



Zastosowanie mikromacierzy DNA w badaniach alergii

Wiesława M. Woronowicz, Michał M. Sikorski

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Application of DNA microarray technology in studies of human allergy

Summary

Allergy is a complex genetic disorder contributing numerous genes, especially involved in Th2 immunity and IgE synthesis. Additional, environmental factors like: allergens exposure, cigarette smoke, pollutants, infectious agents and many others, have influence in allergy development. With DNA microarray technology it is possible to search for genes expression profiles of all interacting genes in parallel and learn more about the mechanism of allergy. These research include genes expression profiling of different model organisms (human, mice, monkey) and cell cultures.

Key words:

allergy, atopic asthma, microarrays.

1. Wstęp

Alergia i astma atopowa zaliczane są do chorób o podłożu genetycznym. Związek pomiędzy genami a rozwojem chorób alergicznych zaobserwowano już ok. 100 lat temu na podstawie obserwacji rodzin, w których alergię pojawiały się częściej niż u innych (1). Dodatkowym elementem (poza czynnikiem genetycznym) wpływającym na rozwój chorób alergicznych są czynniki środowiskowe takie jak: ekspozycja na alergeny, dym papierosowy, zanieczyszczenia chemiczne, niska waga urodzeniowa, infekcje i wiele innych, które wpływają na ekspresję genów, przede wszystkim na szlaku produkcji immunoglobulin (przeciwciał) klasy IgE. Pierwsze badania nad wpływem środowiska na ekspresję genów obejmowały analizę bliźniaków. W badaniach

Adres do korespondencji

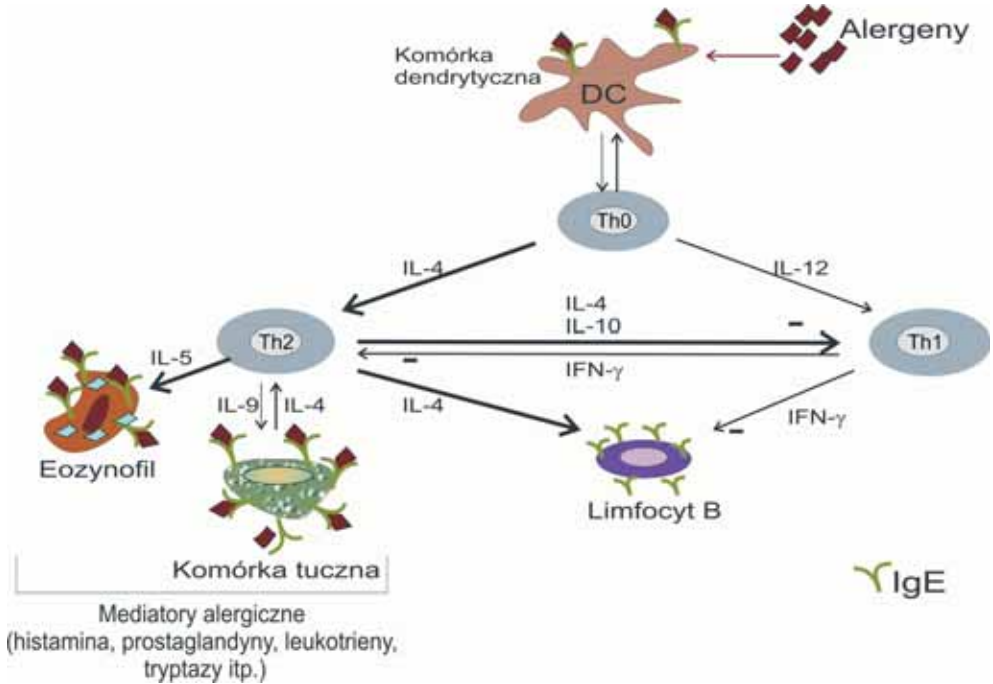
Michał M. Sikorski,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
mmsik@ibch.poznan.pl

tych pokazano, że na rozwój alergii wpływa zarówno czynnik genetyczny jak i środowiskowy. Zaobserwowano także większe prawdopodobieństwo dziedziczenia czynnika genetycznego predysponującego do alergii od matki niż od ojca. Choroby atopowe stanowią grupę heterogenną, której podłoże molekularne nie zostało dotąd dostatecznie poznane. Szacuje się, że obecnie ponad 25% populacji ludzkiej w uprzemysłowionych krajach półkuli północnej cierpi na alergię i astmę. Jest to bardzo poważny problem społeczny powodujący znaczne pogorszenie jakości życia i stwarzający duże zagrożenie dla zdrowia społeczeństwa. Jest to również problem ekonomiczny współczesnego świata związany z wysokimi kosztami opieki zdrowotnej.

1.1. Mechanizm reakcji alergicznej

Alergia (nadwrażliwość typu I, atopia) to dziedziczna skłonność do nadmiernego wytwarzania przeciwciał klasy IgE w odpowiedzi na powszechne antygeny środowiskowe (alergeny), w czym pośredniczą mechanizmy immunologiczne zarówno humoralne, jak i komórkowe. Reakcja organizmu na alergen rozpoczyna się od jego związania przez komórki prezentujące antygen (APC, ang. *antigen presenting cell*) (m.in. komórki dendrytyczne, makrofagi), a następnie prezentacji ich limfocytom T. Znanych jest 5 rodzajów limfocytów pomocniczych T (Th) (ang. *T helper cell*) (2). Dwa główne to komórki Th1 i Th2. Limfocyty Th1 związane są z odpowiedzią komórkową organizmu na infekcje bakteryjne, są to główne aktywatory makrofagów. Komórki Th1 wytwarzają IFN- γ (interferon gamma), który ma zdolność hamowania dojrzewania komórek Th2 i komórek B. Komórki Th2 uczestniczą natomiast głównie w odpowiedzi immunologicznej na pasożyty. Th2 wydzielają interleukiny: IL-4, IL-5 i IL-13. IL-4 indukuje produkcję IgE (immunoglobulina E) przez limfocyty B, IL-5 jest głównym czynnikiem regulującym eozynofilię, natomiast IL-13 odpowiada za indukowanie większości fenotypowych zmian w astmie alergicznej (wrażliwość dróg oddechowych, nadmierne wydzielanie śluzu, zapalna eozynofilia). IL-13 i -4 dodatkowo odpowiadają za zmianę typu immunoglobulin produkowanych przez komórki B (IgA \rightarrow IgE). Zaburzenie równowagi Th1/Th2 na rzecz Th2 prowadzi do kaskady reakcji, w konsekwencji których dochodzi do uwolnienia mediatorów zapalnych przez komórki tuczne, eozynofile, bazofile i rozwoju zapalenia alergicznego.

Wyjaśnienie zjawiska częstszego występowania alergii w krajach rozwiniętych i rozwijających się dostarcza tzw. hipoteza higieny (3-7). Wykazano, że dzieci dorastające na wsi, narażone na ekspozycje na mikroby, elementy bakteryjne i alergeny grzybowe, są mniej predysponowane do rozwoju alergii i astmy. Ekspozycja na wysokie ilości endotoksyny paradoksalnie może wpływać na wystąpienie mniejszego ryzyka uczulenia (5). Mechanizm ten nie jest dokładnie poznany, ale wiąże się go ze wzrostem ekspresji genów receptorów Toll-podobnych (TLR, ang. *Toll-like receptor*) znajdujących się na powierzchni komórek APC (6,8). Ważną rolę odgrywają także limfocyty regulatorowe T (Treg, ang. *T regulatory cell*) wchodzące w interakcje z ko-



Rys. Mechanizm reakcji alergicznej (opis w tekście).

mórkami dendrytycznymi. Wytwarzają one IL-10, której podwyższony poziom obserwuje się podczas robaczyc. Obniżony poziom limfocytów Treg, obserwuje się u dzieci alergicznych. Uważa się, że limfocyty te zaangażowane są w hamowanie rozwoju alergii (3,6).

1.2. Badania podłoża genetycznego alergii i astmy atopowej

Badania nad podłożem genetycznym alergii prowadzone są od wielu lat. Stosowane w tym celu metody identyfikacji genów odpowiedzialnych za rozwój alergii obejmują m.in. klonowanie pozycyjne, badania polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz badania profili ekspresji genów charakterystycznych dla chorób alergicznych przy wykorzystaniu różnych modeli badawczych (człowiek (9-14), małpa (15), mysz (16-20), linie komórkowe (21-23)). Ważnym czynnikiem wykluczającym pacjentów z badania ekspresji genów w chorobach alergicznych jest palenie (bierne jak i czynne), ponieważ istnieją dowody, że dym tytoniowy wpływa na zmianę profilu ekspresji genów (24,25).

W tabeli zebrano najważniejsze geny i SNP powiązane z alergią i astmą.

Tabela

Geny indukowane w reakcjach alergicznych

Lokalizacja	Proponowane powiązania z alergią i astmą	
Chromosom	Na podstawie publikacji (1,26-29)	Obecność SNP w genie lub rejonie promotorowym (1,28-30)
1p	IL-12R, IL-10	IL-10
2q	IL-1, CD28, DPP10, GATA3	
3p	B-cell lymphoma 6, CCR4	
4p	TLR2	
5q	IL-3, IL-4, IL-5, IL9, IL-13, GM-CSF, GR, β -AR, LTC4S, β 2-AR, CYFIP2, TIM1, TIM3, CD14, ADRB2, SPINK5	IL-13, IL-4, IL-4RA, IL-4R, IL-13R α 1, β 2-AR, LTC4S, TIM1, TIM3, CD14,
6p	MHC, TNFs, TAP1, TAP2, LTA, HLA-G, GRPA	TAP1, TAP2
7q	IL-6	
11q	Fc ϵ RI- β , CCP-16, FGF3	
12q	IFN- γ , SCF, NOXS, IGF1, LTA4H, STAT6, VDR, NOS1	STAT6
13q	CTL2R	
14q	TCR α , δ , NF-KB	
16p	IL4R	
17p	CC cluster: CCL5 (RANTES), CCL11 (eotaksyna), CCL2, TBX21	CCL5, CCL11, CCL2
19q	CD22, TGF β 1, TGF- β	
20p	ADAM-33	ADAM-33

2. Badania ekspresji genów w komórkach biorących udział w rozwoju i patomechanizmie alergii i astmy atopowej

2.1. Limfocyty CD4+

Komórki CD4+ T są głównymi regulatorami humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Po stymulacji przy udziale antygeny i komórek prezentujących antygen ulegają przekształceniu w komórki T pomocnicze (Th). Komórki Th0 natomiast pod wpływem sygnału płynącego od innych komórek układu immunologicznego (wydzielających cytokiny) przekształcają się m.in. w limfocyty Th1 (CD3+ CD4+ Tbet+) lub Th2 (CD3+ CD4+ GATA3+) (31). Znanych jest pięć subpopulacji komórek CD4+. Oprócz wymienionych należą do nich: limfocyty Th17 (CD3+

CD4+ ROR γ t+), naturalne limfocyty Treg (CD3+ CD4+ CD25+ FOXP3+) oraz limfocyty Treg typu I (CD3+ CD4+) (2).

Hansel i wsp. (10) analizowali profile ekspresji genów u pacjentów z astmą atopową, nieatopową i kontroli niealergiczy. Za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych Hu133A i Hu133B (Affymetrix) oraz mikromacierzy szlaku alergicznego – Human Th1-Th2-Th3 RT ProfilerTM (SuperArray) badali profile ekspresji genów komórek CD4+ T izolowanych z krwi obwodowej pacjentów. Atopia stwierdzana była w przypadku pozytywnego wyniku testu skórniego, dla co najmniej jednego z dziełu z zastosowanych alergenów.

Na podstawie wyników mikromacierzy Affymetrix nie wykazano różnicującego profilu ekspresji genów w komórkach CD4+ T. Może to być spowodowane dużym rozcieńczeniem krążących w krwi alergenowo specyficznych komórek Th2.

Bardziej obiecujące wyniki uzyskano po włączeniu dodatkowego etapu amplifikacji mRNA. Z zastosowaniem mikromacierzy oligonukleotydowych zbadano w ten sposób ekspresję genów u 9 kobiet atopowych i 7 niewykazujących atopii. Do eksperymentu pacjentki dobierano parami według wieku. Materiał izolowano z komórek CD4+ T i przygotowywano do przeprowadzenia eksperymentu zgodnie z protokołem producenta (SuperArray). Jako endogenne kontrole zastosowano: 18S rRNA, HPRT1 (ang. *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), RPL13A (ang. *ribosomal protein L13a*), GAPDH (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) i ACTB (ang. *Beta cytoskeletal actin*). U większości badanych wykrywano zmienioną ekspresję 74-83 genów, dla których sondy znajdowały się na macierzy. Dwanaście genów ulegało zdecydowanie silniejszej ekspresji u alergików w porównaniu z pacjentami zdrowymi, m.in. IL-9, osteopontyna (SPP1), INHA (inhibina α), IL-13, IL-10, CCR5 (ang. *chemokine (C-C motif) receptor 5*), IL-5, IL-4, INHBA (inhibina β A), CD80 (ang. *CD80 molecule, B-lymphocyte activation antigen B7*), CD86 (ang. *CD86 molecule, B-lymphocyte activation antigen B7-2*) i IL12RB2 (ang. *interleukin 12 receptor, beta 2*). Na podstawie tych wyników potwierdzono wcześniejsze założenie o konieczności dodatkowego etapu amplifikacji materiału, gdyż zwiększonej ekspresji uległy geny kodujące interleukiny (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), które na mikromacierzy Hu133 znajdowały się poniżej poziomu detekcji.

Czynniki transkrypcyjne (STAT6 (ang. *signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced*) i GATA3 (ang. *GATA binding protein 3*)) indukujące Th2 wykazywały podobny poziom ekspresji w obu grupach. Wśród genów o podwyższonej ekspresji SPP1, CCR5 i IL12RB2 nie są zaangażowane w odpowiedź immunologiczną typu Th2. Osteopontyna reguluje proces apoptozy i wpływa prawdopodobnie na równowagę komórek Th1/Th2. Polimorfizm tego genu powiązany ze wzrostem poziomu IgE. SPP1 ulega ekspresji w płucach astmatyków i ma wpływ na różnicowanie komórek dendrytycznych.

Przy wykorzystaniu obu typów mikromacierzy autorzy potwierdzili także, że profil ekspresji genów w komórkach CD4+ T jest relatywnie stabilny w czasie.

W swoich wcześniejszych badaniach (9) grupa ta badała profil ekspresji genów w komórkach CD4+ T u pacjentów z łagodną i ostrą postacią astmy. Wykorzystano

do tego mikromacierz Hu133 (Affymetrix) zawierającą sondy oligonukleotydowe dla ~ 33 000 genów. Zaobserwowali oni zmianę ekspresji 40 genów, z czego 3 charakteryzowały się obniżonym poziomem ekspresji u pacjentów z ostrą postacią astmy atopowej, natomiast pozostałe 37 ulegało podwyższonej ekspresji. Geny te obejmowały czynniki transkrypcyjne, cząsteczki powierzchniowe komórek zaangażowane w aktywację komórek T, proliferację (CD6, CD3E) oraz migrację. Pośród nich są geny, które zostały powiązane z astmą wcześniej np. TGF- β (ang. *transforming growth factor β* , transformujący czynnik wzrostu β) i urotensyna, jak i geny, dla których taki związek nie został wcześniej wykazany np. PRKCSH (substrat 80K-H dla kinazy białkowej C). Podwyższoną ekspresję wykazały także geny RAB14 i RAB2, KRAS2 i CAPRI, należące do rodziny onkogenów Ras (regulujące proliferację komórek, zaangażowane w rozwój eozynofilii i nadreaktywność dróg oddechowych) wskazując, że przenoszenie sygnału za pomocą GTPazy może powodować wzrost liczby komórek T u pacjentów z zaawansowaną postacią astmy. Aktywacja szlaku kinazy MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) przez Ras wyjaśnia wzrost ekspresji JunD (ang. *jun D proto-oncogene*), członka rodziny czynników transkrypcyjnych AP-1 (ang. *jun oncogene*). JunD zaangażowany jest w transkrypcyjną regulację cytokin IL-4 i IL-5 wytwarzanych przez Th2. Podwyższonej ekspresji uległy także geny związane z adhezją komórek (NK4 (interleukina 32), B4GALT1 (ang. *Beta-1,4-galactosyltransferase 1*)) i organizacją cytoszkieletu (ARPC4 (ang. *Actin-related protein 2/3 complex subunit 4*), PLEC1 (pektyna 1), RAC2 (ang. *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*), SEPT1 (septyna1)) oraz geny zaangażowane w modyfikację macierzy pozakomórkowej, uczestniczące w remodelowaniu dróg oddechowych: FCN1 (fikolina1), LRAP (ang. *endoplasmic reticulum aminopeptidase 2*) i TGF β . Obniżonej ekspresji uległ natomiast gen SPEC2 (ang. *CDC42 small effector 2*), który jest inhibitorem zmian cytoszkieletu.

Weryfikację uzyskanych wyników za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym wykonano dla pięciu genów wykazujących największe różnice w poziomie ekspresji, tj. TGF β 1, CD6, JUND (ang. *jun D proto-oncogene*), TRD@ (ang. *T cell receptor delta locus*) i PLEC1.

Chen i wsp. (18) badali natomiast myszy z wyłączonym genem STAT6 (Stat6 -/-). Autorzy zidentyfikowali geny indukowane przez IL-4 i regulowane przez Stat6 w komórkach CD4+. 48 godz. po indukcji polaryzacji (CD4+ \rightarrow Th2) zaobserwowano ekspresję 73 nowych genów indukowanych przez IL-4 i 18 regulowanych przez Stat6 (12 genów wspólnych dla obu grup). Geny regulowane przez Stat6 w komórkach T i B to m.in. HIPK2 (ang. *homeodomain interacting protein kinase 2*), NFIL3 (ang. *nuclear factor, interleukin 3 regulated*), CISH (ang. *cytokine inducible SH2-containing protein*), CASP6 (kaspaza 6) i TGTP (ang. *T-cell specific GTPase*). Geny te mogą należeć do podstawowych czynników prowadzących do zapalenia alergicznego (różnicowanie Th2 i produkcja IgE).

2.2. Komórki dendrytyczne i limfocyty T

Komórki dendrytyczne należą do komórek prezentujących antygen (APC, ang. *antigen presenting cell*) limfocytom T. Ma to miejsce głównie w naczyniach limfatycznych prowadzących do węzłów limfatycznych, jak i w śledzionie. Komórki dendrytyczne (DCs, ang. *dendritic cells*) wytwarzają liczne chemokiny (CCL, ang. *chemokine (C-C motif) ligand*) przyciągające komórki T, m.in. CCL17, CCL18, CCL19, CCL21 i CCL22. Są one wyspecjalizowanymi regulatorami odpowiedzi immunologicznej, inicjują ją i wzmacniają. Do wykształcenia dojrzałych komórek dendrytycznych konieczna jest obecność komórek T. Markery charakterystyczne dla kompleksu aktywowującego limfocyty T to m.in. CD86, CD80 i HLA-DR (ang. *major histocompatibility complex, class II*) (25,31).

Lindstedt i wsp. (11) w badaniach przeprowadzonych za pomocą mikromacierzy Hu133A (Affymetrix) podjęli próbę identyfikacji markerów komórek dendrytycznych i komórek T, ulegających odmiennej ekspresji u osób alergicznych i zdrowych. W tym celu izolowali z krwi pacjentów monocyty, które następnie podczas hodowli indukowano w celu przekształcenia w komórki dendrytyczne. Część DCs stymulowana była alergenem *Phl p* (główny alergen tymotki łąkowej *Thleum pratense*) i analizowana (po 48 godz.) na mikromacierzy. Z krwi izolowano także komórki CD4+ T, a następnie hodowano wraz z komórkami dendrytycznymi (stymulowanymi i niestymulowanymi alergenem). W komórkach dendrytycznych pochodzących od alergików, w porównaniu z komórkami od osób zdrowych, po stymulacji alergenem obserwowano podwyższoną ekspresję następujących genów: RANK (ang. *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator*), CD43 (sialoforyna), CDH2 (kadheryna 2), TM4SF2 (tetraspanina 7). Natomiast ekspresja genów IL2RG (receptor gamma interleukiny 2), IL7R (receptor interleukiny 7), IL8RB (receptor beta interleukiny 8), CD209L (ang. *C-type lectin domain family 4, member M*), CLEC1 (ang. *C-type lectin domain family 1, member A*), TM4SF7 (ang. *transmembrane 4 superfamily protein member 7*) i TM9SF4 (ang. *transmembrane 9 superfamily protein member 4*) ulegała obniżeniu. We wspólnie hodowanych komórkach DCs/T zmiana ekspresji dotyczyła odmiennych genów. U osób chorych podwyższoną ekspresję wykazywały geny: IL-1A, IL-1RAP (ang. *interleukin 1 receptor accessory protein*), HRK4 (ang. *harakiri, BCL2 interacting protein*), FCER1B (ang. *Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide*), FCGR2B (ang. *Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)*), a obniżoną geny IL1R2 (receptor 2 interleukiny 1), IL7R (receptor interleukiny 7), LTA (limfotoksyna α), LTB (limfotoksyna β), LTBP1 (ang. *latent transforming growth factor beta binding protein 1*), MRC1 (ang. *mannose receptor, C type 1*) i IGSF6 (ang. *immunoglobulin superfamily, member 6*). Stymulacja alergenem nie indukowała żadnych zmian profilu ekspresji genów w DCs.

Duża pula genów chemokin ulegała odmiennej ekspresji w komórkach DCs/T stymulowanych *Phl p* u pacjentów alergicznych w porównaniu z kontrolami, np. CCL17, CCL22 i CCL2 (MCP-1), odgrywające istotną rolę w aktywacji komórek tucznych.

Podwyższonej ekspresji u alergików ulegał także gen CXCR4 kodujący chemotaktyczny czynnik zaangażowany w alergiczną chorobę dróg oddechowych (odpowiedzialny za indukcję wysoce specyficznych właściwości migracyjnych komórek tucznych). Wytypowane przez autorów geny markerowe dla odpowiedzi Th2 to poznane już wcześniej: IL-9, CD30 (TNFRSF8) (ang. *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8*), VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor A*) oraz po raz pierwszy opisane przez Lindstedta i wsp. geny TNFRSF11B (ang. *osteoprotegerin*), BCL-3 (ang. *B-cell CLL/lymphoma 3*), INSR (receptor insuliny) i CD1E (11).

Faith i wsp. (32) wykazali ostatnio, że ekspozycja komórek APC pochodzących od osób z astmą atopową na czynnik stymulujący dojrzewanie granulocytów i makrofagów (GM-CSF, ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor 2*), wzmacnia ich zdolność indukowania alergenowo specyficznej odpowiedzi Th2 poprzez mechanizm obejmujący receptor cysLT (ang. *cysteinyl leukotriene receptor*).

Hammad i wsp. (33) odkryli mechanizm indukowania limfocytów Treg za pośrednictwem komórek dendrytycznych. Komórki Treg mają wpływ na kontrolowanie stopnia zapalenia alergicznego. Odbywa się to przy zastosowaniu agonistów DP1 (ang. *D prostanoid 1 receptor*). U myszy traktowanych agonistą DP1 lub otrzymujących poprzez iniekcję komórki dendrytyczne nim traktowane, wzrastała ilość limfocytów Treg, które na drodze zależnej od IL-10 hamowały zapalenie. Wskazuje to na fakt, że inhalacja selektywnym agonistą DP1 może hamować główne cechy astmy i służyć do stworzenia nowych leków wykorzystujących ten mechanizm.

2.3. PMBC

Liu i wsp. (12) badali profil ekspresji genów u osób alergicznych ($n = 8$, 22-58 lat, uczulonych na pospolite alergeny, mających pozytywne wyniki testów skórnych, z katarzem siennym, z nierozwiniętą astmą) przed i po immunoterapii, w porównaniu z osobami zdrowymi ($n = 8$, brak klinicznej diagnozy i przypadków występowania w rodzinie atopii oraz astmy). Autorzy wykorzystali mikromacierze cDNA (na membranach nylonowych) zawierające 4132 geny. W eksperymencie użyli całkowitego RNA pochodzącego z komórek mononuklearnych (jednojądrowych) krwi obwodowej (PMBC) znakowanego ^{33}P -dCTP w procesie odwrotnej transkrypcji.

PMBC (ang. *peripheral mononuclear blood cells*) to heterologiczna grupa komórek obejmująca m.in. limfocyty T, B, komórki NK, makrofagi, eozynofile, komórki tuczne i bazofile.

Trzykrotną zmianę poziomu ekspresji genów pomiędzy kontrolami a alergikami (przed immunoterapią) wykazywały 233 geny: 68 podwyższoną a 165 obniżoną ekspresję. Analiza tego zbioru genów pozwoliła wyłonić geny o wysokiej istotności statystycznej. Są to m.in. geny cytokin: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, receptory cytokin: IL4R, IL10RA, IL10RB, IL13RA1, IL13RA2, chemokiny i receptory chemokin, T-bet (czynnik transkrypcyjny komórek Th1), GATA3; markery powierzch-

niowe np. CD4, CD8. Największą różnicę w poziomie ekspresji pomiędzy pacjentami a osobami zdrowymi wykazują IL-8 i IL-15.

Geny niepowiązane wcześniej z chorobami atopowymi zidentyfikowane przez autorów to: MARCH-VI (ang. *membrane-associated ring finger*), CASP6, RAB6 (ang. *Rab GTPase, member RAS oncogene family*) i MAN2A2 (ang. *mannosidase, alpha, class 2A, member 2*).

Liczba genów, których poziom ekspresji uległ zmianie po immunoterapii wynosiła 563 (odchylenie standardowe >2 , $p < 0.05$). Należą do nich m.in. CCL16, CXCL13 (ang. chemokine (*C-X-C motif*) *ligand 16*), CCL4, CCL25, CCL7 i TGF β . Istotne obniżenie poziomu ekspresji po odczulaniu obserwowano dla genów HBE1 (ang. *hemoglobin, epsilon 1*) i MSTP9 (ang. *macrophage stimulating, pseudogene 9*).

Na podstawie analizy funkcji genów różnicujących można było stwierdzić, że podwyższonej ekspresji ulegają głównie geny zaangażowane w odpowiedź zapalną, transdukcję sygnału i odpowiedź na stres oraz wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną. W grupie o obniżonej ekspresji znalazły się geny biorące udział w apoptozie i w aktywacji kaskady JNK (kinaz c-Jun). Zaangażowany w apoptozę jest m.in. szlak obejmujący receptory FAS i TNFR1 (receptory rodziny TNF, ang. *TNF receptor superfamily*), szlak p53, geny rodziny Bcl2, jak i kaskada kaspaz. W przedstawionych badaniach gen CASP6 ulegał 20-krotnie, a CASP4 3-krotnie obniżonej ekspresji. Według autorów zarówno chroniczna aktywacja odpowiedzi immunologicznej, jak i zahamowanie apoptozy może brać udział w rozwoju przewlekłego kataru sienneo. Podobne wyniki uzyskano badając komórki PMBC pochodzące od pacjentów z syndromem hiper-IgE. Wysokiej ekspresji u tych osób ulegały geny kodujące IL-12, GM-CSF (podobnie jak w badaniach Liu (12)), ligand c-kit, obniżonej natomiast IL-8, eotaksyna (CCL11) i MCP-3 (CCL7) (34).

El Bassom i wsp. (35) wykazali dodatkowo, że IL-16 hamuje wydzielanie przez PMBC interleukiny 5, wzmacnia natomiast wydzielanie IL-10 i IL-18.

2.4. Bazofile

Bazofile reprezentujące mniej niż 1% ludzkich leukocytów krwi obwodowej są komórkami efektorowymi w reakcjach zapalnych i alergicznych typu I. Ziarnistości tych komórek zawierają potencjalne mediatory zapalenia obejmujące m.in. histaminę, proteazy, proteoglikany i enzymy lizosomalne. Związanie przeciwciał anty-IgE lub alergenów poliwalentnych do cząsteczki IgE związanej z receptorem Fc ϵ RI na powierzchni bazoofilów (wiązanie krzyżowe) wywołuje degranulację ziarnistości (zależną od wapnia), reorganizację cytoszkieletu, fałdowanie błony (marszczenie), uwalnianie czynników zapalnych, wzrost aktywności integryny β 1 oraz syntezę *de novo* leukotrienów i cytokin.

Bazofile, które nie ulegają degranulacji po „ataku” anty-IgE nazywane są bazofilami „nieuwalniającymi” (ang. *nonreleaser*). Znane są od roku 1973. Brak wrażliwości

tych komórek na anty-IgE związany jest prawdopodobnie ze wzrostem proteosomalnej degradacji kinazy tyrozynowej Syk, uczestniczącej w kaskadzie sygnałnej FcεRI.

Lama i wsp. (13) przez 4 lata monitorowali uwalnianie histaminy przez bazofile (związane z FcεRI) izolowane od pacjentów. Bazofile krwi obwodowej pochodziły od dwóch grup pacjentów: 68 zdrowych nieatopowych i nieastmatycznych oraz 61 z astmą atopową. Z komórek tych izolowano RNA, który po odpowiednim przygotowaniu hybrydowano z mikromacierzą Affymetrix U133A zawierającą 22 283 sondy. Autorzy porównywali profile ekspresji genów pomiędzy nieaktywowanymi a aktywowanymi (uwalniającymi a nieuwalniającymi) bazofilami. Cykliczność występowania (zmiany) statusu uwalniający – nieuwalniający u pacjentów jest o wiele rzadsza niż pierwotnie oceniano. 96 genów ulegało zróżnicowanej ekspresji pomiędzy niestymulowanymi uwalniającymi i nieuwalniającymi bazofilami. Podwyższoną ekspresję wykazały m.in. receptor H4 histaminy, TNF (ang. *tumor necrosis factor*), α-indukowane białko 6, BACH2 (ang. *basic leucine zipper transcription factor 2*), czynnik transkrypcyjny MAF i cylicyna 1. Około 1/3 z nich wykazała obniżony poziom ekspresji w komórkach nieuwalniających histaminy m.in. geny: CD7, kalmoduliny 1, antygeny CD97. 253 geny ulegały zróżnicowanej ekspresji w bazofilach uwalniających w odpowiedzi na stymulację receptorem FcεRI. Podwyższona ekspresja obserwowana była w przypadkach m.in. białka 1B szoku cieplnego 70kDa, FOS-B, HSP70B, Hsp40 i RANTES (CCL5).

Podsumowując niestymulowane bazofile zawierały transkrypty dla: podjednostek α i β receptora FcεRI, kinazy tyrozynowej związanej z FcεRI, Lyn i białek granularnych. Inne geny o podwyższonym poziomie ekspresji to: receptor H4 histaminy (powiązany z rozwojem alergii) i CCR1 (ang. *chemokine receptor 1*) wiążący MIP-1α i MIP-1β. Wzmoczonej ekspresji ulegały także komponenty kompleksu transkrypcyjnego AP1. Miejsce wiążące AP1 zawierają rejony promotorowe wielu cytokin i chemokin zapalnych: IL-8, RANTES, TNFα, IL12, MCP i IL-6.

Poziom bazofili uwalniających histaminę po stymulacji FcεRI jest większy u astmatyków. Osoby z nieuwalniającymi i cyklicznie uwalniającymi bazofilami występują powszechnie w całej populacji i z reguły nie cierpią na astmę. W bazofilach uwalniających histaminę wiązanie krzyżowe FcεRI powoduje zwiększenie ekspresji wielu genów m.in. kodujących receptory, białka sygnałne, czynniki transkrypcyjne i chemokiny. Mimo że poziom ekspresji genów jest generalnie niższy w komórkach nieuwalniających, charakterystyczny zbiór genów ulega podwyższonej ekspresji po stymulacji antygenem.

2.5. Komórki tuczne

Komórki tuczne odgrywają ważną rolę w odpowiedzi przeciwzakaźnej, angiogenezie i przebudowie tkanek. Na ich powierzchni znajdują się receptory TLR (ang. *Toll-like receptors*, receptory Toll-podobne) (wiążące produkty bakteryjne i wiruso-

we), Fc γ RI (wiążące IgG) i Fc ϵ RI (wiążące IgE). W astmie atopowej w drogach oddechowych w pobliżu komórek nabłonka, w gruczołach i pomiędzy komórkami mięśni gładkich obserwuje się akumulację komórek tucznych. Podobnie jak bazofile zawierają one w cytoplazmie liczne ziarnistości (ok. 60% objętości dojrzałej komórki) (7).

Aktywację komórek tucznych inicjuje wiązanie krzyżowe kompleksu receptora Fc ϵ RI-IgE z multiwalentnym antygenem. Zależna od Fc ϵ RI aktywacja powoduje: 1) degranulację i uwolnienie z ziarnistości mediatorów prozapalnych (aminy oddziałujące na naczynia, neutralne proteazy, proteoglikany, niektóre cytokiny i czynniki wzrostu); 2) syntezę *de novo* mediatorów lipidowych (np. eikozanoidów); 3) syntezę i sekrecję cytokin i chemokin (7,21,36).

Sugeruje się, że komórki tuczne mogą znacznie wzmacniać zależną od antygeny nadreaktywność dróg oddechowych, ich infiltrację przez eozynofile oraz proliferację komórek nabłonka oddechowego (14,16,21,36).

Komórki tuczne wpływają także na rozwój i utrzymanie odporności związanej z limfocytami Th2 oraz na inicjację i regulację odporności wrodzonej (21). W warunkach *in vitro* stwierdzono, że obecność IgE wydłuża przeżywalność komórek tucznych, zwiększa ekspresję Fc ϵ RI i zdolność wydzielania przez nie cytokin (7,21). Komórki tuczne należą do głównych mediatorów procesu alergicznego. Uwalniają one (przy niskiej agregacji Fc ϵ RI) interleukinę 3 i proteazy, np. MCP-1. Do zapoczątkowania degranulacji niezbędna jest co najmniej dimeryzacja Fc ϵ RI (37).

Sayama i wsp. (22) badali profil ekspresji genów komórek tucznych pochodzących z krwi pępowinowej w 11-19. tygodniu hodowli. Zaprojektowana przez nich mikromacierz cDNA (na membranie nylonowej) obejmowała około 14 000 genów związanych z funkcjonowaniem układu immunologicznego. Pośród badanych genów, 2478 wykazywało 2-200-krotną zmianę poziomu ekspresji po stymulacji Fc ϵ RI. Autorzy zaobserwowali zmiany ekspresji m.in. 18 cytokin i cząsteczek związanych z cytokinami (obniżoną: IL-16, podwyższoną: IL-1 β , IL-14, MIF (ang. *macrophage migration inhibitory factor*), TACE (ang. *ADAM metallopeptidase domain 17*), IL-11, IL-9, IL-6, IL-5, IL-4, CSF-1 (ang. *colony stimulating factor 1 (macrophage)*), IL-18, IL-12, p40, TNF- α , IL-3, GM-CSF, IL-1 α , LIF (ang. *leukemia inhibitory factor*), Pre-B (ang. *cell enhancing factor*), jak i 13 chemokin (eotaksyna, Gro2, IL-8, MCP-1 β , HCC-4, MIP-1 β , RANTES, LD78 β , MIP-1 α , MCP3, limfotaktyna, MIP-3 α , MCP-4). Kilka genów zaangażowanych w potencjalne interakcje z komórkami B, T i dendrytycznymi, ulegało po stymulacji podwyższonej ekspresji (CD82, SLAM (ang. *signaling lymphocytic activation molecule family member 1*), limfotoksyna- β , ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*), CD83, ligand 4-1BB, ligand OX40), natomiast gen kodujący ligand CD40 wykazywał obniżoną ekspresję. Podobne wyniki uzyskano po stymulacji mysich i ludzkich komórek tucznych przez receptor Fc ϵ RI (wysoka ekspresja: CCL5, IL-5, CSF-1, TNF, SERPINE1, CCL4, IL-3 i CCL1) (38). Sayama i wsp. (22) wykazali, że najwyższy poziom IL-11 produkowanej przez komórki tuczne obserwowano po ok. 12 godz. od stymulacji anty-IgE. U pacjentów chorujących na astmę źródłem IL-11 są komórki tuczne i eozynofile. Wytwarzanie tej interleukiny wskazuje na związek pomiędzy

zależną od IgE aktywacją komórek tucznych u osób z astmą alergiczną a rozwojem zmian strukturalnych w drogach oddechowych tych osób.

Jayapal i wsp. (21) również badali komórki pochodzące z krwi pępowinowej. Wyizolowane komórki CD34+ hodowano w obecności SCF (ang. *Stem Cell Factor*) i interleukiny 3 (IL-3) uzyskując dojrzałe komórki tuczne. Następnie przy zastosowaniu mikromacierzy oligonukleotydowej (HG – *Focus array*, *Affymetrix*) zawierającej sondy dla 8793 genów badano profile ekspresji komórek tucznych niestymulowanych, stymulowanych monomeryczną immunoglobuliną E oraz przeciwciałem anti-IgE powodującym agregację receptora FcεRI.

Podczas analizy mikromacierzy wyłoniono 760 genów (~ 8,6%), które ulegały zróżnicowanej ekspresji w niestymulowanych i stymulowanych komórkach tucznych (21). Wśród tych genów 58 ulegało podwyższonej ekspresji (>2x) po samej stymulacji IgE. Najistotniejsze to geny kodujące cytokiny: IL-1β (3,3x), IL-6 (2,7x), CSF-1 (1,6x) i chemokiny: IL-8 (CXCL8) (2,1x), MIP-1β (CCL4) (3,5x), MCP3 (CCL7) (2,1x), GROα (CXCL1) (2,3x) i GROγ (CXCL3) (1,6x). Pasywna stymulacja komórek tucznych przez monomeryczną cząsteczkę IgE przygotowuje komórki do gotowości i sprawia, że potencjalnie mogą one wyzwalać „uzbrojenie” innych efektorowych komórek obronnych. Jednak do ich pełnej aktywacji wymagana jest agregacja receptora powierzchniowego dla immunoglobuliny E.

Interleukina 8 odgrywa główną rolę w odpowiedzi zapalnej, ponieważ oddziałuje chemotaktycznie na neutrofile. MCP3, MIP-1β i GROα znane są natomiast z umiejętności przyciągania monocytów, komórek NK, bazofilów, komórek dendrytycznych i Th2. IL-1β natomiast reguluje dodatkowo główne białka prozapalne. Autorzy potwierdzili wyniki uzyskane podczas analizy mikromacierzy dla wybranych genów na poziomie transkryptu następującymi metodami: 1) real-time PCR dla genów: IL-1β, IL-6, IL-8, MCP3, RANTES i SPHK1), 2) metodą ELISA dla białek IL-1β, IL-6, IL-8, MCP3, RANTES (w komórkach po agregacji FcεRI) i IL-8 (po stymulacji IgE) oraz 3) metodą Western blot dla białka SPHK1. SPHK1 (ang. *sphingosine kinase 1*) jest enzymem fosforylującym sfingozynę (lipid błonowy) w wyniku czego powstaje sfingozyno-1-fosforan (SPP) biorący udział w odpowiedzi zapalnej. Jest on aktywny w wewnątrzkomórkowych szlakach sygnałnych zapoczątkowanych przez receptor FcεRI w komórkach tucznych, gdzie koordynuje kilka odpowiedzi fizjologicznych wywołanych przez aktywację tych komórek.

W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że poziom ekspresji receptora FcεRI obniżany jest przez interleukiny 4 i 10 (37).

Za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych Wang i wsp. (39) oraz Okumura i wsp. (40) niezależnie zidentyfikowali amfiregulinę jako transkrypt, którego ilość znacząco rośnie po agregacji FcεRI na aktywowanych komórkach tucznych. Amfiregulina inicjuje remodelowanie tkanek, tj. proliferację fibroblastów płucnych i znaczną indukcję transkryptu MUC5AC w ludzkich liniach komórek nabłonka oddechowego. W obu grupach badaczy wykazano, że ilość komórek tucznych amfiregulinopozytywnych wzrasta w drogach oddechowych astmatyków.

Badania mające na celu poznanie genów ulegających zmienionej ekspresji w komórkach tucznych pod wpływem różnych czynników mają na celu poznanie dokładnej roli, jaką pełnią te komórki w rozwoju i przebiegu chorób alergicznych.

2.6. Komórki nabłonkowe

Nabłonek płuc stanowi miejsce bezpośredniego kontaktu komórek układu immunologicznego z alergenami wziewnymi. Zmiany wytwarzane w obrębie płuc pod wpływem cytokin wydzielanych przez komórki Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13) prowadzą do rozwoju fenotypu astmatycznego (nadmierne wydzielanie śluzu, naciekanie komórek zapalnych, nadwrażliwość oddechowa). Nabłonek oddechowy jako miejsce, gdzie zachodzą procesy odpowiedzialne za rozwój astmy alergicznej jest źródłem zainteresowania wielu grup badawczych. Ponieważ pobranie tych tkanek odbywać się może tylko na drodze biopsji, materiał badawczy jest mało dostępny i może zawierać domieszki różnych rodzajów komórek. Badania nabłonka oddechowego przeprowadza się głównie na modelach zwierzęcych (mysz, małpa) i komórkowych (hodowle komórkowe).

Nabłonkowa nadekspresja transgenu IL-13 lub podawanie IL-13 u myszy indukuje fenotyp astmatyczny niezależny od limfocytów. Działanie tej interleukiny na komórki nabłonkowe jest krytyczne dla powstania nadwrażliwości dróg oddechowych (AHR) i produkcji śluzu. U ludzi zmutowany wariant (Gln110Arg) IL-13 (30) jest genetycznie powiązany z astmą oskrzelową. Geny indukowane przez IL-13 w komórkach nabłonka oskrzeli, komórek mięśni gładkich i fibroblastów płucnych to m.in. MCP-1 i IL-6 (cytokina prozapalna). MCP-1 to chemokina rekrutująca limfocyty, bazofile, makrofagi i komórki dendrytyczne (17). Laoukili i wsp. (23) wykazali przy użyciu macierzy cDNA (588 genów) zmiany indukowane przez IL-13 w hodowlach komórek nabłonkowych.

Yuyama i wsp. (41) zidentyfikowali 12 genów indukowanych w tkankach oskrzeli przez IL-13 lub IL-4 (mające wspólny receptor). Porównując uzyskane wyniki z profilem ekspresji genów u pacjentów z astmą atopową, wykazali, że ekspresja 4 genów: SERPINB3, SERPINB4 (ang. *serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4*) (koduje białko SCCA2), KAL-1 (ang. *anosmin-1*) i MAP17 była podwyższona lub obecna tylko w próbkach astmatycznych. Na podstawie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że białko SCCA2 produkowane pod wpływem IL-13 lub IL-4 w komórkach nabłonka oskrzeli pełni rolę ochronną przed działaniem zewnętrznych proteaz. Indukcja IL13R α 1 przez IL-13 lub IL-4 została potwierdzona metodą barwienia z zastosowaniem przeciwciał (ang. *immunostaining*). Wykazano, że IL13R α 2 funkcjonuje jako receptor hamujący sygnał pochodzący od IL-13, co wskazuje na istnienie negatywnego sprzężenia zwrotnego w mechanizmie indukcji IL13R α 2 przez IL-13 w komórkach nabłonkowych oskrzeli.

Zimmermann i wsp. (19) przeprowadzili badanie ekspresji genów w tkankach płuc pochodzących od myszy astmatycznych (Bal^{b/c}), indukowanych ovoalbuminą lub *Aspergillus*. Ovoalbumina (OVA) i *Aspergillus* powodowały zmianę ekspresji odpowied-

nio 496 i 527 genów z 12 422 znajdujących się na mikromacierzy (U74Av2, Affymetrix). Tylko 291 genów było wspólnych dla obu grup. Sugeruje to istnienie różnic w patogenezie spowodowanych rodzajem alergenu i/lub drogą immunizacji (alergen pokarmowy vs. wziewny). Wśród genów o zwiększonej ekspresji znajdowały się: arginaza I, arginaza II i CAT (ang. *cationic amino amid transporter 2*), zaangażowane w asymilację i metabolizm argininy. Rola tych cząsteczek w patogenezie astmy oskrzelowej nie jest wyjaśniona. Wiadomo jedynie, że mają one wpływ na syntezę tlenu azotu i kolagenu, a komórki, w których arginaza ulega ekspresji to głównie makrofagi. Poziom ekspresji arginazy I i II zwiększany jest przez IL-4 i IL-13.

Venkataraman i wsp. (20) badając myszy (DR6^{-/-}) immunizowane OVA wykazali, że DR6 (ang. *death receptor-6*) odgrywa ważną rolę w rozwoju zapalenia alergicznego płuc. Reguluje rozwój eozynofilii (naciekania tkanek płuc przez eozynofile) i stanu zapalnego w obrębie dróg oddechowych.

Zou i wsp. (15) badali ekspresję genów w tkankach płuc małych u których wywołano reakcję alergiczną indukowaną przez *Ascaris suum*. Zaobserwowali oni zmianę poziomu ekspresji 149 z 40 000 genów obecnych na mikromacierzy cDNA. Największa zmiana poziomu ekspresji widoczna była 4 godz. po indukcji alergenem. Zaobserwowano wzrost ekspresji genów kodujących m. in. eotaksynę (CCL11), MCP-1 (CCL2), MCP-3 (CCL7).

3. Podsumowanie

Mikromacierze DNA są wygodnym narzędziem badania ekspresji genów, zwłaszcza gdy dysponujemy niewielką ilością materiału biologicznego. W przypadku chorób alergicznych, w tym astmy oskrzelowej, w których w patogenezę zaangażowane są różnego typu komórki i produkty ekspresji setek genów, poznanie podłoża istniejących zależności jest podstawowe dla zrozumienia procesu chorobowego i poszukiwań sposobu leczenia. Występowanie rozbieżności w poziomie ekspresji poszczególnych genów spowodowane jest prawdopodobnie niejednorodnością badanych tkanek, stosowanych metod, a także niejednorodnymi kryteriami doboru pacjentów i definiowania atopii. Atopię rozpoznaje się na podstawie objawów klinicznych, obecności specyficznych przeciwciał IgE w surowicy oraz dodatnich wyników testów skórnych. W przypadku astmy alergicznej istotne są także wyniki badań spirometrycznych. Pomimo tych trudności udało się zidentyfikować wiele genów, których podwyższoną ekspresję lub polimorfizm powiązano z alergią i astmą. Znalezienie uniwersalnych markerów alergii jest trudne, ponieważ alergia jest chorobą wielogenową. Różne geny odgrywają inną rolę w poszczególnych stadiach choroby, a także w indywidualnych przypadkach chorobowych. Każdy gen stanowi mały procent indywidualnego genetycznego ryzyka rozwoju alergii i astmy.

Praca finansowana z funduszy projektu badawczego MNiSzW nr N407 061 32/2710.

Literatura

1. Steinke J. W., Borish L., Rosenwasser L. J., (2003), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, S495-501.
2. La Rosa D. F., Orange J. S., (2008), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121, S364-369.
3. Maizels R. M., (2005), *Current Opinion in Immunology*, 17, 656-661.
4. Yeatts K., Sly P., Shore S., Weiss S., Martinez F., Geller A., Bromberg P., Enright P., Koren H., Weissman D., Selgrade M. J., (2006), *Environ. Health Perspect.*, 114, 634-640.
5. Williams L. K., Ownby D. R., Malirili M. J., Johnson Ch. C., (2005), *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 94(3), 323-332.
6. von Mutius E., (2007), *Proceedings of The American Thoracic Society*, 4, 212-216.
7. Gołąb J., Jakóbiśiak M., Lasek W., Stokłosa T., (2007), *Immunologia*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
8. Koch A., Knobloch J., Dammhayn C., Raidl M., Ruppert A., Hag H., Rottlaender D., Müller K., Erdmann E., (2007), *Clinical Immunology*, 125, 194-204.
9. Hansel N. N., Hilmer S. C., Georas S. N., Cope L. M., Guo J., Irizarry R. A., Diette G. B., (2005), *J. Lab. Clin. Med.*, 145, 263-274.
10. Hansel N. N., Cheadle C., Diette G. B., Wright J., Thompson K. M., Barnes K. C., Georas S. N., (2008), *Allergy*, 63, 366-369.
11. Lindstedt M., Schiött Å., Bengtsson A., Larsson K., Korsgren M., Greiff L., Borrebaeck C. A. K., (2005), *International Immunology*, 17(4), 401-409.
12. Liu Z., Yelverton R. W., Krat B., Tanner S. B., Olesen N. J., Aule T. M., (2005), *Clin. Exp. Allergy*, 35, 1581-1590.
13. Lama A. Y., Schuyler M., Gilmartin L., Pickett G., Bard J. D., Tarleton Ch. A., Archibeque T., Qualls C., Wilson B. S., Oliver J. M., (2007), *J. Immunol.*, 178, 4584-4594.
14. Marone G., Gentile M., Petraroli A., de Rosa N., Triggiani M., (2001), *Arch. Allergy Immunol.*, 124, 249-252.
15. Zou J., Young S., Zhu F., Gheyas F., Skeans S., Wan Y., Wang L., Ding W., Billah M., McClanahan T., Coffman R. L., Egan R., Umland S., (2002), *Genome Biology*, 3(5).
16. Williams C. M., Galli S. J., (2000), *J. Exp. Med.*, 192, 455-462.
17. Izuhara K., Saito H., (2006), *Allergology International*, 55, 361-367.
18. Chen Z., Lund R., Aittokallio T., Kosonem M., Nevalainen O., Lehesmaa R., (2003), *J. Immunol.*, 171, 3627-3635.
19. Zimmermann N., King N. E., Laporte J., Yang M., Mishra A., Pope S.M., Muntel E. E., Witte D. P., Pegg A. A., Foster P. S., Hamid Q. H., Rothenberg M. E., (2003), *J. Clin. Invest.*, 111, 1863-1874.
20. Venkataraman Ch., Justen K., Zhao J., Galbreath E., Na S., (2006), *Immunology Letters*, 106, 42-47.
21. Jayapal M., Tay H. K., Reghunathan R., Zhi L., Chow K. K., Rauff M., Melendez A. J., (2006), *BMC Genomics*, 7, 210.
22. Sayama K., Diehn M., Matsuda K., Lunderius C., Tsai M., Tam S-Y., Botstein D., Brown P. O., Galli S. J., (2002), *BMC Genomics*, 3, 5.
23. Laoukili J., Perret E., Willems T., Minty A., Parthoens E., Houcine O., Coste A., Jorissen M., Marano F., Caput D., Tournier F., (2001), *J. Clin. Invest.*, 108, 1817-1824.
24. Wu H., Romieu J., Sierpa-Monge J.-J., del Rio-Navarro B. E., Anderson D. M., Dunn E. W., Steiner L. L., del Carmen Lara-Sanchez J., London S. J., (2007), *Environ. Health Perspect.*, 115, 616-622.
25. Büttner P., Mosig S., Funke H., (2007), *Immunogenetics*, 59, 37-43.
26. Lemanske R. F., Busse W. W., (2003), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, S502-519.
27. Ober C., Hoffjan S., (2006), *Genes and Immunity*, 7, 95-100.
28. Gladkevich A., Nelemans S. A., Kauffman H. F., Korf J., (2005), *Mediators of Inflammation*, 6, 317-330.
29. Steinke J. W., Rich S. S., Borish L., (2008), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 121, S384-387.
30. Vercelli D., (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116, 60-64.
31. Chaplin D. D., (2003), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, S442-459.
32. Faith A., Fernandez M. H., Caufield J., Loke T.-K., Corrigan C., O'Connor B., Lee T. H., Hawrylowicz C. M., (2008), *Allergy*, 63, 168-175.

33. Hammad H., Kool M., Soullié T., Narumiya S., Trottein F., Hoogsteden H. C., Lambrecht B. N., (2007), *JEM*, 204(2), 357-367.
34. Pawliczak R., Shelhamer J. H., (2003), *Allergy*, 58, 973-980.
35. El Bassam S., Pinsonneault S., Kornfeld H., Ren F., Menezes J., Laberge S., (2005), *Immunology*, 117, 89-96.
36. Grimbaldston M. A., Metz M., Yu M., Tsai M., Galli S. I., (2006), *Current Opinion in Immunology*, 18, 751-760.
37. Bruhns P., Front S., Daëron M., (2005), *Current Opinion in Immunology*, 17, 662-669.
38. Saito H., Abe J., Matsumoto K., (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116, 56-59.
39. Wang S. W., Oh C. K., H., Cho S. H., Hu G., Martin R. I., Demissie-Sanders S., Li K., Moyle M., Yao M., (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 287-294.
40. Okumura S., Sagara H., Fukuda T., Saito H., Okayama Y., (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115, 272-279.
41. Yuyama N., Davies D. E., Akaiwa M., et al., (2002), *Cytokine*, 19, 287-296.