanych z zewnątrz substancji (leków). Podobne rozumowanie można przeprowadzić w przypadku genu *FCERIB* [52,154].

Istnieją już jednak substancje o działaniu przeciwalergicznym, których efekty mogłyby w znacznym stopniu zależeć od zmienności genetycznej genu *FCERIA* [154]. Najbardziej znanym lekiem przeciwalergicznym jest monoklonalne przeciwciało anty-IgE – omalizumab [102–106,154–158,160–162]. Omalizumabowi poświęcono multum badań klinicznych, w których udowodniono jego skuteczność i bezpieczeństwo w umiarkowanej i ciężkiej astmie atopowej, a trwają także badania nad jego zastosowaniem w alergicznym nieżycie nosa oraz atopowym zapaleniu skóry [102–106]. Równocześnie prowadzone są badania laboratoryjne nad biochemicznymi i komórkowymi działaniami omalizumabu [155–158,160–162]. Wykazano, że obniżeniu całkowitych stężeń IgE w surowicy towarzyszy zmniejszenie ekspresji *FcεRI* (*FcεRIα*) na powierzchni mastocytów, granulocytów zasadochłonnych i innych komórek wykazujących ekspresję *FcεRI* [155–158,160–162]. Zmianom tym towarzyszą także zmiany w odsetkach badanych komórek, profilu ekspresji innych białek oraz cytokin [8,156,158,161,162]. Biorąc pod uwagę kluczową rolę *FcεRIα* w

przenoszeniu pierwotnych efektów omalizumabu (redukcja całkowitych stężeń IgE w surowicy) na te komórki i zakładając hipotetyczną pętlę sprzężenia zwrotnego dodatniego IgE-FcεRI-IgE [8] można by spekulować, iż różnice w zakresie aktywności transkrypcyjnej genu *FCERIA*, powodujące odmienną ekspresję FcεRIα (a zatem i całego FcεRI) mogłyby wpływać na efekty komórkowe i molekularne, a w konsekwencji i działania kliniczne omalizumabu. Jest to jednak tylko hipoteza, której udowodnienie wymagałoby przeprowadzenia szeregu adekwatnych badań. Być może polimorfizmy *FCERIA* mogły by wpływać także na działanie innych leków przeciwalergicznym o działaniu ukierunkowanym na FcεRIα [154].

## 6 Wnioski

- 1). Polimorfizmy -95 T>C i -344 C>T genu *FCERIA* występują ze znacząco częstotliwością w populacji polskiej. Częstość -344 C>T nie odbiega od stwierdzonej u obywateli USA pochodzenia europejskiego.
- 2). Sekwencja eksonów 1-5 genu *FCERIA* jest konserwatywna.
- 3). Ekson 2A genu *FCERIA* jest konserwatywny w swojej sekwencji, niemniej jednak w pobliżu jego końca 5' występuje rzadki polimorfizm -12663 A>G.
- 4). W obrębie eksonu 1A genu *FCERIA* występują dwa częste polimorfizmy: -18483 A>C i -18674/-18675 delAA.
- 5). Badana sekwencja promotora dystalnego jest konserwatywna.
- 6). Cztery częste polimorfizmy genu *FCERIA* (-95 T>C, -344 C>T i -18483 A>C i -18674/-18675 delAA) pozostają w parach w ścisłym sprzężeniu genetycznym.
- 7). Częstości alleliczne wszystkich polimorfizmów nie wykazują różnic pomiędzy badaną grupą chorych alergicznych a grupą kontrolną. Również częstości haplotypowe czterech częstych polimorfizmów genu *FCERIA* (-95 T>C, -344 C>T, -18483 A>C i -18674/-18675 delAA) są zbliżone w obu grupach.
- 8). Nie stwierdzono zależności między zmiennością genetyczną *FCERIA* a nadwrażliwością na kwas acetylosalicylowy. Polimorfizmy genu *FCERIA* nie wykazywały także zależności z występowaniem autooprzeciwciał przeciw FcεRI i(lub) IgE.
- 9). W grupie chorych obserwowano znamienne statystycznie zależność między polimorfizmem -344 C>T a całkowitymi stężeniami IgE w surowicy. Genotyp -344 TT wiązał się z występowaniem wyższych stężeń niż nosicielstwo allelu -344 C. Ten wniosek uzyskał potwierdzenie w analizie haplotypowej. Stwierdzono także skłonność do występowania

wyższych całkowitych stężeń IgE w surowicy u chorych z genotypem –  
18483 CC.

## 7 Streszczenie

### 7.1 Wstęp

Spinanie przez alergeny poliwalentne kompleksów IgE-receptor IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI), zlokalizowanych na powierzchni komórek tucznych i granulocytów zasadochłonnych, stanowi kluczowy etap w rozwoju reakcji nadwrażliwości typu I. W przeciwieństwie do dokładnie zbadanej zmienności genu łańcucha β, wiedza dotycząca budowy i regulacji genu kodującego łańcuch α (*FCERIA*), nie znalazła odzwierciedlenia w badaniach nad zmiennością genetyczną *FCERIA* w chorobach o podłożu alergicznym.

### 7.2 Cele

Przeprowadzono badanie przesiewowe w kierunku mutacji genu *FCERIA* w jego „starych” (eksony 1–5, promotor proksymalny) i niedawno odkrytych (ekson 1A, ekson 2A, promotor dystalny) regionach, a następnie oznaczono częstości alleliczne wykrytych polimorfizmów. Dokonano także analizy genetycznej cech ilościowych (całkowitych stężeń IgE w surowicy, eozynofilii bezwzględnej) i jakościowych [obecność autoprzeciwciał przeciw FcεRI i(lub) IgE, nadwrażliwość na aspirynę].

### 7.3 Materiały i metody

Całkowite stężenie IgE w surowicy (w grupie chorych i w grupie kontrolnej) oraz eozynofilię bezwzględną (tylko w grupie chorych) oznaczono z zastosowaniem standardowych metod laboratoryjnych. U chorych z podejrzeniem nadwrażliwości na aspirynę wykonano doustną

próbę prowokacyjną z kwasem acetylosalicylowym. Obecność i klasyfikację autoprzeciwciał przeciw FcεRI i(lub) IgE zbadano za pomocą testu skórniego surowicy autologicznej (ASST) oraz testu uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych (BHR-Test) u odpowiednio 88 i 97 osób z grupy chorych (na astmę lub pokrzywkę).

Badanie przesiewowe w kierunku mutacji wykonano z zastosowaniem metody polimorfizmu konformacyjnego pojedynczego łańcucha DNA (SSCP) u 96 (ekson 1A, ekson 2A, promotor dystalny, eksony 1–5) lub 24 (promotor proksymalny) chorych.

Genotypowanie wykrytych polimorfizmów wykonano techniką polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) u 154 chorych (na astmę, pokrzywkę, przewlekły alergiczny nieżyt nosa lub zwykłą alergię pyłkową) i 154 dobranych pod względem płci i wieku osób z kontrolnej grupy populacyjnej, z wyjątkiem polimorfizmu zlokalizowanego w pobliżu eksonu 2A (*patrz dalej*), którego genotyp oznaczono u 99 chorych i tej samej liczby osób z grupy kontrolnej.

#### 7.4 Wyniki

W obszarze promotora proksymalnego potwierdzono obecność zarówno polimorfizmu –344 C>T, jak i –95 T>C u osób pochodzenia europejskiego (częstość allelu –344 T: 0,46 i 0,41; częstość allelu –95 C: 0,27 i 0,28; odpowiednio w grupie chorych i populacyjnej grupie kontrolnej). Eksony 1–5 okazały się konserwatywne w sekwencji – w SSCP stwierdzono jedynie 2 pojedyncze (1/96) zmienności zlokalizowane w regionach eksonów 1 i 3, które to nie były dalej badane. Wykryto obecność jednego rzadkiego polimorfizmu umiejscowionego w pobliżu końca 5' eksonu 2A (–12663 A>G) i 2 częstych polimorfizmów w obszarze eksonu 1A (–18674/–18675 delAA i –18483 A>C) (częstość allelu –12663 G: 0,015 i 0,02; częstość allelu delecyjnego –18674/–18675: 0,16 i 0,17; częstość



allelu -18483 C: 0,48 i 0,43; odpowiednio w grupie chorych i populacyjnej grupie kontrolnej). Badany region promotora dystalnego okazał się konserwatywny w sekwencji. Dystrybucje genotypowe każdego z 5 polimorfizmów były podobne w obu badanych grupach. Również częstości haplotypowe obliczone dla czterech częstych polimorfizmów (-18674/-18675 delAA, -18483 A>C, -344 C>T i -95 T>C) nie wykazywały różnic pomiędzy oboma grupami.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem autoprzeciwciał przeciw FcεRI i(lub) IgE czy nadwrażliwością na aspirynę a którymkolwiek z 5 badanych polimorfizmów.

Całkowite stężenia IgE w surowicy były wyższe u chorych homozygot -344 TT niż u chorych nosicieli allelu C (odpowiednio  $158,7 \pm 330,0$  IU/ml vs.  $100,0 \pm 215,9$  IU/ml;  $P = 0,008$ ). U chorych z genotypem -18483 CC obserwowano większe całkowite stężenia IgE w surowicy niż u chorych charakteryzujących się obecnością allelu A (odpowiednio  $156,9 \pm 329,9$  IU/ml vs.  $101,0 \pm 213,8$  IU/ml;  $P = 0,06$ ). Haplotypowa analiza kondycjonująca polimorfizmów -18674/-18675 delAA, -18483 A>C i -95 T>C skontrastowanych względem genotypów polimorfizmu -344 C>T potwierdziła zależność genotypu -344 TT i całkowitych stężeń IgE w surowicy (TT vs. CC:  $P = 0,002$ ; TT vs. CT:  $P < 0,001$ ). Nie obserwowano żadnych innych zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami a całkowitymi stężeniami IgE w surowicy lub eozynofilią bezwzględna zarówno w grupie chorych, jak i w populacyjnej grupie kontrolnej.

## 7.5 Wnioski

Potwierdzono obecność 2 częstych polimorfizmów (-344 C>T i -95 T>C) w regionie promotora prokyszmalnego genu *FCERIA* u osób pochodzenia europejskiego. Odkryto istnienie dwóch nowych, częstych polimorfizmów genu *FCERIA* w regionie eksonu 1A (-18674/-18675 delAA, -18483

A>C), a także jednej rzadkiej mutacji w pobliżu eksonu 2A (-12663 A>G). Stwierdzono zależność pomiędzy polimorfizmem -344 C>T genu *FCERIA* a całkowitymi stężeniami IgE w surowicy u osób z chorobami o podłożu alergicznym.

## 8 Summary

### 8.1 Background

Multivalent allergens interaction with high-affinity IgE receptor (FcεRI)-IgE complexes located on basophils and mastocytes plays a crucial role in the development of type I allergic reaction. FcεRI present on those cell types is composed of 1 α, 1 β and 2 γ subunits. The γ-chain gene was shown to be conservative in sequence and the association between genetic variability of the gene encoding for FcεRI β-chain and allergic disorders has been very extensively studied. Studies on the function and structure of FcεRI α-subunit gene (*FCERIA*) have not been accompanied by similar progress in its genetic variability.

### 8.2 Objectives

A mutational screening was undertaken on “older” (exons 1–5, proximal promoter) and recently found (exon 1A, exon 2A, distal promoter) *FCERIA* gene regions with subsequent genotyping for common polymorphisms. Association of *FCERIA* gene polymorphisms with total serum IgE levels, eosinophil count, autoantibodies against FcεRI and/or IgE, and aspirin sensitivity was also studied.

### 8.3 Materials and Methods

Total serum IgE levels (in patients and controls) and blood eosinophil count (only in patients) were determined with usual laboratory methods. In patients suspected of aspirin hypersensitivity, oral aspirin challenge test was performed. The presence and classification for autoantibodies against FcεRI and/or IgE were determined using autologous serum skin test (ASST) and basophil histamine release test (BHR-Test) in the subgroup of 88 and 97 patients (with either asthma or urticaria), respectively.

Mutational screening by single-stranded conformational polymorphism (SSCP) with eventual subsequent sequencing was performed in 96 (exon 1A, exon 2A, distal promoter, exons 1–5) or in 24 (proximal promoter) patients.

Genotyping was conducted by restriction-length fragment polymorphism (RFLP) in 154 patients (with asthma, urticaria, chronic allergic rhinitis or simple pollinosis) and 154 age- and sex-matched population controls, except for the polymorphism located near exon 2A (*see further*) genotyped in 99 patients and the same number of population controls.

#### 8.4 Results

Both –344 C>T and –95 T>C polymorphisms were present at high frequency in the region of proximal promoter in Caucasians (–344 T allele frequency, 0.46 and 0.41; –95 C allele frequency, 0.27 and 0.28; patients and controls, respectively). Exons 1–5 turned out to be conservative in sequence and SSCP revealed only 2 single (1/96) variations in the regions of exon 1 and 3 which were not further studied. A one rare single nucleotide polymorphism located near 5' ending of exon 2A (–12663 A>G) and 2 frequent polymorphisms were found in the region of exon 1A. These were –18674/–18675 delAA and –18483 A>C (–12663 G allele frequency, 0.015 and 0.02; –18674/–18675 deletion allele frequency, 0.16 and 0.17; –18483 C allele frequency, 0.48 and 0.43) in patients and controls, respectively. The distal promoter was found to be conservative in sequence. None of the 5 polymorphisms showed any difference in genotype distributions between the groups as well as haplotype frequencies calculated for 4 frequent polymorphisms (–18674/–18675 delAA, –18483 A>C, –344 C>T and –95 T>C).

The presence of autoantibodies against FcεRI and/or IgE and aspirin hypersensitivity showed no association with any of 5 polymorphisms studied.

The -344 TT homozygotic patients had higher total serum IgE levels than those carrying the C allele ( $158.7 \pm 330.0$  IU/mL vs.  $100.0 \pm 215.9$  IU/mL, respectively;  $P = 0.008$ ). Patients with -18483 CC genotype showed a tendency toward higher total serum IgE concentrations than carriers of the A allele ( $156.9 \pm 329.9$  IU/mL vs.  $101.0 \pm 213.8$  IU/mL, respectively;  $P = 0.06$ ). Analysis of the haplotypes, contrasting -344 C>T genotypes in a conditional test of association against the other three frequent polymorphisms (-18674/-18675 delAA, -18483 A>C and -95 T>C) supported the role of -344 TT homozygosity status in determining serum IgE levels (TT vs. CC,  $P = 0.002$ ; TT vs. CT,  $P < 0.001$ ). No other associations between any of the studied polymorphisms and total serum IgE levels or eosinophil count were observed in patients as well as in controls.

## 8.5 Conclusions

The presence of 2 frequent *FCER1A* gene polymorphisms (-344 C>T and -95 T>C) in the proximal promoter region in Caucasians was confirmed. Two novel frequent *FCER1A* gene polymorphisms in the region of exon 1A (-18674/-18675 delAA, -18483 A>C) and also one rare mutation near exon 2A (-12663 A>G) were discovered. The -344 C>T *FCER1A* gene polymorphism was found to be associated with total serum IgE levels in allergic subjects.

## 9 Zestawienie skrótów

FcεRI – receptor IgE o wysokim powinowactwie

FcεRII – receptor IgE o niskim powinowactwie

FcεRIα – łańcuch (podjednostka) α FcεRI

FcεRIβ – łańcuch (podjednostka) β FcεRI

FcεRIγ – łańcuch (podjednostka) γ FcεRI

ITAM – białkowa domena aktywująca się pod wpływem kinazy tyrozynowej

*FCERIA* – gen kodujący FcεRIα

*FCERIB* – gen kodujący FcεRIβ

*FCERIG* – gen kodujący FcεRIγ

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

COX-1 – cyklooksygenaza-1

COX-2 – cyklooksygenaza-2

PGD<sub>2</sub> – prostaglandyna D<sub>2</sub>

PGE<sub>2</sub> – prostaglandyna E<sub>2</sub>

5-LO – 5-lipooksygenaza

FLAP – białko aktywujące 5-lipooksygenazę

Cys-LT<sub>1</sub>, Cys-LT<sub>2</sub> – receptory leukotrienów cysteinylowych typu 1 i 2

LTE<sub>4</sub> – leukotrien E<sub>4</sub>

ANCA – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów

ANA – przeciwciała przeciwjądrowe

SSCP – polimorfizm konformacyjny pojedynczego łańcucha DNA

EDTA – wersenian disodowy

RPM – obroty na minutę

PCR – polimerazowa reakcja łańcuchowa

RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

APS – nadsiarczan amonu

ASST – test skórny surowicy autologicznej

BHR-Test – test uwalniania histaminy z granulocytów zasadochłonnych

SEM – standardowy błąd średniej

IQR – rozstęp międzykwartyłowy

## 10 Piśmiennictwo

1. Kehry MR, Yamashita LC. Low-affinity IgE receptor (CD23) function on mouse B cells: role in IgE-dependent antigen focusing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;**86**:7556–60.
2. Hibbert RG, Teriete P, Grundy GJ, Beavil RL, Reljic R, Holers VM, Hannan JP, Sutton BJ, Gould HJ, McDonnell JM. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J Exp Med* 2005;**202**:751–60.
3. Bruhns P, Fremont S, Daeron M. Regulation of allergy by Fc receptors. *Curr Opin Immunol* 2005;**17**:662–9.
4. Bajorath J, Aruffo A. Structure-based modeling of the ligand binding domain of the human cell surface receptor CD23 and comparison of two independently derived molecular models. *Protein Sci* 1996;**5**:240–7.
5. Kilmon MA, Ghirlando R, Strub MP, Beavil RL, Gould HJ, Conrad DH. Regulation of IgE production requires oligomerization of CD23. *J Immunol* 2001;**167**:39–45.
6. Kelly AE, Chen BH, Woodward EC, Conrad DH. Production of a chimeric form of CD23 that is oligomeric and blocks IgE binding to the FcεRI. *J Immunol* 1998;**161**:6696–704.
7. Rosenwasser LJ, Meng J. Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;**29**:61–72.
8. MacGlashan D Jr. IgE and FcεRI regulation. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;**29**:49–60.
9. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:931–72.
10. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. Expression of high-affinity IgE receptors (FcεRI) on peripheral blood basophils, monocytes, and

eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 1997;**99**:699–706.

11. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Wolff-Winiski B, Jouvin MH, Kilgus O, Kinet JP, Stingl G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* 1994;**179**:745–50.

12. Saini SS, Richardson JJ, Wofsy C, Lavens-Phillips S, Bochner BS, Macglashan DW Jr. Expression and modulation of FcεRIα and FcεRIβ in human blood basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**107**:832–41.

13. Foster B, Metcalfe DD, Prussin C. Human dendritic cell 1 and dendritic cell 2 subsets express FcεRI: correlation with serum IgE and allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**112**:1132–8.

14. Novak N, Allam JP, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, Kochan J, Bieber T. Characterization of FcεRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:364–70.

15. Maurer D, Fiebiger S, Ebner C, Reininger B, Fischer GF, Wichlas S, Jouvin MH, Schmitt-Egenolf M, Kraft D, Kinet JP, Stingl G. Peripheral blood dendritic cells express FcεRI as a complex composed of FcεRIα- and FcεRIγ-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* 1996;**157**:607–16.

16. Thompson HL, Metcalfe DD, Kinet JP. Early expression of high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI) during differentiation of mouse mast cells and human basophils. *J Clin Invest* 1990;**85**:1227–33.

17. Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 1989;**337**:187–9.

18. Kubota T, Mukai K, Minegishi Y, Karasuyama H. Different stabilities of the structurally related receptors for IgE and IgG on the cell surface are



- determined by length of the stalk region in their  $\alpha$ -chains. *J Immunol* 2006;**176**:7008–14
19. Garman SC, Kinet JP, Jardetzky TS. Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell* 1998;**95**:951–61.
  20. Garman SC, Kinet JP, Jardetzky TS. The crystal structure of the human high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ ). *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:973–6.
  21. Rigby LJ, Epa VC, Mackay GA, Hulett MD, Sutton BJ, Gould HJ, Hogarth PM. Domain one of the high affinity IgE receptor, Fc $\epsilon$ RI, regulates binding to IgE through its interface with domain two. *J Biol Chem* 2000;**275**:9664–72.
  22. Wurzburg BA, Jardetzky TS. Structural insights into the interactions between human IgE and its high affinity receptor Fc $\epsilon$ RI. *Mol Immunol* 2002;**38**:1063–72.
  23. Garman SC, Sechi S, Kinet JP, Jardetzky TS. The analysis of the human high affinity IgE receptor Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  from multiple crystal forms. *J Mol Biol* 2001;**311**:1049–62.
  24. Mallamaci MA, Chizzonite R, Griffin M, Nettleton M, Hakimi J, Tsien WH, Kochan JP. Identification of sites on the human Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  subunit which are involved in binding human and rat IgE. *J Biol Chem* 1993;**268**:22076–83.
  25. Hulett MD, Brinkworth RI, McKenzie IF, Hogarth PM. Fine structure analysis of interaction of Fc $\epsilon$ RI with IgE. *J Biol Chem* 1999;**274**:13345–52.
  26. Mackay GA, Hulett MD, Cook JP, Trist HM, Henry AJ, McDonnell JM, Beavil AJ, Beavil RL, Sutton BJ, Hogarth PM, Gould HJ. Mutagenesis within human Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  differentially affects human and murine IgE binding. *J Immunol* 2002;**168**:1787–95.
  27. Donnadieu E, Jouvin MH, Kinet JP. A second amplifier function for the allergy-associated Fc $\epsilon$ RI- $\beta$  subunit. *Immunity* 2000;**12**:515–23.

28. Furumoto Y, Nunomura S, Terada T, Rivera J, Ra C. The FcεRIβ immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and IκB kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. *J Biol Chem* 2004;**279**:49177–87.
29. Shiue L, Green J, Green OM, Karas JL, Morgenstern JP, Ram MK, Taylor MK, Zoller MJ, Zydowsky LD, Bolen JB, Brugge JS. Interaction of p72<sup>syk</sup> with the γ and β subunits of the high-affinity receptor for immunoglobulin E, FcεRI. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:272–81.
30. Wilson BS, Kapp N, Lee RJ, Pfeiffer JR, Martinez AM, Platt Y, Letourneur F, Oliver JM. Distinct functions of the FcεRI γ and β subunits in the control of FcεRI-mediated tyrosine kinase activation and signaling responses in RBL-2H3 mast cells. *J Biol Chem* 1995;**270**:4013–22.
31. Alber G, Miller L, Jelsema CL, Varin-Blank N, Metzger H. Structure-function relationships in the mast cell high affinity receptor for IgE. Role of the cytoplasmic domains and of the beta subunit. *J Biol Chem* 1991;**266**:22613–20.
32. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP. The FcεRIβ subunit functions as an amplifier of FcεRIγ-mediated cell activation signals. *Cell* 1996;**85**:985–95.
33. Sakurai D, Yamasaki S, Arase K, Park SY, Arase H, Konno A, Saito T. FcεRIγ-ITAM is differentially required for mast cell function in vivo. *J Immunol* 2004;**172**:2374–81.
34. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature* 1999;**402(Suppl)**:B24–30.
35. Metzger H, Chen H, Goldstein B, Haleem-Smith H, Inman J, Peirce M, Torigoe C, Vonakis B, Wofsy C. Signal transduction by FcεRI: Analysis of the early molecular events. *Allergol Int* 1999;**48**:161–9.

36. Rivera J. Molecular adapters in FcεRI signaling and the allergic response. *Curr Opin Immunol* 2002;**14**:688–93.
37. Wilson BS, Pfeiffer JR, Oliver JM. FcεRI signaling observed from the inside of the mast cell membrane. *Mol Immunol* 2002;**38**:1259–68.
38. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* 2002;**3**:741–8.
39. Urtz N, Olivera A, Bofill-Cardona E, Csonga R, Billich A, Mechtcheriakova D, Bornancin F, Woisetschlager M, Rivera J, Baumruker T. Early activation of sphingosine kinase in mast cells and recruitment to FcεRI are mediated by its interaction with Lyn kinase. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:8765–77.
40. Faeder JR, Hlavacek WS, Reischl I, Blinov ML, Metzger H, Redondo A, Wofsy C, Goldstein B. Investigation of early events in FcεRI-mediated signaling using a detailed mathematical model. *J Immunol* 2003;**170**:3769–81.
41. Kimura T, Kihara H, Bhattacharyya S, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP. Downstream signaling molecules bind to different phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) peptides of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem* 1996;**271**:27962–8.
42. Kihara H, Siraganian RP. Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor. *J Biol Chem* 1994;**269**:22427–32.
43. Lynch NR, Goldblatt J, Le Souef PN. Parasite infections and the risk of asthma and atopy. *Thorax* 1999;**54**:659–60.
44. Winter WE, Hardt NS, Fuhrman S. Immunoglobulin E: importance in parasitic infections and hypersensitivity responses. *Arch Pathol Lab Med* 2000;**124**:1382–5.

45. Maurer D, Ebner C, Reininger B, Fiebiger E, Kraft D, Kinet JP, Stingl G. The high affinity IgE receptor (FcεRI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol* 1995;**154**:6285–90.
46. Shimizu A, Tepler I, Benfey PN, Berenstein EH, Siraganian RP, Leder P. Human and rat mast cell high-affinity immunoglobulin E receptors: characterization of putative α-chain gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:1907–11.
47. Kochan J, Pettine LF, Hakimi J, Kishi K, Kinet JP. Isolation of the gene coding for the alpha subunit of the human high affinity IgE receptor. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**:3584.
48. Tepler I, Shimizu A, Leder P. The gene for the rat mast cell high affinity IgE receptor α chain. Structure and alternative mRNA splicing patterns. *J Biol Chem* 1989;**264**:5912–5.
49. Pang J, Taylor GR, Munroe DG, Ishaque A, Fung-Leung WP, Lau CY, Liu FT, Zhou L. Characterization of the gene for the human high affinity IgE receptor (FcεRI) α-chain. *J Immunol* 1993;**151**:6166–74.
50. Nishiyama C, Hasegawa M, Nishiyama M, Takahashi K, Yokota T, Okumura K, Ra C. Cloning of full-length genomic DNA encoding human FcεRI α-chain and its transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**284**:1056–64
51. Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, Akizawa Y, Takahashi K, Ito T, Furukawa S, Ra C, Okumura K, Ogawa H. Regulation of the human FcεRI α-chain distal promoter. *J Immunol* 2003;**170**:3732–8.
52. Nishiyama C. Molecular mechanism of allergy-related gene regulation and hematopoietic cell development by transcription factors. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;**70**:1–9.
53. Nishiyama C, Yokota T, Okumura K, Ra C. The transcription factors Elf-1 and GATA-1 bind to cell-specific enhancer elements of human high-affinity IgE receptor α-chain gene. *J Immunol* 1999;**163**:623–30.

54. Takahashi K, Nishiyama C, Nishiyama M, Okumura K, Ra C, Ohtake Y, Yokota T. A complex composed of USF1 and USF2 activates the human FcεRI α-chain expression via a CAGCTG element in the first intron. *Eur J Immunol* 2001;**31**:590–9.
55. Takahashi K, Nishiyama C, Ra C. Transcriptional regulation of the human high affinity IgE receptor α-chain gene. *Mol Immunol* 2002;**38**:1193–9.
56. Nishiyama C, Hasegawa M, Nishiyama M, Takahashi K, Akizawa Y, Yokota T, Okumura K, Ogawa H, Ra C. Regulation of human FcεRI α-chain gene expression by multiple transcription factors. *J Immunol* 2002;**168**:4546–52.
57. Nishiyama C, Ito T, Nishiyama M, Masaki S, Maeda K, Nakano N, Ng W, Fukuyama K, Yamamoto M, Okumura K, Ogawa H. GATA-1 is required for expression of FcεRI on mast cells: analysis of mast cells derived from GATA-1 knockdown mouse bone marrow. *Int Immunol* 2005;**17**:847–56.
58. Akizawa Y, Nishiyama C, Hasegawa M, Maeda K, Nakahata T, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Regulation of human FcεRI β chain gene expression by Oct-1. *Int Immunol* 2003;**15**:549–56.
59. Takahashi K, Nishiyama C, Hasegawa M, Akizawa Y, Ra C. Regulation of the human high affinity IgE receptor β-chain gene expression via an intronic element. *J Immunol* 2003;**171**:2478–84.
60. Donnadieu E, Jouvin MH, Rana S, Moffatt MF, Mockford EH, Cookson WO, Kinet JP. Competing functions encoded in the allergy-associated FcεRIβ gene. *Immunity* 2003;**18**:665–74.
61. Maeda K, Nishiyama C, Tokura T, Akizawa Y, Nishiyama M, Ogawa H, Okumura K, Ra C. Regulation of cell type-specific mouse FcεRI β-chain gene expression by GATA-1 via four GATA motifs in the promoter. *J Immunol* 2003;**170**:334–40.

62. Nishiyama C, Akizawa Y, Nishiyama M, Tokura T, Kawada H, Mitsuishi K, Hasegawa M, Ito T, Nakano N, Okamoto A, Takagi A, Yagita H, Okumura K, Ogawa H. Polymorphisms in the FcεRIβ promoter region affecting transcription activity: a possible promoter-dependent mechanism for association between FcεRIβ and atopy. *J Immunol* 2004;**173**:6458–64.
63. Wu J, Edberg JC, Gibson AW, Kimberly RP. Conservation of FcεRI gamma chain coding region in normals and in SLE patients. *Lupus* 2002;**11**:42–5.
64. Shikanai T, Silverman ES, Morse BW, Lilly CM, Inoue H, Drazen JM. Sequence variants in the FcεRI alpha chain gene. *J Appl Physiol* 2002;**93**:37–41.
65. Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, Akizawa Y, Mitsuishi K, Ito T, Kawada H, Furukawa S, Ra C, Okumura K, Ogawa H. A novel -66T/C polymorphism in FcεRI α-chain promoter affecting the transcription activity: possible relationship to allergic diseases. *J Immunol* 2003;**171**:1927–33
66. Bae JS, Kim SH, Ye YM, Yoon HJ, Suh CH, Nahm DH, Park HS. Significant association of FcεRIα promoter polymorphisms with aspirin-intolerant chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* (w druku).
67. Borish L. Genetics of allergy and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;**82**:413–24.
68. Cookson W. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunol Rev* 2002;**190**:195–206.
69. Otsu A, Shirakawa T. Genetic and environmental factors of atopy. *Allergol Int* 2002;**51**:213–9.
70. Hopkin J, Cookson W. Genetic variation in the beta subunit of the high affinity IgE receptor and atopy and asthma. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:855–7.

71. Cookson WO, Sharp PA, Faux JA, Hopkin JM. Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1989;**1**:1292–5.
72. Young RP, Sharp PA, Lynch JR, Faux JA, Lathrop GM, Cookson WO, Hopkin JM. Confirmation of genetic linkage between atopic IgE responses and chromosome 11q13. *J Med Genet* 1992;**29**:236–8.
73. Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, Young RP, Nakamura Y, Lathrop GM, Cookson WO, Hopkin JM. Localisation of atopy and  $\beta$  subunit of high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993;**341**:332–4.
74. van Herwerden L, Harrap SB, Wong ZY, Abramson MJ, Kutin JJ, Forbes AB, Raven J, Lanigan A, Walters EH. Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy. *Lancet* 1995;**346**:1262–5.
75. Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WO, Hopkin JM. Association between atopy and variants of the  $\beta$  subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 1994;**7**:125–9.
76. Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K, Hopkin J. Association between atopic asthma and a coding variant of Fc $\epsilon$ RI $\beta$  in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 1996;**5**:1129–30.
77. Hill MR, Cookson WO. 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* 1996;**5**:959–62.
78. Palmer LJ, Pare PD, Faux JA, Moffatt MF, Daniels SE, LeSouef PN, Bremner PR, Mockford E, Gracey M, Spargo R, Musk AW, Cookson WO. Fc $\epsilon$ R1- $\beta$  polymorphism and total serum IgE levels in endemically parasitized Australian Aborigines. *Am J Hum Genet* 1997;**61**:182–8.

79. Green SL, Gaillard MC, Song E, Dewar JB, Halkas A. Polymorphisms of the beta chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (FcεRI-β) in South African black and white asthmatic and nonasthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;**158**:1487–92.
80. Cox HE, Moffatt MF, Faux JA, Walley AJ, Coleman R, Trembath RC, Cookson WO, Harper JI. Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Br J Dermatol* 1998;**138**:182–7.
81. Holla L, Kunrova V, Tschoplova S, Schuller M, Stelcl M, Vasku A. Polymorphism of the beta chain of the high affinity immunoglobulin E receptor (FcεRI-β) in South African black and white asthmatic and nonasthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;**160**:756–7.
82. Dickson PW, Wong ZY, Harrap SB, Abramson MJ, Walters EH. Mutational analysis of the high affinity immunoglobulin E receptor β subunit gene in asthma. *Thorax* 1999;**54**:409–12.
83. Laprise C, Boulet LP, Morissette J, Winstall E, Raymond V. Evidence for association and linkage between atopy, airway hyper-responsiveness, and the β subunit Glu237Gly variant of the high-affinity receptor for immunoglobulin E in the French-Canadian population. *Immunogenetics* 2000;**51**:695–702.
84. Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y. A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**:906–9.
85. Donnadieu E, Cookson WO, Jouvin MH, Kinet JP. Allergy-associated polymorphisms of the FcεRIβ subunit do not impact its two amplification functions. *J Immunol* 2000;**165**:3917–22.
86. Nagata H, Mutoh H, Kumahara K, Arimoto Y, Tomemori T, Sakurai D, Arase K, Ohno K, Yamakoshi T, Nakano K, Okawa T, Numata T, Konno



- A. Association between nasal allergy and a coding variant of the FcεRIβ gene Glu237Gly in a Japanese population. *Hum Genet* 2001;**109**:262–6.
87. Traherne JA, Hill MR, Hysi P, D'Amato M, Broxholme J, Mott R, Moffatt MF, Cookson WO. LD mapping of maternally and non-maternally derived alleles and atopy in FcεRI-β. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2577–85.
88. Cui T, Wang L, Wu J, Xie J. The association of FcεR I β with allergic asthma in a Chinese population. *Chin Med J* 2003;**116**:1875–8.
89. Zhang X, Zhang W, Qiu D, Sandford A, Tan WC. The E237G polymorphism of the high-affinity IgE receptor β chain and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;**93**:499–503.
90. Rigoli L, Di Bella C, Procopio V, Barberio G, Barberi I, Caminiti L, La Grutta S, Briuglia S, Salpietro CD, Pajno GB. Molecular analysis of sequence variants in the Fcε receptor I β gene and IL-4 gene promoter in Italian atopic families. *Allergy* 2004;**59**:213–8.
91. Kuster H, von Manstein S, Ruocchio-Wiglinghaus S, von Brunn A, Reinhardt D. Mutations in the high-affinity IgE receptor β-chain are not associated with nonresponder status. *Allergy* 2005;**60**:1040–5.
92. Choi JH, Kim SH, Suh CH, Nahm DH, Park HS. Polymorphisms of high-affinity IgE receptor and histamine-related genes in patients with ASA-induced urticaria/angioedema. *J Korean Med Sci* 2005;**20**:367–72.
93. Hizawa N, Maeda Y, Konno S, Fukui Y, Takahashi D, Nishimura M. Genetic polymorphisms at *FCER1B* and *PAI-1* and asthma susceptibility. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:872–6.
94. Kim SH, Bae JS, Holloway JW *et al.* A polymorphism of MS4A2 (–109T > C) encoding the β-chain of the high-affinity immunoglobulin E receptor (FcεRIβ) is associated with a susceptibility to aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:877–83.
95. MacGlashan D Jr, Lichtenstein LM, McKenzie-White J, Chichester K, Henry AJ, Sutton BJ, Gould HJ. Upregulation of FcεRI on human

- basophils by IgE antibody is mediated by interaction of IgE with FcεRI. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:492–8.
96. Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Ra C, Costa JJ, Galli SJ. IgE enhances Fcε receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fcε receptor I expression and mediator release. *J Immunol* 1999;**162**:5455–65.
97. Gomez G, Ramirez CD, Rivera J, Patel M, Norozian F, Wright HV, Kashyap MV, Barnstein BO, Fischer-Stenger K, Schwartz LB, Kepley CL, Ryan JJ. TGF-β1 inhibits mast cell FcεRI expression. *J Immunol* 2005;**174**:5987–93.
98. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2002 Update). [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com)
99. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2005 Revision). [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)
100. Niżankowska-Mogilnicka E, Bochenek G. Astma. Choroby wewnętrzne (pod redakcją Prof. dr hab. Andrzeja Szczeklika), tom I, 530–541. Medycyna Praktyczna, Kraków 2005.
101. Dobek R, Małolepszy J. Patogeneza astmy. Medycyna Praktyczna, Kraków 2001–2004. <http://www.mp.pl>
102. Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hebert J, Bousquet J, Beeh KM, Ramos S, Canonica GW, Hedgercock S, Fox H, Blogg M, Surrey K. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy* 2005;**60**:309–16.
103. Bousquet J, Cabrera P, Berkman N, Buhl R, Holgate S, Wenzel S, Fox H, Hedgercock S, Blogg M, Cioppa GD. The effect of treatment with omalizumab, an anti-IgE antibody, on asthma exacerbations and emergency

- medical visits in patients with severe persistent asthma. *Allergy* 2005;**60**:302–8.
104. Chiang DT, Clark J, Casale TB. Omalizumab in asthma: approval and postapproval experience. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;**29**:3–16.
105. D'Amato G. Role of anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of bronchial asthma and allergic respiratory diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;**533**:302–7.
106. Bousquet J, Wenzel S, Holgate S, Lumry W, Freeman P, Fox H. Predicting response to omalizumab, an anti-IgE antibody, in patients with allergic asthma. *Chest* 2004;**125**:1378–86.
107. Brunetti L, Francavilla R, Miniello VL, Platzer MH, Rizzi D, Lospalluti ML, Poulsen LK, Armenio L, Skov PS. High prevalence of autoimmune urticaria in children with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:922–7.
108. Sabroe RA, Grattan CE, Francis DM, Barr RM, Kobza Black A, Greaves MW. The autologous serum skin test: a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 1999;**140**:446–52.
109. Kaplan AP. Clinical practice. Chronic urticaria and angioedema. *N Engl J Med* 2002;**346**:175–9.
110. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**108**(Suppl 5):S147–S334.
111. Bauchau V, Durham SR. Epidemiological characterization of the intermittent and persistent types of allergic rhinitis. *Allergy* 2005;**60**:350–3.
112. Bauchau V, Durham SR. Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *Eur Respir J* 2004;**24**:758–64.

113. Storms WW. Rethinking our approach to allergic rhinitis management. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;**88(4 Suppl 1)**:30–5.
114. Kowalski ML. Klasyfikacja chorób alergicznych. Choroby wewnętrzne (pod redakcją Prof. dr hab. Andrzeja Szczeklika), tom II, 1813–1816. Medycyna Praktyczna, Kraków 2006.
115. Rogala B, Świerczyńska M. Alergiczny nieżyt nosa. Choroby wewnętrzne (pod redakcją Prof. dr hab. Andrzeja Szczeklika), tom II, 1831–1836. Medycyna Praktyczna, Kraków 2006.
116. Szczeklik A, Sanak M. The broken balance in aspirin hypersensitivity. *Eur J Pharmacol* 2006;**533**:145–55.
117. Berkes EA. Anaphylactic and anaphylactoid reactions to aspirin and other NSAIDs. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;**24**:137–48.
118. Woessner KM. Crossreacting drugs and chemicals. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;**24**:149–58.
119. Kowalski ML, Ptasinska A, Jedrzejczak M, Bienkiewicz B, Cieslak M, Grzegorzczak J, Pawliczak R, Dubuske L. Aspirin-triggered 15-HETE generation in peripheral blood leukocytes is a specific and sensitive Aspirin-Sensitive Patients Identification Test (ASPITest). *Allergy* 2005;**60**:1139–45.
120. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:5–13.
121. Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**111**:913–21.
122. Stevenson DD, Szczeklik A. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**:773–86.
123. Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M. Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J* 2000;**16**:432–6.

124. Kowalski ML, Lewandowska-Polak A, Wozniak J, Ptasinska A, Jankowski A, Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M, Pawliczak R. Association of stem cell factor expression in nasal polyp epithelial cells with aspirin sensitivity and asthma. *Allergy* 2005;**60**:631–7.
125. Fahrenholz JM. Natural history and clinical features of aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;**24**:113–24.
126. Kowalski ML, Ptasinska A, Bienkiewicz B, Pawliczak R, DuBuske L. Differential effects of aspirin and misoprostol on 15-hydroxyeicosatetraenoic acid generation by leukocytes from aspirin-sensitive asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**112**:505–12.
127. Szczeklik A, Nizankowska E, Mastalerz L, Szabo Z. Analgesics and asthma. *Am J Ther* 2002;**9**:233–43.
128. Stevenson DD, Zuraw BL. Pathogenesis of aspirin-exacerbated respiratory disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;**24**:169–88.
129. Bochenek G, Banska K, Szabo Z, Nizankowska E, Szczeklik A. Diagnosis, prevention and treatment of aspirin-induced asthma and rhinitis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;**1**:1–11.
130. Asero R, Tedeschi A, Lorini M. Autoreactivity is highly prevalent in patients with multiple intolerances to NSAIDs. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;**88**:468–7.
131. Grattan CE. Aspirin sensitivity and urticaria. *Clin Exp Dermatol* 2003;**28**:123–7.
132. Sanchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F. Cutaneous reactions to aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;**24**:125–36.
133. Mastalerz L, Setkowicz M, Sanak M, Szczeklik A. Hypersensitivity to aspirin: common eicosanoid alterations in urticaria and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**113**:771–5.

134. Sanak M, Szczeklik A. Genetics of aspirin induced asthma. *Thorax* 2000;**55**(Suppl 2):S45–7.
135. Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G–765C in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:248–53.
136. Sanak M, Szczeklik W, Szczeklik A. Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandins production in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;**116**:221–3.
137. Sanak M, Simon HU, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet* 1997;**350**:1599–600.
138. Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;**23**:290–6.
139. Torres-Galvan MJ, Ortega N, Sanchez-Garcia F, Blanco C, Carrillo T, Quiralte J. LTC4-synthase A-444C polymorphism: lack of association with NSAID-induced isolated periorbital angioedema in a Spanish population. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;**87**:506–10.
140. Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D. Anti-FcεRIα autoantibodies in autoimmune-mediated disorders. Identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest* 1998;**101**:243–51.
141. Asero R, Tedeschi A, Lorini M, Salimbeni R, Zanoletti T, Miadonna A. Chronic urticaria: novel clinical and serological aspects. *Clin Exp Allergy* 2001;**31**:1105–10.
142. Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM, Maurer D, Seed PT, Grattan CE, Black AK, Stingl G, Greaves MW, Barr RM. Classification of anti-FcεRI and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 2002;**110**:492–9.

143. Platzer MH, Grattan CE, Poulsen LK, Skov PS. Validation of basophil histamine release against the autologous serum skin test and outcome of serum-induced basophil histamine release studies in a large population of chronic urticaria patients. *Allergy* 2005;**60**:1152–6.
144. Du Toit G, Prescott R, Lawrence P, Johar A, Brown G, Weinberg EG, Motala C, Potter PC. Autoantibodies to the high-affinity IgE receptor in children with chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;**96**:341–4.
145. Hayashi S, Suto H, Wada N, Ogawa H, Okumura K, Ra C. Detection of anti-IgE and anti-FcεRI α chain auto-antibodies in patients with atopic dermatitis. *Allergol Int* 2000;**49**:47–54.
146. Szczeklik A, Nizankowska E, Serafin A, Dyczek A, Duplaga M, Musial J. Autoimmune phenomena in bronchial asthma with special reference to aspirin intolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;**152**:1753–6.
147. Szczeklik A, Musial J, Pulka G. Autoimmune vasculitis and aortic stenosis in aspirin-induced asthma (AIA). *Allergy* 1997;**52**:352–4.
148. Nizankowska E, Bestynska-Krypel A, Cmiel A, Szczeklik A. Oral and bronchial provocation tests with aspirin for diagnosis of aspirin-induced asthma. *Eur Respir J* 2000;**15**:863–9.
149. Zembowicz A, Mastalerz L, Setkowicz M, Radziszewski W, Szczeklik A. Safety of cyclooxygenase 2 inhibitors and increased leukotriene synthesis in chronic idiopathic urticaria with sensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arch Dermatol* 2003;**139**:1577–82.
150. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005;**1**:47–50.

151. Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 2003;**25**:115–21.
152. Kupczyk M, Kuprys I, Gorski P, Kuna P. Aspirin intolerance and allergy to house dust mites: important factors associated with development of severe asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;**92**:453–8.
153. Sanchez-Borges M, Capriles A, Caballero-Fonseca F. Increased prevalence of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity in atopic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;**97**:557.
154. Takahashi K, Ra C. The high affinity IgE receptor (FcεRI) as a target for anti-allergic agents. *Allergol Int* 2005;**54**: 1–5.
155. Beck LA, Marcotte GV, MacGlashan D, Togias A, Saini S. Omalizumab-induced reductions in mast cell FcεRI expression and function. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:527–30.
156. Prussin C, Griffith DT, Boesel KM, Lin H, Foster B, Casale TB. Omalizumab treatment downregulates dendritic cell FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**112**:1147–54.
157. Lin H, Boesel KM, Griffith DT, Prussin C, Foster B, Romero FA, Townley R, Casale TB. Omalizumab rapidly decreases nasal allergic response and FcεRI on basophils. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**113**:297–302.
158. Cheng YX, Foster B, Holland SM, Klion AD, Nutman TB, Casale TB, Metcalfe DD, Prussin C. CD2 identifies a monocyte subpopulation with immunoglobulin E-dependent, high-level expression of FcεRI. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:1436–45.
159. MacGlashan D Jr, McKenzie-White J, Chichester K, Bochner BS, Davis FM, Schroeder JT, Lichtenstein LM. In vitro regulation of FcεRIα expression on human basophils by IgE antibody. *Blood* 1998;**91**:1633–43.
160. MacGlashan DW Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, Sterbinsky SA, Hamilton RG, Lichtenstein LM.



Down-regulation of FcεRI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J Immunol* 1997;**158**:1438–45.

161. Hanf G, Brachmann I, Kleine-Tebbe J, Seybold J, Kunkel G, Suttorp N, Noga O. Omalizumab decreased IgE-release and induced changes in cellular immunity in patients with allergic asthma. *Allergy* 2006;**61**:1141–4.

162. Noga O, Hanf G, Brachmann I, Klucken AC, Kleine-Tebbe J, Rosseau S, Kunkel G, Suttorp N, Seybold J. Effect of omalizumab treatment on peripheral eosinophil and T-lymphocyte function in patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**:1493–9.