

Astımda Genetik Faktörler ve Gen-Çevre Etkileşimi

Genetic Factors in Asthma and Gene-Environment Interaction

Doç. Ph. Dr. Çağatay KARAASLAN¹,
Doç. Ph. Dr. Esra BİRBEN²,
Prof. Dr. Can Ömer KALAYCI³

¹ Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Moleküler
Biyoloji Ana Bilim Dalı

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Allerji ve Astım Bilim Dalı

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Allerji ve Astım Bilim Dalı

**Yazışma Adresleri /Address for
Correspondence:**

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji
Ana Bilim Dalı, Beytepe-Ankara

Tel/phone: +90 312 297 80 19
mail: cagatayk@hacettepe.edu.tr

Anahtar Kelimeler:

Astım, epigenetik,
farmakogenetik, genetik.

Keywords:

Asthma, epigenetic, genetic,
pharmacogenetic

Geliş Tarihi - Received
15/12/2016
Kabul Tarihi - Accepted
07/01/2017

Öz

Astım genetik faktörlerin, çevresel faktörlerin ve epigenetik faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan hava yollarında daralma ve enflamasyonla karakterize bir hastalıktır. Astım kompleks hastalıkların tipik özelliklerini taşımaktadır. Yani astım, gelişiminde her birinin etkisi küçük olan birçok gendeki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Astım genetiğinde kullanılan tekniklerin kapasitesi yaygın genetik değişkenlikleri belirlemeyle sınırlıdır. Yaygın genetik değişkenlerin hastalık fenotipine katkıları ise oldukça azdır ve tek gen hastalıklarından elde edilen deneyimin ortaya koyduğu gibi nadir değişkenliklerin hastalık gelişimine olan etkileri oldukça fazladır.

Genetik çalışmalarda kullanılan teknolojiye gerçekleştirilen büyük ilerlemeler hastalığı daha iyi anlamamızı sağlamıştır. Ancak hala çözüm bekleyen konular vardır. Astım ve alerjik hastalıkların ardında yatan genetik faktörleri belirlemeye yönelik olarak yapılan tüm çalışmalar resmin tam olarak anlaşılabilmesi için çeşitli genler ve değişkenliklerin birbirleri, makro ve mikro çevre ile etkileşimlerinin ve epigenetik faktörlerin belirlenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Günümüzde, nadir görülen genetik değişkenliklerin, insersiyon ve delesyonların, hatta kopya sayısı değişikliklerinin belirlenmesine olanak sağlayan, tüm genomun veya protein kodlayan gen bölgelerinin tamamının yeniden dizilenmesi tekniği, astım gibi kompleks hastalıkların genetiğinin aydınlatılmasında yeni bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu teknolojiye “next generation sequencing” adı verilmektedir. Bu karmaşık etkileşimlerin belirlenmesi için geliştirilen yeni teknikler ve biyoinformatik analiz programları sayesinde, erken tanıya yönelik biyo-belirteçlerin bulunması ve bireysel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Bu derlemede astımda etkili olan genlerin keşfinde kullanılan yeni ve eski teknikler ve günümüzde astım genetiğinde hangi noktada olduğumuz anlatılacaktır. Ayrıca elde edilen bilgilerin uygulamaya nasıl aktarılacağı ve gelecekte neler yapılması gerektiği tartışılacaktır.

Abstract

Asthma develops as a result of complex interactions between environmental, genetic and epigenetic factors and is characterized by obstruction and inflammation in airways. Asthma has the typical features of complex diseases which means that the

disease expression is influenced by several genes with mild effects. The strategies used in studies of asthma genetics are restricted to the common variations in associated genes. The common variations have small effects on disease phenotypes and as we have learned from single gene disorders rare variants are associated with higher risks for disease.

Owing to the recent technological advances our understanding of the genetics of asthma has greatly improved. However there are still many problems. It has now become increasingly clear that for a thorough understanding of the whole picture behind the genetic factors that regulate asthma, it is absolutely necessary to consider the complex interactions between various genes and their variants, interactions between the genes and micro and macro-environment and epigenetic factors. Nowadays, the new tool for the studying complex disease such as asthma is re-sequencing of the whole genome which may reveal an association with the rare variants as well as insertions and deletions and copy number variations. This technology is termed as “next generation sequencing”. New techniques in defining these complicated interactions and powerful statistical tools to analyze the bioinformatics will open new doors in our approach to the early diagnosis, prevention and treatment of allergic diseases and asthma.

In this brief review, we will summarize old and new strategies for gene identification in asthma and discuss where we stand in asthma genetics. We will also elaborate on the implications of findings and what the future needs in the field are.

Giriş

Astım, çocuklarda ve erişkinlerde çeşitli klinik fenotiplerde kendini gösteren; genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği kompleks hastalıklardır (1). Birçok hastada hastalığın başlangıcı çocukluk yaşlarına dayanır. Allerji, astım ve astım benzeri semptomların ailesel geçiş gösterdiği uzun yıllardır bilinmekle beraber, allerjik hastalıkların genetiği ile ilgili çalışmalar oldukça yenidir. Toplum çalışmaları kalıtılabilirlik (heritability) oranının astımda % 36-79 arasında değiştiğini göstermiştir (2-5). Astımın tekrar eden hisilti ya da doktor tanılı astım olarak tanımlandığı ankete dayalı araştırmalara göre astımın dünya genelindeki sıklığı % 5-16 olarak belirlenmiştir (6). Bu oran ülkeler arasında astım sıklığının farklı olması ve teşhisin standardize olmaması nedeni ile değişebilmektedir. Son yıllarda özellikle gelişmiş toplumlarda astımın sıklığı giderek artmaktadır. Bir toplumda belir-

li bir genin genetik yapısının değişmesi ve bu değişimin hastalık sıklığında artış olarak yansması için en az birkeç nesil geçmesi gerekmektedir. Allerjik hastalıkların sıklığının popülasyonların genetik yapısındaki değişikliklere bağlı olarak değişmesinden çok daha hızlı bir şekilde artıyor olması bunun nedeninin çevresel faktörler olabileceğini düşündürmüştür.

İnsan genom projesi ile beraber, gelişmiş ve hızlı genetik tekniklerin ortaya çıkmasıyla astım patogenezinde oldukça önemli yolaklar keşfedilmiştir. Son on yılda gerçekleştirilen büyük ilerlemeye rağmen hala çözüm bekleyen konular vardır. Bunların başında astımda görülen fenotipik heterojenitenin nedeninin belirlenmesi ve genetik faktörlerle etkileşen çevresel ve gelişimsel faktörlerin hastalığa olan kişisel yatkınlıkları nasıl etkilediğinin anlaşılması gelir. Astımın genetik, çevresel ve gelişimsel faktörleri içeren kompleks bir hastalık olması, fenotip-genotip ilişkilendirme çalışmalarının farklı toplumlarda tekrar edilmesini oldukça güçleştirmektedir. Bu sorunların giderilebilmesi için genlerin keşfinde yeni yöntemlerin geliştirilmesi; çevre-gen, gen-gen etkileşimlerinin ve farklı fenotiplerin incelenmesinde daha etkin analizlerin kullanılması gereklidir.

Astım ve allerjik hastalıkların genetiği ile ilgili çalışmaların hedefleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Fiziopatolojik mekanizmaların saptanması,
2. Tedavide hedef moleküllerin belirlenmesi,
3. Özellikle tanı koymanın zor olduğu erken çocukluk çağında, pre-semptomatik dönemde veya erken semptomatik dönemde tanı konması. Buna dayanarak hastalık gelişimini engelleyecek koruyucu önlemler geliştirilmesi,
4. Hastalık şiddeti ve prognozu hakkında bilgi edinilmesi,
5. Hastaların genetik yapısına özgü tedavi yöntemlerinin saptanması (farmakogenetik).

Astımda Genetik Yaklaşımlar

1970’li yıllarda aday gen yaklaşımı ile başlayan genetik çalışmalar, daha sonraki yıllarda teknolojinin gelişimi ile yerini genom boyu bağlantı analizlerine ve daha sonra da GWAS (genome wide association study) adı verilen genom boyu ilişkilendirme çalışmalarına bırakmıştır. Günümüzde ise farklı toplumlarda gerçekleştirilen küçük GWAS çalışmalarının birleştirilerek yeniden analiz edildiği “meta analizler” ve tüm genomun yeniden dizilenmesine olanak tanıyan “yeni nesil DNA dizi analizi (next gene sequencing)” teknolojilerinin kullanıldığı yaklaşımlar önem kazanmaktadır. Bu tekniklerin avantaj ve dezavantajları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Aday Gen Yaklaşımı

Aday gen yaklaşımı hastalıklarla ilişkili genlerin belirlenmesinde kullanılan en basit yöntemdir. Bu, hipotez bağımlı bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda işlevsel açıdan astım ve allerjik hastalıkların patogenezinde rolü olabileceği düşünülen veya daha önceden hastalıkla olan ilişkisi gösterilmiş olan genler analiz edilir. Ayrıca sağlıklı dokuya kıyasla hastalıklı dokuda ifadesi değişen genler ve benzer patolojik mekanizmaları paylaşan tek gen hastalıkları ile ilişkilendirilmiş olan genler de aday gen olabilirler.

Bu yaklaşımda ilk olarak aday gendeki tek nükleotid polimorfizmi gibi genetik değişkenlikler belirlenir veya daha önceden belirlenmiş olan genetik değişkenlikler var ise bu değişkenliklerin allel veya genotip frekansları hasta ve kontrol örneklerinde kıyaslanarak hastalıkla veya solunum fonksiyonu, atopi, eozinofil sayısı, total ve spesifik IgE gibi hastalıkla ilgili değişkenlerle olan ilişkisi belirlenmeye çalışılır (7,8).

Bu yaklaşımın bazı sınırlamaları vardır. Örneğin, örneklem grubunun küçük olması, kontrol ve hasta grubunun yapısının yaş ve cinsiyet gibi özellikler yönünden farklı olması yanlış pozitif sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Küçük örneklem grubu olan çalışmalar ancak allel frekansı % 10-15'den daha büyük olan genetik değişkenliklerin hastalıkla olan ilişkisini gösterebilecek güçtedir. Çalışmaların çoğunun sonuçlarının tekrar edilememesi diğer önemli bir problemidir. Bu durum, çalışmalarda farklı allel setlerinin kullanılması, örneklem büyüklüklerinin farklı olması, farklı topluluklarda yapılan çalışmalarda çevresel faktörlerin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Aday gen yaklaşımının avantajı ise tüm genomu kapsayan bağlantı analizlerine kıyasla bu yaklaşımda akra-

ba olmayan astımlı ve kontrol vakaların toplanmasının aile toplamaktan daha kolay ve daha az maliyetli olmasıdır. Aynı sayıda birey ile çalışıldığında istatistiksel gücü, bağlantı analizlerine kıyasla daha fazladır. Bugüne kadar binden fazla çalışmada astım ve allerjik hastalıklarla yüzlerce gende yer alan polimorfizmler arasında ilişki araştırılmıştır. Bu yöntem kullanılarak T hücrelerin yaşamsallığı, gelişimi ve uyarılara cevabında rol oynayan çeşitli sitokinler ve sitokin-sinyal yollarında yer alan proteinler, mikrobial ürünleri tanıyan reseptörler, epitelyal bariyer fonksiyonunda ve doğal bağışıklıkta yer alan proteinler ve çevresel uyarılara yanıtta görev alan çok çeşitli proteinler belirlenmiştir. Astımla ilişkisi gösterilen moleküller arasında kromozom 5q bölgesindeki sitokin kümesi (IL-3, 4, 5, 9 ve 13); 6p bölgesindeki HLA ve TNF; 12p bölgesinde nitrik oksit ve 16p bölgesinde IL-4 reseptörü sayılabilir. IL-3, 4, 5, 9, 13 sitokin genleri, CD14 ve Beta 2 adrenerjik reseptör (ADRB2) genleri, HLA-G ve TNF ve kromozom 11q üzerindeki yüksek afiniteli IgE reseptörü (FCεRB) geni ile kromozom 16p üzerindeki IL-4 reseptör (IL4R) geninin on beşten fazla çalışmada astım ve çeşitli astım fenotipleriyle ilişkisi gösterilmiştir (9,10).

Filaggrin (filament-aggregating protein), epidermin kornifiye tabakasının en önemli bileşenlerinden biridir ve derinin dış etkenlere karşı engel işlevinin gerçekleştirilmesinde önemli rolü vardır. Hastalık patolojisindeki rolünden ve işlevinden dolayı allerjik hastalıklar için gerçekleştirilen genetik çalışmalarda aday gen olarak seçilmiştir. Özellikle atopik dermatiti bulunan vakalarda olmak üzere, iktiyozis vulgaris ile de ilişkili bulunmuştur. Sonraki çalışmalar bu gende yer alan mutasyonların yalnızca atopik dermatitle değil aynı zamanda astım ve allerjik rinitle de ilişkili olduğunu göstermiştir (11).

Tablo 1. Astım ve allerji çalışmalarında kullanılan genetik yaklaşımlar.

Metod	Üstünlükleri	Yetersizlikleri
Aday gen (1970 -)	Hipotez bağımlı Değerlendirmesi kolay Orta derecede etkili genleri saptar Örnekleme: Vaka-Kontrol	Bildiklerimizle sınırlı Yeni gen keşfedemez
Genome wide linkage (GWLS) 1980-1990	Hipotez gerektirmez Tüm genomu kapsar Yeni gen keşfi mümkün Nadir görülen risk allelerini saptar	Örnekleme: Aileler gerekir Orta derecede etkili genleri saptayamaz Düşük kesinlik
GWAS 2007-	Hipotez gerektirmez Tüm genomu kapsar Orta derecede etkili genleri saptar Örnekleme: Vaka-Kontrol	Çok büyük gruplar gerektirir Sık rastlanan genetik değişiklikleri saptayabilir
Next Gen Genom boyu yeniden dizileme	Tüm değişkenlikleri (nadir ve sık) ortaya koyar	Pahalı Çok büyük gruplar gerektirir İstatistikleri çok zor Yorumlaması çok zor

Günümüzde astım genetiği çalışmalarında terk edilmiş bir yöntemdir.

Genom Boyu Bağlantı (Linkage) Analizi

Tüm genomu kapsayan bağlantı analizleri ilgilenilen hastalığı taşıyan ailelerin birkaç kuşak boyunca genotipik olarak incelenmesini kapsar. Genom boyunca yayılmış olan 500 kadar genetik belirteç (marker) kullanılarak etkilenmiş aile bireyleri arasında, sıklığı beklenilenden daha fazla olan ortak bir allel bulmak amacıyla genotipleme yapılır. Bu çalışmalarda kuşaklar arasında genetik bilginin aktarılmasını takip için genomda yer alan kısa tekrar bölgeleri veya mikrosatellit adı verilen belirleyici DNA bölgeleri kullanılır. Hasta bireylerde, hastalıkla birlikte aktarıldığı düşünülen böyle bir bölge bulunduğu anda, bu bölge, içinde genin bulunabileceği daha dar bir alanın bulunabilmesi amacıyla daha yoğun belirteçler kullanılarak tekrar genotipleme yapılır ve bu işlem hastalıkla ilişkili olabilecek bir gen ya da gen bölgesi bulunana kadar devam eder. Bu işleme “pozisyonel klonlama” adı verilir. Bu yaklaşım ile yeni genlerin keşfi olasıdır ve önceden bir hipotez geliştirilmesine gerek yoktur. Bu yöntemle fenotipik etkisi yaygın olan alleller keşfedilebilir.

Farklı topluluklarda gerçekleştirilen tüm genomu kapsayan bağlantı analizleri astımla ilgili birçok bölge olduğunu ve bu bölgelerde yer alan birçok genin astım patogenezine üzerine küçük etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Pozisyonel klonlama metodu ile astımla ilişkisi belirlenen ilk gen bir disintegrin ve metalloproteinaz olan ADAM33 genidir (12). ADAM33 geni bronş düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenir ve akciğer fonksiyonları ve remodelling ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu yöntem kullanılarak tanımlanan diğer genler arasında kromozom 13q14 üzerinde total IgE ile ilgili bir bölge (PHF11); kromozom 2q14 de dipeptidil peptidaz (DPP10) IL-1 reseptör ilişkili kinaz M (IRAKM), kollajen geni 29 (COL29A1), kırılğan X mental retardasyon protein (FMR) ile bağlanan protein 2 (CYF1P2) genleri sayılabilir (13-19).

Aday gen çalışmaları gibi daha çok tarihsel önemi olan bir yöntemdir.

Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları (Genome Wide Association Studies-GWAS)

İnsan genom projesinin tamamlanmasından önce yeni genlerin keşfi için tüm genom boyunca yayılmış olan 500 kadar genetik belirteç kullanılırken, şimdi tüm genom boyunca yayılmış milyonlarca tek nükleotid değişimi taranabilmektedir. Bu yöntemde hasta ve sağlıklı bireyler arasında tek nükleotid değişimlerinin (single nucleotide polymorphism-SNP) sıklığı kıyaslanarak atopi ve astım-

la ilişkili değişkenlikler saptanır. Tüm genomu kapsayan bağlantı analizlerinde olduğu gibi hipotez gerektirmez. Ayrıca bu yöntemde ailelere gerek duyulmaması bağlantı analizlerine kıyasla bir avantajdır. Aday gen yaklaşımına olan üstünlüğü ise bu yöntemle yeni aday genlerin bulunabilmesidir. Ancak bu çalışmalarda hastalıkla ilişkili gen veya SNP'lerin belirlenmesi için aday gen yaklaşımına kıyasla oldukça fazla sayıda vaka ve kontrol örneğinin taranması gereklidir. Örneklem büyüklüğünün fazla olması toplum heterojenitesini artırır ve çevresel etkilerin çeşitlenmesine neden olur. Aday gen yaklaşımı ve aile çalışmalarından elde edilen pozitif bulgular, örneklem büyüklüğünün yeterli olmaması, toplumdaki tabaklaşmalar, örneklem seçiminde kullanılan fenotiplerin birbiriyle uyumsuz oluşu gibi nedenlerle farklı toplumlarda doğrulanamamıştır (20). GWAS çalışmalarının başlaması ile birlikte risk varyantlarının tekrar edilebilirlik oranı özellikle benzer etnik grupları içeren çalışmalarda artmıştır.

İlk GWAS 2007'de yayınlanmış ve bu çalışmada 994 astımlı ve 1243 sağlıklı kontrol örneğinde genom boyunca yayılmış olan 300.000'den fazla SNP'in taranmıştır. Bu çalışma sonucunda kromozom 17q12-q21 de yer alan ORMDL3, GSDMB ve ZPBP2 genleri astım ile ilişkilendirilmiştir. İleri çalışmalar 17q21 bölgesinde yer alan ORMDL3 genindeki genetik değişkenliklerin çocukluk çağı astımı ile kuvvetle ilişkili olduğu göstermiştir (21-23).

Bu güne kadar astımla ilişkili birçok GWAS gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda 1000'e yakın aday gen belirlenmiştir. GWAS çalışmaları astımla ilgili gen bölgelerinin kromozom 1 üzerinde CHI3L1 (YKL40 olarak da bilinmektedir), IL6R ve DENND1B, kromozom 2 üzerinde IL1RL1-IL18R1, kromozom 5 üzerinde PDE4D ve RAD50-IL13, kromozom 6 'da HLA-DQ, kromozom 9'da IL33, kromozom 15 üzerinde SMAD3, kromozom 17'de ORMDL3-GSDMB, kromozom 22' de ise IL2RB genlerinin olduğu bölgelerde ya da yakınlarında yer aldığı göstermiştir. Kromozom 1 üzerindeki PYHIN1 ise sadece Afrikalı-Amerikalı'larda astımla ilişkili olarak bulunmuştur (24). Bu genlerin çoğu tek bir çalışmada gösterilmiş, başka çalışmalarda tekrar edilememiş ancak sadece kromozom 17'de ORMDL3-GSDMB gen bölgesi yapılan pek çok çalışmada çocukluk çağı astımı ile ilişkili bulunmuştur.

GWAS analizlerinin çoğu hispanik kökenli olmayan beyaz ırkta gerçekleştirilmiş olup, Afrika kökenli bireylerde ve diğer Asya kökenli bireylerde yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Afrika kökenli Amerikalılarda ya-

pılan bir GWAS sonucunda koromzom 5q33 üzerinde ADRA1B (α -1B-adrenerjik reseptör), koromzom 20pter-p12 üzerinde PRNP (prion-ilişkili protein) ve kromozom 2q12.3-q14.2 DPP10 (dipeptidil peptidaz 10) genleri astımla ilişkili olarak tanımlanmıştır (25). Sleiman ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği her gün inhale kortikosteroid tedavisine ihtiyaç duyan persistan astımı olan çocukları ve kontrol grubunu içeren bir diğer GWAS ise CRB1 ve DENND1B genlerini içeren kromozom lüzerindeki q31 bölgesinin astımla ilişkisi olduğunu göstermiştir (26). DENND1B dendritik hücrelerde eksprese olur ve T hücrelerini aktive eder. Son zamanlarda yapılan konsorsiyum temelli 10365 vaka ve 16110 kontrolü içeren büyük ölçekli GWAS çalışmasında IL1RL1-IL18R1, HLA-DQ, IL33, SMAD3, ORMDL3-GSDMB ve IL2RB genlerini içeren 6 gen bölgesi astımla ilişkili bulunmuştur (27). IL1RL1'in ligandı olan IL-33'ün Th2 ilişkili hastalık modellerinde önemli olduğu ve bu molekülün IL33 reseptörü aracılığı ile T h2 yardımcı hücrelerden sitokin sentezini uyararak nemotodlara karşı konakçı savunmasında önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu sitokin doğal lenfoid hücreleri (ILCs) uyaran anahtar moleküldür (28,29). Bu çalışmalar IL33 yolağında yer alan moleküllerin bronşial astımda önemli olabileceğini düşündürmektedir.

2011 yılında farklı Avrupa kökenli Amerikalıları, Afrika kökenli Amerikalıları veya Afrika kökenli Karibbe-anları ve Latin kökenlileri içeren kuzey Amerika toplumunda gerçekleştirilmiş olan GWAS sonucunda dördü daha önce tanımlanmış ve biri yeni olan beş gen bölgesi rapor edilmiştir. Bilinen dört bölge kromozom 17q21, IL1RL1 geni yakını, TSLP ve IL33 bölgeleridir. Yeni tanımlanan lokus PYHIN1 ise sadece Afrika kökenlilere özgül olarak bulunmuştur (30).

Asyalı kökenli erişkin ve çocuklar da gerçekleştirilen iki ayrı GWAS analizi sonucunda kromozom 6p21 üzerindeki majör histokompatibilite kompleks gen bölgesindeki (HLA bölgesi) genetik varyantların astım riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. 2011 yılında Japon popülasyonunda gerçekleştirilen 7,171 erişkin astımlı ve 27,912 kontrol bireyi içeren analiz sonucunda 5 gen bölgesi astıma yakınlıkla ilişkili bulunmuş olup, En kuvvetli bağlantı kromozom 6'da MHC kompleksinde yer alan ve daha önce akciğer fonksiyonu ile ilişkili olarak gerçekleştirilmiş olan ve FEV1/FVC ile ilişkilendirilmiş olan rs2070600 ile yakın bir pozisyonda yer alan rs404860 arasında gösterilmiştir. Diğer bölge ise TSLP genini içeren kromozom 5q22 bölgesidir. TSLP/WDR36 lokusu tüm etnik gruplarda

bronşiyal astımla ilişkili bulunmuştur (30). Bir diğer bağlantı bölgesi kromozom 4q31 üzerinde USP38-GAB1 genini içeren bölgedir. USP38 ubiquitin-spesifik peptidaz 38'i kodlar ancak fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir, GAB1 ise iskelet adaptör proteindir ve IL-3, IL-6, interferon α ve γ reseptörleri ve B-cell ve T-cell reseptörleri tarafından aktive edilen sinyal yollarında rol alır. Kromozom 10p14 bölgesi ise Th2 hücrelerin farklılaşmasında rolü olan transkripsiyon faktörü GATA3 geninin yakınında yer alır. Kromozom 12q13 bölgesi oldukça zengin bir gen bölgesidir ve IKZF4 (EOS genini içerir. Bu genin 2 kb yukarısında yer alan bölge en yüksek pik bölgesidir ve bu bölge Regülatuar T hücrelerinin farklılaşmasında rol oynamaktadır (31). Bundan başka Çin popülasyonunda 710 astımlı v ve 656 kontrolde yapılan replikasyon çalışmasında kromozom 17q21'in ORMDL3/GSDMB bölgesinde yer alan özgün varyantlar test edilmiştir ve elde edilen ilave kanıtlar bu lokusun birçok etnik grupta erişkin yaşta astım başlangıcıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (32). Ayrıntılı olarak fenotiplendirilmiş olan 473 Hispanik olmayan beyaz erişkin vakadan oluşan longitudinal kohortta (TENOR çalışması) ve kontrol grubunda astım yakınlığı ve şiddeti ile ilişkili GWAS çalışması sonucunda kromozom 5q31.1 de yer alan RAD50/IL13 bölgesindeki çeşitli varyantlar astım yakınlığını ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (33,34). Ayrıca bu çalışmada daha önce birçok aday gen çalışması ve GWAS analizlerinde de gösterilmiş olan kromozom 6p21.3 üzerindeki HLA-DR/DQ bölgesindeki varyantların astımla olan ilişkisi de doğrulanmıştır.

Son yıllarda farklı toplumlarda yapılan GWAS çalışmalarında yeni aday genler tanımlanmıştır. Brezilya'dan 1246 çocuğun dahil edildiği çalışmada yaklaşık 2 milyon otozomal SNP çocukluk çağı astımı ve semptomlar arasındaki ilişki yönünden test edilmiştir. Çalışma sonucunda iki kromozomal bölge genom boyu anlamlılığa ulaşmıştır. İlk bölge; DAD1 ve OXA1L genlerine komşu 14q11 bölgesi (rs1999071), ikinci bölge ise FOXB1 geninin yakındaki 15q22 bölgesidir (rs10519031) (35).

2016 yılında 1180 hasta ve 1915 kontrol bireyin yer aldığı İspanya'da yapılan bir çalışmada BMPR2 geninde rs17199249 ve ADAMTS9 rs9866261 olmak üzere iki bölge anlamlı olarak bulunmuştur (36).

Astımla ilgili BMI artışıyla ilişkili genetik varyantları tanımlamak için yapılan GWAS çalışmasında 2474 birey ve 257 astımlı yer almıştır. Tekrar çalışmasında ise 1408 birey ve 382 astımlı yer almıştır. Bu çalışmada

17q21.2 bölgesinde 7 SNP'in astımlılarda artmış BMI ile ilişkisi belirlenmiştir (37).

Meta Analizler

Genom boyu ilişkilendirme analizlerinde çok sayıda genetik değişkenliğin bir arada değerlendirilmesinden dolayı istatistiksel bir anlam yakalayabilmek için örneklem sayısının oldukça büyük olmasının gerekliliği, bu yaklaşımda karşılaşılan en büyük zorluktur. Bunun üstesinden gelebilmek için son yıllarda farklı topluluklarda veya farklı zamanlarda yapılan küçük GWAS çalışmaları birleştirilerek yeniden analiz edilmektedir. Bu yöntem "meta analiz" adı verilir.

Yakın zamanda astımla ilgili iki meta analiz çalışması sonucu yayımlanmıştır: GABRIEL ve EVE. GABRIEL konsorsiyumu Avrupa kökenli örnekleri içerir. Bu meta-analiz çalışmasında 23 küçük GWAS çalışmasında kullanılan toplam 10.365 vaka ve 16.110 kontrol örneği 500.000'den fazla SNP için analiz edilmiştir. IL18R1, IL2RB, HLA-DQ, ORMDL3 Ğ GSDML, IL 33 ve SMAD3 genlerindeki bazı SNP'ler astım ile ilişkili bulunmuştur (27).

EVE konsorsiyumu farklı etnik gruplardan örnekleri içerir. Bu çalışmada toplam 3246 vaka, 3385 kontrol örneği ve 2115 hasta-ebeveyn üçlüsü 2 milyon SNP için analiz edilmiştir. Kromozom 2q12 üzerindeki IL1RL1 geni, kromozom 5q22.1 üzerindeki TSLP geni ve 17q21 üzerindeki ORMDL3 Ğ GSDML ve 9p24 üzerindeki IL-33 geni astımla ilişkili bulunmuştur. 1q23 üzerinde yer alan PYHIN1 geni ise sadece Afrika kökenli kişilerde astımla ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada belirlenen 5 gen bölgesi Avrupa- Amerikalı, Afrika-Amerikalı, Afrika-Karayipli ve Latin kökenli 12649 bireyden oluşan örneklem grubunda tekrar edilmiştir (30).

GWA çalışmalarının tümünde 17q21 bölgesindeki ORMDL3 geninin, astımla tutarlı ve anlamlı olarak ilişkisinin gösterilmesi dikkat çekicidir. 17q21 lokusu bu bölgede yer alan genetik varyasyonların çocukluk çağı astımıyla kuvvetli bir şekilde bağlantı göstermesi nedeniyle araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Bu bölgede yer alan ORMDL3 geni, astım patogeneziyle ilişkili olabilecek farklı hücresel süreçlerde fonksiyon göstermektedir. Bu süreçlere, havayolu remodelingiyle ilişkili katlanmamış protein cevabının (UPR) bozukluğu ve bronşial hiperreaktivite üzerinde ORMDL3- bozulmuş sifingolipit sentezinin etkisi sayılabilir.

Avrupa genel popülasyonunda akciğer fonksiyonu ile ilişkili genlerin belirlenebilmesi için iki geniş meta-analiz yapılmıştır. CHARGE ve SpiroMeta konsorsiyumlarının ikisinde de akciğer fonksiyon ölçümleri FEV1 ya da

FEV1/FCV oranı ile HHIP (hedgehog interacting protein) geni arasında ve ayrıca diğer onbir genomik bölge arasında ilişki gösterilmiştir (Tablo 2) (38,39).

Total IgE, eozinofil sayısı gibi diğer astım fenotipleri ve astım tedavi yanıtını belirleyen genetiketmenleri belirlemeye yönelik olarak dizayn edilen çeşitli GWAS analizlerinde IL6R, STAT6, FCER1A, IL5, IL1L1 gibi birçok aday gen belirlenmiştir. Bu çalışmalar ve belirlenen genler Tablo 2'de özetlenmektedir.

ADAM 33 genindeki varyantların astım ile ilişkisini araştıran 29 vaka-kontrol çalışmasını ve bu çalışmalarda astımla ilişkisi gösterilmiş olan 14 SNP'i içeren meta analiz sonucuna göre T1, V4, F+1 and T+1 polimorfizmleri çalışmalarda yer alan tüm toplumlarda astımla ilişkili olarak bulunmuştur. Etnik kökene göre yapılan alt grup analizi T1, V4, F+1 and T2 polimorfizmlerinin sadece Asya kökenlilerde astımla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ADAM33 geninde yer alan T1, V4, F+1, T2 ve T+1 polimorfizmlerinin özellikle Asya toplumunda astım için risk faktörü olduğunu göstermektedir (41).

İnflamasyon cevabını düzenleyen faktörler astım patogeneziinde önemli rol oynarlar. Yakın zamanda yapılan çok sayıda çalışma sitokinler ve bunların reseptörlerindeki gen varyasyonlarının astım riskiyle ilişkili olduğunu göstermiştir.

TNF- α polimorfizmlerinin astım riski ile ilişkisinin değerlendirildiği bir meta analizde 54 çalışma yer almıştır. TNF- α geni promotorunda yer alan -308A/G polimorfizmi ile astıma yatkınlık arasında dominant model kullanıldığında (AA+AG ve GG kıyaslandığında) ilişki (OR, 1.39; P<.001) bulunmuştur. Altgrup analizleri bu polimorfizmin beyaz ırkta astım için bir risk faktörü, atopik astım, çocukluk çağı ve erişkin astım için de bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Recessif model kullanıldığında TNF- α genindeki -857C/T G polimorfizmi astım için risk faktörü olarak bulunmuştur. (OR, 1.25; P<.001). Özellikle Asyalılarda (OR, 1.23; P=.004) ve atopik bireylerde (OR, 1.33; P<.001) bu risk daha fazladır. TNF- α -238A/G polimorfizmi ile astım arasında bir ilişki bulunmazken TNF- α -1031T/C ve -863C/A polimorfizmleri ile astım riski arasındaki ilişkiyi analiz edecek kadar yeterli veri elde edilememiştir. Bu meta-analizi sonuçları TNF- α genindeki -308A/G ve -857C/T polimorfizmlerinin astım için bir risk olabileceğini göstermektedir (42).

İnterlökin-10 promotor polimorfizmleri ile astıma yatkınlık arasındaki ilişkinin araştırıldığı total 4,716 astımlı ve 5,093 kontrol örneği içeren meta analiz gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar bilgisayar taraması ile seçilmiş ve

Tablo 2. Farklı astım fenotipleri ile ilişkili GWAS çalışmaları.

Özellik	Genler	Referanslar
Akciğer fonksiyon ölçümleri (FEV1/FVC veya FEV1)		
Genel Popülasyon	HHIP, GPR126, ADAM19, AGER/PPT2, FAM13A, PTCH1, PID1, HTR4, GSTCD, TNS1, NOTCH4/AGER/PPT2, THSD4I, NTS12/ GSTCD/NPNT, MFAP2, TGFB2, HDAC4, RARB, MECOM, SPATA9, ARMC2, NCR3, ZKSCAN3, CDC123, C10orf11, LRP1, CCDC38, MMP15, CFDP1 ve KCNE2	Wilk 2009, Repapi 2009, Hancock2009, Artigas 2011
Astım Popülasyonu	HHIP, IL6R	Li 2011, Hawkins 2012
Total serum/plazma IgE düzeyleri		
Genel Popülasyon	STAT6, FCER1A, IL13/RAD50	Weidinger 2008 Granada 2011
Astım Popülasyonu	HLA-DR, STAT6, FCER1A, IL13/RAD50, C11orf30-LRRC32	Moffatt 2010, Li 2011
Eozinofil düzeyleri		
Genel Popülasyon	IL1RL1, IKZF2, IL5, SH2B3	Gudbjartsson 2009
Atopik koşul	TSLP/WDR36(Eosinophilic esophagitis) WDR36, IL33, MYB (Eosinophil levels and atopic asthma)	Rothberg 2010, Gudbjartsson 2009
Astım tedavisine yanıt		
İnhale korikosteroid	GLCCI1	Tantisira 2011

birleştirilmiş OR ve %95 CI değerleri çalışmalar arası heterojeniteye bağlı olarak rastgele etki ve sabit etki modelleri kullanılarak belirlenmiştir. Alt grup analizleri ise yaş, etnik köken ve atopi durumlarına göre yapılmıştır. IL-10 geni promotöründe yer alan -1082 ve -592 polimorfizmleri ile astıma yatkınlık arasında bağlantı olduğu bulunmuştur. Fakat -819T/C polimorfizmi ile astım arasında bir ilişki gösterilememiştir (43).

Vitamin D receptor (VDR) polimorfizmleri ve astım riski arasında ilişkiyi araştıran çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. BU çalışmada VDR geninde yer alan TaqI, BsmI, ApaI ve FokI VDR polimorfizmleri ile astım arasındaki ilişkilendirme çalışmaları sonuçları meta analizle değerlendirilmiştir. Meta analizde sekiz vaka kontrol çalışmasında yer alan toplam 2,097 vaka ve 1,968 kontrol değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda kodominant modelde TaqI ve Bsm I polimorfizmleri ve astım riski arasında istatistiksel açıdan anlamlı (Taq I için OR 1.488; P = 0.040 ve Bsm I için OR 2.017 ; P = 0.017) ilişki bulunmuştur. Alt grup analizlerinde Fok I polimorfizmi ile astım riski arasında cinsiyet ve yaşa bağlı ilişki bulunmuştur (sırasıyla P = 0.035 ve 0.013). ApaI polimorfizmi ve astım arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (44).

Yapılan genetik çalışmaların çoğunda RANTES (Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted) genindeki -28C/G ve -403G/A polimorfizmleri ile

astım riski arasında ilişki bulunmuştur. Ancak bazı çalışmalarda bu doğrulanamamıştır. 1990 ile 2014 yılları arasında yapılan çalışmaların meta analizi yapılmıştır. Bu analizde -28C/G polimorfizmi için 2103 vaka ve 2876 kontrolü içeren 9 çalışma ve -403 G/A polimorfizmi için ise toplam 2015 vaka ve 1909 kontrolü içeren 11 çalışma yer almıştır. Çalışmaları içeren tüm popülasyonlar bir arada analiz edildiğinde 28C/G polimorfizmleri ile astım arasında bir ilişki bulunamamıştır. Alt grup analizlerinde ise -28G alleli çocuklarda astım için artmış risk faktörü olarak bulunmuştur. Etnik kökene göre yapılan analizde ise özellikle Asya kökenli çocuklar için risk faktörü olduğu beyaz ırk için olmadığı gösterilmiştir. 403G/A polimorfizminin meta-analizi sonucunda bu polimorfizmle astım arasında ilişki doğrulanamamıştır (45).

Son yıllarda yapılan çalışmalar IL-18 geninde yer alan -607C/A ve 137G/C polimorfizmler ile allerjik hastalık riski arasında bağlantı gösterilmiştir. Bu meta analiz 21 ayrı çalışmada yer alan toplam 5331 vaka ve 9658 kontrol örneğini içermektedir. Alt grup analizlerinde IL-18 -607C/A polimorfizmi heterozigot durumda atopik astım için azalmış risk ile ilişkili bulunmuştur (46).

Astım riski ve GSTM1 ve GSTT1 delesyon polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı meta analizde GSTM1 polimorfizmi totalde 3680 vaka ve 4350 kont-

rol örneğini içeren 26 çalışma ve GSTT1 polimorfizmi ise 3167 vaka ve 3209 kontrolden oluşan 22 çalışma yer almıştır. Birleştirilmiş verilerde null genotip ile yabancı tip allele karşılaştırılmıştır. Tüm populasyonlar birleştirildiğinde hem GSTM1 hem de GSTT1 polimorfizmleri (null allele) astımla ilişkili bulunmuştur. Yaşa bağlı alt grup analizi sonucunda GSTT1 sadece çocuklarda anlamlı bulunurken GSTM1 ise hem çocuklarda hem de erişkinlerde anlamlı bulunmuştur. Etnik kökene göre yapılan analiz sonucunda ise GSTM1 polimorfizmi Avrupa, Afrika ve Latin Amerika kökenli olanlarda astımla ilişkili bulunmuştur. GSTT1 polimorfizmi ise sadece Asyalılarda risk faktörü olarak bulunmuştur (47).

Farklı toplumlarda 1996-2013 yılları arasında IL-1 β (-511C/T) ve /veya IL-1RA polimorfizmiyle (rs2234678) astım riski arasında ilişki araştırılmıştır. He Y ve arkadaşları tarafından IL-1 β ve astım riski arasında ilişkinin araştırıldığı meta analize; EMBASE, Pub Med, MEDLINE, CBMDisc, ISI Web of Knowledge, CNKI, and Google Scholar Search databazları kullanılarak seçilen ve çalışma kriterlerine uyan 15 çalışma (327 çalışmadan) dahil edilmiştir. Meta analiz sonucu IL-1 β (-511C/T) polimorfizmiyle astım duyarlılığı arasında ilişki bulunamamış; IL-1RA polimorfizmiyle astım arasında anlamlı ilişki gösterilmiştir (48).

Genetik Çalışmalarda Karşılaşılan Zorluklar

Diğer kompleks hastalıklarda olduğu gibi alerjik hastalıkların genetik çalışmalarında karşılaşılan güçlüklerin başında ilişkilendirme çalışmalarında elde edilen verilerin farklı topluluklarda tekrar edilememesi gelir. Örneğin ADAM33'ün astım ile bağlantısını kuran ilk çalışmadan sonra bu molekülün astım ile ilişkisini araştıran çalışmalar tutarlı bulgular ortaya koymamıştır. IL-4,IL-13, CD14, ADBR2, TNF α gibi en çok tekrar edilen genlerde bile çok az sayıda çalışmada bile olsa bu ilişki gösterilememiştir. Bu durumun sebepleri arasında ilk çalışmada hatalı bulguların elde edilmesi; tekrar çalışmalarında yeterli istatistiksel gücün olmaması; çalışılan topluluklardaki etnik karışımların olması sayılabilir. Bunlardan daha da önemlisi, farklı topluluklar arasındaki genetik ve fenotipik heterojenite ve farklı çevresel etkileşimler bu sonuçlara yol açabilir.

Gen-Gen ve Gen-Çevre Etkileşimleri

Genler ve çevre arasındaki etkileşimler çeşitli epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Çalışmalar aynı genetik değişkenliğin çevresel kar-

şılaşmadaki farklılıklara bağlı olarak farklı klinik fenotiplerde ortaya çıktığını göstermektedir. Örneğin ORMDL3 genindeki bir SNP yalnızca erken başlangıç gösteren astımda tütün dumanı ile karşılaşan bireylerde artmış astım riski ile ilişkili bulunmuştur (49).

Gen-çevre etkileşimini çalışmak için en iyi modellerden birisi de endotoksin karşılaşmasıdır. Endotoksin gram-negatif bakterilerin hücre membranında yer alan önemli bir bileşendir ve her yerde yaygın olarak bulunur. Endotoksin yolağında yer alan CD14 genindeki genetik değişkenlikler birçok çalışmada çeşitli astım fenotipleri ile ilişkili bulunmuştur (50-52).

Astımla ilişkili olduğu bulunan genlerin tek tek etkilerinin hastalık fenotipinin açıklanmasında çok az etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ancak aynı yolda yer alan ve birbirlerine etki eden genlerin bir arada değerlendirildiği çalışmalarda, bu etkinin bireysel etkiler ile kıyaslandığında 10-20 kez arttığı ortaya konmuştur. Örneğin, Alman çocuklarında yapılan geniş bir çalışmada IL-4, IL-13, IL4R ve STAT6 genlerinde yer alan polimorfizmler basamak basamak kombine edilerek analiz edildiğinde herhangi bir SNP'in maksimum etkisine kıyasla kombinasyonların yüksek serum IgE'si riskini 10.8 kat astım gelişme riskini ise 16.8 kat arttığı gösterilmiştir (53). Astımla ilişkili olduğu gözlemlenen diğer gen-gen etkileşimleri Korelilerde gösterilen IL9 ve IL9R gen polimorfizmleri (54), spesifik IgE sentezinde rol oynayan TGFBR2 ve FOXP3 etkileşimi (55) ve Latin kökenlilerde belirlenen LTA4H ve ALOX5 AP gen etkileşimleri (56) olarak özetlenebilir.

Epigenetik

Çevresel faktörler genetik dizide değişikliğe neden olmaksızın genlerin ifadesinde değişikliğe sebep olabilir. Bu tip değişimler epigenetik değişiklikler olarak isimlendirilir. Bu değişiklikler çevresel etkenlere bağlı olarak sitozin-guanin nükleotidlerinden (CpG adacıkları) DNA'nın metillenmesindeki değişiklikler, kromatin yapısında meydana gelen değişiklikler ve mikro RNA tarafından genlerin sessizleştirilmesi şeklinde olabilmektedir. Bu mekanizmalar, CpG nükleotidlerinin bulunduğu yerlere transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek, histon kuyruklarının metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitilasyonu ile kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi veya mRNA'nın 3' ucunda yer alan ve proteine dönüşmeyen bölgeye mikro RNA'ların bağlanması ile hedef mRNA'nın yıkımı ile genin ifade edilmesini ve proteine dönüşümünü düzenleyen mekanizma-

lardır. Bu değişiklikler çoğunlukla sadece etkilenen bireye özgüdür, kalıcı değildir ve geri dönüştürülebilir, ancak DNA'nın metilasyonunda "genetik imprinting" adı verilen mekanizma ile nesilden nesile aktarılabilir. Epigenetik, DNA yapısında meydana gelen bu tür değişikliklerin hastalıklardaki rolünü inceleyen bilim dalıdır.

Epigenetik işaretler çevresel ajanlara maruziyetten, diyetten, yaşlanma sürecinden kolaylıkla etkilenebilmektedir. Bu çevresel faktörlerin içinde çevresel maruziyet, diyet ve besinler yer almaktadır. Bunlar diyetle alınan folik asit, B12, B6, B2 vitaminleri ve çinko gibi metil donorları ve kofaktörler olabilmektedir. Bunlar DNA'nın metilasyonunda görev almaktadır ve allerjik hastalıklar için genetik yatkınlığı değiştirebilmektedirler. Erken çocukluk çağında bu tip çevresel maruziyetler daha sonra hayat boyu kalıcı olabilecek genetik değişikliklere neden olabilir. Astımlılarda gerçekleştirilen bir çalışmada kontrollerle karşılaştırıldığında astımlı kişilerin biyopsi örneklerinde histonasetil transferaz (HAT) aktivitesinin artmış olduğu buna karşın histon deasetilaz (HDAC) aktivitesinin azalmış olduğu bulunmuştur. Bu astımda görülen birçok inflamatuvar genin ekspresyonundaki artışın bir nedeni olabilir. Bu hastalarda kortikosteroidlerin kullanımının HAT ve HDAC aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Bu da steroidlerin enflamasyonu azaltmasının açıklaması olabilir (57). Astımda hastalar arasındaki heterojenite oldukça fazladır ve bu durumu sadece genlerdeki varyasyonlarla açıklamak mümkün değildir. Bunu gen-çevre etkileşimleri ile açıklamak daha doğru bir yaklaşımdır. Bu etkileşimler epigenetik mekanizmalarla açıklanabilmektedir.

Son yıllarda astım ve allerjik fenotiplerde epigenetik mekanizmaların etkilerini ortaya çıkarmaya yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Hava kirliliği ve sigara dumanına maruziyetin astım gelişimine neden olduğu ve epigenomu etkilediği gösterilmiştir. Boston'da yaşayan 718 erişkin bireyin periferik kan örnekleri kullanılarak yapılan bir çalışmada havada bulunan çapı 2,5 mikrondan az olan kirleticilere (PM_{2,5}) maruziyetinin DNA'nın genel metilasyon profilinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (58). Diğer bir hava kirletici olan dizel egzoz partikülleri (DEP)'nin de astımla ilişkili çeşitli genlerde epigenetik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Farelerde yapılan deneylerde DEP maruziyetinin INF- γ promotorunda hipermetilasyona neden olurken IL-4 promotorunda metilasyonda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (59). Sigara kullanan ve sigara kullanmayan sağlıklı bireylerin akciğer biyopsi örnekleri ve BAL örneklerinden elde edilen alveolar makrofaj örnekleri ile yapılan bir

çalışmada HDAC2 gen ekspresyonu ve aktivitesinde azalma, buna karşın IL-1 β ile indüklenen TNF- α gibi inflamatuvar mediyatörlerin sentezinde artış belirlenmiştir (60).

Bir kohort çalışmasında ise hamilelik sırasında çiftlikte çalışarak mikroplara maruziyetin yenidoğan kordon kanında Treg fonksiyonunda artış, FOXP3 ekspresyonunda artış ve DNA demetilasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (61). Munthe-Kaas ve arkadaşları CD14 geninin metilasyonunun yaşa bağlı olarak arttığını; yaşamın ilk iki yılında üç SNP'in serum sCD14 düzeyini etkilediğini, ancak 10 yaşında ise sadece tek bir SNP için bu ilişkinin devam ettiğini; 10 yaşında ise genin metilasyon oranı ile serum sCD14 seviyeleri arasında ters bir orantının olduğunu bildirmişlerdir (62).

Son yıllarda miRNAların astım ve allerjik hastalıklardaki etkisini belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tsitsiou ve arkadaşları ağır astımlı ve ağır olmayan astımlı bireylerin periferik kan CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde eksprese olan miRNAları mikroarray yöntemi ile belirlemeye çalışmışlar ve sadece CD8+ T hücrelerinde ağır astımlılarda ağır olmayan astımlılara kıyasla büyük fark bulmuşlardır (63).

Hamilelik süresince sigara kullanımının miR-16, miR-21 ve miR-146a gibi çeşitli miRNAların ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir (64).

Astım ve allerjik hastalıkların gelişiminde epigenetik mekanizmaların rolüne dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Bugüne kadar hava kirliliği, sigara dumanına maruziyet, diyet gibi çeşitli çevresel faktörlerin astım ve atopi ile ilişkili olduğu ve anne karnında ve yaşamın erken dönemindeki maruziyetlerin immün sistemin şekillenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Bundan sonraki çalışmaların erken dönemde astım ve atopi gelişimi ile ilgili epigenetik risk faktörlerinin belirlenmesi ve hastalık gelişiminin önlenmesine yönelik epigenetik mekanizmaların geliştirilmesi olmalıdır.

Astımda Farmakogenetik Çalışmalar

Genel anlamda "farmakogenetik" terimi herhangi bir farmakolojik ajana olan yanıtın genetik belirteçlerini tanımlar. Farklı ırklardan veya etnik kökenden gelen kişilere yönelik bireye özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini amaçlamaktadır. Farklı genetik kökenlerden gelen kişilerin genomlarında yer alan varyasyonlar kullanılan yaygın tedavi yöntemlerine olan cevapta farklılıklar yaratabilmektedir. Astım farmakogenetiği üzerine çalışmalar ilaç hedeflerindeki değişiklikler üzerine yoğunlaşmıştır. Astım farmakogenetiği çalışmalarının amacı, ge-

netik yapılarına bakarak hangi bireylerin tedaviye iyi veya kötü yanıt vereceğinin saptanmasıdır. ADRB2 ve lökotrien sentez genlerindeki (ALOX5, LTC4S), polimorfizmlerin tedavi yanıtını etkileyebileceği öne sürülmüştür.

Kısa etkili β 2-agonistleri astım için en yaygın reçete edilen ilaçlardır ve geri dönüşlü hava yolu daralması için en etkilisidir. Uzun etkili β 2-agonistleri ilave astım kontrolü için ICS'lerle birlikte kullanılmaktadır. Hem SABA hem de LABA alt solunum yolundaki düz kas hücreleri üzerinde yer alan β 2- adrenerjik reseptörlere (β 2-ARs) bağlanırlar.

ADRB2 geninde 49 farklı polimorfizm belirlenmiş olmasına rağmen en çok çalışılan polimorfizm Gly16Arg değişimidir. Minör allel frakansı atasal kökene göre değişmekle birlikte Afrika ve Asya kökenlilerde daha yaygındır. İn vitro olarak β agonistlerle uyarımda Gly 16 allelini taşıyanlarda reseptör negatif yönde regüle olmaktadır. BARGE (Beta Agonist Response by Genotype) çalışmasında Arg16 homozigot olan 37 kişi ve Gly16 homozigot olan 41 kişi 16 hafta süre ile düzenli olarak albuterol veya plasebo kullanmak üzere randomize edilmiş ve Arg16 homozigotlarda solunum fonksiyonları ve semptomlar açısından bir düzelme gözlemlenmez iken Gly 16 olanlarda hem solunum fonksiyonlarında düzelme hem de semptomlarda düzelme gözlemlenmiştir (65).

PACMAN kohort çalışmasında Arg16 genotiple ICS ve LABA tedavisi arasındaki ilişki araştırılmış; Arg 16 homozigotların kombine LABA ve ICS tedavisinde artmış eksaserebasyon riskine sahip olduğu gösterilmiştir (66).

Çalışmalar sadece ADRB2 ile sınırlı kalmayıp yakın dönemde SABA ve LABA ile ilişkili farklı genlerde yeni varyantlar tanımlanmıştır. 724 bireyin 444,088 SNP incelendiği SNP Health Association Resource (SHARe) çalışmasında, ASB3/SOCS geninde rs350729, rs1840321, rs1384918 ve rs1319797 varyantlarıyla bronkodilatör cevabı (BDR) arasında ilişki gösterilmiştir (67). Padhuka-sahasram ve arkadaşları SABA ilaç yanıtı üzerine etkili olan varyantları araştırdıkları GWAS çalışmalarında, SPATA13-AS1 genini ile BDR arasında anlamlı olarak ilişkili bulmuşlardır (68). 1782 Latin çocuğun katılımıyla başlayan ve replikasyon çalışması için 531 çocuğun katıldığı GWAS çalışmasında 16 nadir varyant BDR ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur. Bu varyantların ikisi bronş epitel hücrelerinin sitoplazma ve membranında ifade olan SLC22A15 genindeki rs1281748, rs1281743 varyantlarıdır (69).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar ICS tedavisiyle ilgili çok sayıda tek nükleotid değişikliği tanımlamıştır. HDAC2 geninde rs3757016, COL2A1 geninde rs2276458,

rs2276455, rs2276454 ve yine CRHR1 geninde rs739645, rs1876831, rs1876829, rs1876828 varyantlarının ICS tedavisiyle anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (70). Tantisira ve arkadaşları erişkin ve çocukların bulunduğu üç bağımsız kohortta randomize edilmiş ICS tedavi cevabını etkileyen varyantları araştırdığı çalışmasında corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) geninde rs242941 ve rs1876828 varyantlarını ICS'nin terapötik cevabıyla ilişkili olarak buldu (71). Son yıllarda yine Tantisira ve arkadaşlarının Hispantik olmayan beyaz astımlılar kullanılarak yapmış olduğu farmakogenetik bir GWA çalışmasında çocukluk çağı astım yönetimi programından 118 çocuk ve 4 farklı kohortu kapsayan ve 935 kişiden oluşan replikasyon çalışmasında glukokortikoid ile indüklenen transkript 1 (glucocorticoid-induced transcript 1 gene (GLCCI1) genindeki rs37972 değişiminin ICS'e yanıt olarak gelişen solunum fonksiyonları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (72). rs37972 varyantının daha az yaygın olan allelinin ICS'e karşı azalmış yanıtla ilişkisi olduğu gösterilmiştir.

Lökotrien etkileri üzerine yapılan aday gen çalışmaları 5-lipoksijenaz geni (ALOX5), lökotrien C4 sentez (LTC4S), LTA4 hidrolaz (LTA4H), çoklu ilaç rezistans protein (MRP1) ve sisteinil lökotrien reseptörleri üzerine odaklanmıştır (73-75).

Telleria ve arkadaşları ılımlı persistan astımlı bireylerde ALOX5 promotör polimorfizmiyle montelukast kullanımının etkinliği arasındaki ilişkiyi göstermiştir (76). Mantelukast kullanım etkinliğiyle ilişkilendirilen diğer iki gen PTGDR (-441C) ve SLCO2B1 geni varyantlarıdır (77,78). Astımda lökotrien düzenleyici ilaç cevabını inceleyen ilk GWAS Dahlin ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda MRPP3 genindeki rs12436663 varyantı zileuton tedavisinin etkisiyle; GLT1D1 genindeki rs517020 varyantın hem montelukast hem de zileuton tedavisinin etkisiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (79).

Bu çalışmalar genetik yapının tedavi yanıtını etkileyebileceğini göstermektedir. Ancak farmakogenetik henüz astım tedavisinde klinik uygulamaya girmemiştir.

Astım Şiddeti ve Genetik

Astımla ilgili genetik çalışmalar daha çok aday genlerin astımla olan ilişkisini belirlemeye yönelik tasarlanmıştır. Ancak yeni çalışmalar bazı genlerin astıma sebebiyet vermek yerine astımın şiddetini etkilediği göstermiştir. Örneğin, glutatyon-S-transferazlardan GSTP1 geninde yer alan İle105Val değişiminin astım şiddeti ve oksidan kapasite ile ilişkili bulunmuştur (80-82).

Ağır astım, astımlı hastaların %10'dan azında görülmesine karşın sağlık sistemi ve hastaların yaşan kalitele-ri üzerine etkileri son derece yüksektir. Ağır astımla ilgili çalışmaları özetleyecek olursak;

17q21 bölgesi:

Kromozom 17q21 üzerindeki sekans varyasyonları erken başlangıçlı çocukluk çağı astımıyla ve sigara dumanıyla ilişkili astım riskiyle ilişkisi tanımlanmıştır. GSDMB'nin inragenik bölgesinde yer alan rs7216389 varyantı retikulumdaki ORMDL3 geninin ifadesiyle ilişkili bulunmuştur. Buna ek olarak rs7216389 çocuklarda ağır tipte erken başlangıçlı astımla ilişkilendirilmiştir (83). Diğer bir çalışmada oral steroid veya hastane yatışı ihtiyacı olan alevlenmeli çocuklarda astım şiddeti semptomlarıyla rs721389 ilişkili olarak bulunmuştur. Kopenag çocuk kohortu ile yapılan çalışmada oral steroid veya hastane yatışı gerektiren alevlenmelerin gelişmesi için risk oranının homozigot resesif olarak rs721389 TT allelini taşıyanlarda heterozigot ya da homozigot yabancı tipe göre 3 kat fazla olduğu bulunmuştur (84).

Interlökin-33/IL1RL1.

IL-33 ve IL1RL1 çoklu genetik varyantları çoğunlukla beyaz ırkta gerçekleştirilmiş olan aday gen ve GWAS çalışmaları tarafından astımla ilişkileri tanımlanmıştır. IL33/ILqRL1 yolağı TH2 inflamatuvar cevapta görev alır ve çeşitli sitokinlerin düzenlenmesinde rol oynar.

Literatürde çocuklarda IL-33 seviyesiyle ağır astım klinik fenotipleri arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Hollanda neonatal kohort çalışmasında, IL1RL1 (rs1921622) değişimi mekanik ventilasyon gerektiren ağır RSV bronşiyolite ilişkilendirilmiştir (85). Danimarka kohortunda yapılan GWAS çalışmasında ise IL33/IL1RL1 gen bölgesindeki rs928413 ve rs1558641 SNPLeri ağır astım alevlenmeleriyle ilişkilendirilmiştir (86).

Tümör Büyüme Faktör – β

Tümör Büyüme Faktör– β (TGF- β) profibrotik inflamatuvar bir sitokin olup akciğerde havayolu remodelingiyle ilişkilidir. TGF- β genindeki birçok SNP çocuk ve yetişkinde astım şiddetiyle ilişkilendirilmiştir (87-89). Bu çalışmalarda araştırmacılar Tayvanlı erişkin bireylerde rs1800469 (C509T) SNP ile serumda artmış TGF- β düzeyinin astım şiddetinde artışla ilişki olduğunu belirlemişlerdir (90). TGF- β genindeki C-509T SNP birçok çalışmada ağır astımla ilişkisi gösterilmiştir. Araştırmacılar tarafından bulunan diğer bir SNP rs6957 ise hava yollarında daha ağır bir patolojinin gözlenmesi ile ilişkili bulunmuştur. Bu varyantı taşıyan bireylerde artmış hava yolu ce-

vabı ve hava akımında tıkanma, dokuda artmış eozinofil ve makrofaj sayısı ve artmış bazal membranı kalınlığı gözlenmiştir. Aynı gende bulunan diğer bir SNP rs4803455 FEV1 de hızlanmış düşüşle ilişkilendirilmiştir. Diğer bir çalışmada TGF- β genindeki T869 C değişikliği ağır astım sınıflandırılmasıyla ilişkilendirilmiştir (91).

CHI3L1

Avrupa kökenli Hutterite popülasyonunda yapılan GWAS çalışması sonucunda CHI3L1 geni promotor bölgesinde bulunan (-131C/G) değişikliği artmış serum YKL-40 düzeyi, astım, bronşial cevap ve akciğer fonksiyonunda düşmeyle ilişkilendirilmiştir. Aynı SNP replikasyon çalışmasının yapıldığı doğum kohortunda yaşamın ilk 5 yılı süresince astım ve YKL-40 serum düzeyi için prediktif olduğu bulunmuştur (92). Tayvan popülasyonunda rs1538372 ve rs10399931 genetik varyasyonlarıyla astım riski arasında ilişki belirlenmiştir (93).

Astım Genetiğinde Gelecek Yaklaşımlar

Genel olarak astımla ilişkisi bildirilen genlerin her birinin hastalık patolojisine olan katkıları oldukça küçüktür. Astım ve alerji genetiğinde günümüzde kullanılan tekniklerin çoğu, ilgili genlerde ancak sık rastlanan genetik değişkenleri belirleyecek kapasitededir. Sık görülen genetik değişkenliklerin hastalık fenotiplerine olan katkısı ise azdır ve nadir değişkenliklerin etkisi daha güçlüdür. Günümüzde, nadir görülen genetik değişkenliklerin, insersiyon ve delesyonların, hatta kopya sayısı değişikliklerinin belirlenmesine olanak sağlayan, tüm genomun veya protein kodlayan gen bölgelerinin tamamının yeniden dizilenmesi tekniği, astım ve alerji gibi kompleks hastalıkların genetiğinin aydınlatılmasında yeni bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu teknolojiye “next generation sequencing” adı verilmektedir.

Son yıllarda tüm genomdaki eksprese olan genlerin analiz edildiği çalışmalar yani transkriptom analizleri 2003 yılında sentetik oligonükleotidleri içeren mikroarray platformların geliştirilmesinin ardından hızla yaygınlaşmış ve birçok hastalıkta olduğu gibi allerjik hastalıklarda da transkriptom analizlerini içeren pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Astımla ve astımdaki bazı semptomlarla ilgili olarak bu ticari olarak satın alınabilen platformlar kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda tüm kan hücrelerini veya üst ve alt hava yollarında yer alan doku ve immünsistemde yer alan belli bir hücre grupları tek tek hedef alınmıştır. Bu platform-

lara ek olarak son zamanlarda kullanılmaya başlanan ikinci nesil dizileme (NGS) teknolojisi de transkriptom analizlerine adapte edilmiştir. NGS ile gerçekleştirilen RNA-Seq (RNA'nın dizi analizi) mikroarray platformlarına kıyasla daha az varyasyon göstermesi ve protein verileri ile daha uyumlu olması nedeni ile daha avantajlıdır. RNA-Seq ile tüm izoformların ve alternatif splayzing gösteren RNA'larında içerecek şekilde analiz edilen örnekte bulunan tüm RNA'ların nitelik ve nicelik olarak analizi mümkündür. Bugüne kadar RNA-Seq teknolojisinin kullanıldığı allerjik hastalıklarla ilgili yapılmış çalışma oldukça azdır. Ancak astımlılarla astımlı olmayan kişilerin havayolu düz kas hücrelerinin transkriptomunu karşılaştıran ve astımlılarda glukokortikosteroidlere cevapta farklı ifade olan genlerin (CRISPLD2, FAM129A ve SYNPO2) (94-96).belirlenmesine yönelik çalışmalar başarıyla gerçekleştirilmiştir., Poole ve arkadaşları bronşial hava yollarındaki durumun bir yansıması olarak nazal epiteldeki transkriptomu RNA-Seq teknolojisini kullanarak astımlı ve sağlıklı kontrolde karşılaştırmışlardır (97). Bu çalışmada astımlı çocukların nazal epitel transkriptomlarının sağlıklılara kıyasla farklı olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu çalışmaların hastalıkla ilişkili primer dokuların eldesini gerektirmesi nedeni ile istatistiksel açıdan istenilen gücü sağlayacak sayılara ulaşması oldukça zordur.

Önümüzdeki yıllarda genetik varyantları belirlemeye yönelik teknolojiler gelişmeye devam edecek ve bu alanda elde edilecek veriler giderek artacaktır. GWAS ile yeni nesil dizileme teknolojilerinin (ekzom dizileme, tüm genomun dizilenmesi, metilasyon bölgelerinin dizilenmesi, RNA-Seq analizleri) geliştirilmesi ile mikroarray ve GWAS teknolojileri ile belirlenemeyen hastalıkla ilişkili olabilecek nadir allelerin belirlenmesine olanak tanıyacaktır. Çalışmalarda tespit edilen varyantların çoğunun protein kodlamayan bölgelerde yer alması genlerin ifadesini düzenleyen dizilerin hastalık gelişiminde önemli rolü olabileceğini düşündürmektedir. Tüm genomun dizilenmesinin bu bölgelerin belirlenmesine yardımcı olacağını düşünmekteyiz

Astım ve allerjik hastalıkların ardında yatan genetik faktörleri belirlemeye yönelik olarak yapılan tüm çalışmalar resmin tam olarak anlaşılabilmesi için çeşitli genler ve değişkenliklerin birbirleri, makro ve mikro çevre ile etkileşimlerinin ve epigenetik faktörlerin belirlenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu karmaşık etkileşimlerin belirlenmesi için geliştirilen yeni teknikler ve biyoinformatik analiz programları sayesinde, erken tanıya yö-

nelik biyo-belirteçlerin bulunması ve bireysel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Özet

1. Astım ve allerjik hastalıklar genetik faktörler ve çevresel faktörlerin birbirleri ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkan kompleks hastalıklardır. Hastalık oluşumunun ve patolojisinin tam olarak anlaşılabilmesi için genlerin birbirleri ile ve çevre ile olan etkileşimlerinin iyi analiz edilmesi gereklidir.
2. Kromozom 5 üzerinde yer alan CD14, beta 2 adrenerejik reseptör ve IL-3, 4, 5, 9, 13 sitokin genleri, kromozom 6 üzerinde yer alan HLA-G ve TNF genleri kromozom 11 üzerinde yer alan yüksek afiniteli IgE reseptörü FCεRB ve kromozom 16 üzerinde yer alan IL-4 reseptörü birçok çalışmada astım veya astımla ilgili fenotiplerle ilişkili bulunmuştur.
3. 17q21 bölgesinde bulunan ve endoplazmik retikulumda yer alan bir proteini kodlayan ORMDL3 geni birçok çalışmada anlamlı ve tutarlı olarak çocukluk çağı astımı ile ilişkili bulunmuştur.
4. Hayvan deneyleri ve epidemiyolojik çalışmalar genler ve çevre arasında önemli derecede etkileşimlerin olduğunu; aynı genetik değişkenliğin çevresel karşılaşmaya bağlı olarak farklı klinik fenotiplerde ortaya çıkabildiğini göstermiştir. Gen çevre etkileşimlerine en güzel örneklerden biri de CD14 genindeki değişkenlikler ve endotoksin arasındaki ilişkidir.
5. Çevresel faktörler genetik şifreyi değiştirmeksizin genlerin ifade oranında değişikliklere yol açabilir. Çevresel karşılaşmaya bağlı olarak genlerin aktivitesinde meydana gelen değişiklikler epigenetik olarak adlandırılır. DNA'nın metillenmesi, kromatin yapısının yeniden düzenlenmesi ve micro-RNA'lar aracılığı ile genlerin ifadesinin düzenlenmesi başlıca epigenetik mekanizmalardır.
6. Yeni teknikler ve biyoinformatik analiz programlarının keşfiyle astım ve allerjik hastalıkların erken tanısı, bireysel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve hatta önlenmesine yönelik yaklaşımların geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Kaynaklar

1. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. *Asthma. Lancet.* 2002. 360,1313-1322.
2. Willemsen G, van Beijsterveldt TC, van Baal CG, Postma D, Boomsma DI. *Heritability of self-reported asthma and allergy: a study in adult Dutch twins, siblings and parents. Twin Research and Human Genetics.* 2008 11,132-142.
3. Nystad W, Roysamb E, Magnus P, Tambs K, Harris JR. *A comparison of genetic and environmental variance structures for asth-*

- ma, hay fever and eczema with symptoms of the same diseases: a study of Norwegian twins. *International Journal of Epidemiology* 2005. 34,1302–1309.
4. van Beijsterveldt CE, Boomsma DI. Genetics of parentally reported asthma, eczema and rhinitis in 5-yr-old twins. *European Respiratory Journal*. 2007. 29,516–521.
 5. Fagnani C, Annesi-Maesano I, Brescianini S, D'Ippolito C, Medda E, Nisticò L, Patriarca V, et al. Heritability and shared genetic effects of asthma and hay fever: an Italian study of young twins. *Twin Research and Human Genetics*. 2008 11,121–131.
 6. Akinbami LJ, Moorman JE, Bailey C, Zahran HS, King M, Johnson CA, et al. Trends in asthma prevalence, health care use, and mortality in the United States, 2001–2010. *NCHS Data Brief*. 2012 May;(94):1–8.
 7. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996, 273,1516–1517.
 8. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature* 2004. 429,446–452.
 9. Hoffjan S, Nicolae D, Ober C. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respiratory Research*. 2003. 4,14.
 10. Ober C, Hoffjan S. (2006) Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes and Immunity*. 2006. 7,95–100
 11. Kubo, A., K. Nagao, and M. Amagai, Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest*, 2012. 122(2): p. 440–7.
 12. Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, et al Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*. 2002. 418,426–430.
 13. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E, Abecasis G, Broxholme J, Ponting CP, Bhattacharyya S, et al. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nature Genetics*. 2003. 35,258–263.
 14. Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, et al. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science*. 2004. 304,300–304.
 15. Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, et al. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *American Journal of Human Genetics*. 2005. 76,349–357.
 16. Noguchi E, Yokouchi Y, Zhang J, Shibuya K, Shibuya A, et al. Positional identification of an asthma susceptibility gene on human chromosome 5q33. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005. 172,183–188.
 17. Zhang Y, Leaves NI, Anderson GG, Ponting CP, Broxholme J, Holt R, et al. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nature Genetics*. 2003. 34,181–186.
 18. Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *American Journal of Human Genetics*. 2007. 81,829–834.
 19. Balaci L, Spada MC, Olla N, Sole G, Loddo L, Anedda F, Naitza S, et al. IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *American Journal of Human Genetics*. 2007. 80,1103–1114.
 20. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology*. 2008. 8, 169–182.
 21. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007 448,470–473.
 22. Halapi E, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Bjornsdottir US, Thorleifsson G, Helgadóttir H, et al. A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma. *European Journal of Human Genetics*. 2010. 18,902–908.
 23. Verlaan DJ, Berlivet S, Hunninghake GM, Madore AM, Larivière M, et al. Allele-specific chromatin remodeling in the ZBP2 Ğ GSDMB Ğ ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *American Journal of Human Genetics*. 2009 85,377–393.
 24. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *Lancet*. 2013 Oct 19;382(9901):1360–72.
 25. Mathias RA, Grant AV, Rafaels N, Hand T, Gao L, Vergara C, et al. A genome-wide association study on African-ancestry populations for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010. 125,336–346.
 26. Sleiman PM, Flory J, Imielinski M et al. Variants of DENND1B associated with asthma in children. *N Engl J Med* 2010;362:36–44.
 27. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010;363:1211–21.
 28. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010;10:103–10.
 29. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy* 2012;67:1203–14.
 30. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nature Genetics*. 2011. 43,887–892.
 31. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Doi S, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nature Genetics*. 2011. 43,893–6.
 32. Fang Q, Zhao H, Wang A, Gong Y, Liu Q. Association of genetic variants in chromosome 17q21 and adult-onset asthma in a Chinese Han population. *BMC Medical Genetics*. 2011. 12,133.
 33. Dolan CM, Fraher KE, Bleecker ER, Borish L, Chippes B, Hayden ML, et al. TENOR Study Group. Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2004. 92,32–39.
 34. Haselkorn T, Fish JE, Zeiger RS, Szeffler SJ, Miller DP, et al. Consistently very poorly controlled asthma, as defined by the impairment domain of the Expert Panel Report 3 guidelines, increases risk for future severe asthma exacerbations in The Epidemiology and Natural History of Asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009. 124,895–902.
 35. Costa GN, Dudbridge F, Fiaccone RL, da Silva TM, Conceição JS, Strina A et al. A genome-wide association study of asthma symptoms in Latin American children. *BMC Genet*. 2015 Dec 3;16:141
 36. Barreto-Luis A, Pino-Yanes M, Corrales A, Campo P, Callero A, Acosta-Herrera M, Cumplido J et al. Genome-wide association study in Spanish identifies ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9 (ADAMTS9), as a novel asthma susceptibility gene. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Mar;137(3):964–6.
 37. Wang L, Murk W, DeWan AT. Genome-Wide Gene by Environment Interaction Analysis Identifies Common SNPs at 17q21.2 that Are Associated with Increased Body Mass Index Only among Asthmatics. *PLoS One*. 2015 Dec 16;10(12):e0144114

38. Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, et al. (2010) Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nature Genetics*. 42,45–52.
39. Repapi E, Sayers I, Wain LV, Burton PR, Johnson T, Obeidat M, et al. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nature Genetics*. 2010;42,36–44.
40. Slager RE, Hawkins GA, Li X, Postma DS, Meyers DA, Bleeker ER. Genetics of asthma susceptibility and severity. *Clinics in Chest Medicine*. 2012. 33,431-443.
41. Liang S, Wei X, Gong C, Wei J, Chen Z, Deng J. A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2013 May;74(5):648-57.
42. Huang H, Nie W, Qian J, Zang Y, Chen J, Lai G, Ye T, Xiu Q. Effects of TNF- α polymorphisms on asthma risk: a systematic review and meta-analysis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(6):406-17
43. Zheng XY, Guan WJ, Mao C, Chen HF, Ding H, Zheng JP, Hu TT, Luo MH, Huang YH, Chen Q. Interleukin-10 promoter 1082/-819/-592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis. *Lung*. 2014 Feb;192(1):65-73.
44. Tizaoui K, Berraies A, Hamdi B, Kaabachi W, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with asthma risk: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Lung*. 2014 Dec;192(6):955-65.
45. Xie ZK, Zhao H, Huang J, Xie ZF. The regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) -28C/G and -403G/A polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *Mol Diagn Ther*. 2014 Oct;18(5):523-31
46. Cheng D, Hao Y, Zhou W, Ma Y. The relationship between interleukin-18 polymorphisms and allergic disease: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:290687.
47. Liang S, Wei X, Gong C, Wei J, Chen Z, Chen X, Wang Z, Deng J. Significant association between asthma risk and the GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms: an updated meta-analysis of case-control studies. *Respirology*. 2013 Jul;18(5):774-83.
48. He Y, Peng S, Xiong W, Xu Y, Liu J. Association between polymorphism of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist gene and asthma risk: a meta-analysis. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:685684.
49. Bouzigon E, Corda E, Aschard H, Dizier MH, Boland A, Bousquet J, Chateigner N, Gormand F, Just J, Le Moual N, et al. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *New England Journal of Medicine*. 2008 359,1985-1994.
50. Woo JG, Assaad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK. The -159 C-->T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003. 112,438-444.
51. Vercelli D. (2004) Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004. 113,381-386.
52. Keskin O, Birben E, Saçkesen C, Soyer OU, Alyamaç E, Karaslan C, Tokol N, Ercan H, Kalayci O. (2006) The effect of CD14-C159T genotype on the cytokine response to endotoxin by PBMC from asthmatic children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2006; 97,321-328.
53. Kabesch M, Schedel M, Carr D, Woitsch B, Fritzsche C, Weiland SK, von Mutius E. (2006) IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117,269-274.
54. Namkung JH, Lee JE, Kim E, Park GT, Yang HS, Jang HY, Shin ES, Cho EY, Yang JM. An association between IL-9 and IL-9 receptor gene polymorphisms and atopic dermatitis in a Korean population. *J Dermatol Sci*. 2011 Apr;62(1):16-21
55. Bottema RW, Kerkhof M, Reijmerink NE, Thijs C, Smit HA, van Schayck CP, et al. Gene-gene interaction in regulatory T-cell function in atopy and asthma development in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Aug;126(2):338-46, 346.e1-10.
56. Via M, De Giacomo A, Corvol H, Eng C, Seibold MA, Gillett C, et al. Genetics of Asthma in Latino Americans (GALA) Study.. The role of LTA4H and ALOX5AP genes in the risk for asthma in Latinos. *Clin Exp Allergy*. 2010 Apr;40(4):582-9.
57. Ito K, Caramori G, Lim S, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Aug 1;166(3):392-6.
58. Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. (2009) Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009 . 179,572-8.
59. Liu J, Ballaney M, Al-alem U, Quan C, Jin X, Perera F, Chen LC, Miller RL. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. *Toxicological Sciences*. 2008. 102,76–81.
60. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J*. 2001 Apr;15(6):1110-2.
61. Schaub B, Liu J, Höppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, Wiczorek G, Illi S, von Mutius E. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Apr;123(4):774-82.e5.
62. Munthe-Kaas MC, Torjussen TM, Gervin K, Lødrup Carlsen KC, Carlsen KH, Granum B, Hjorthaug HS, Undlien D, Lyle R. CD14 polymorphisms and serum CD14 levels through childhood: a role for gene methylation? *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Jun;125(6):1361-8.
63. Tsitsiou E, Williams AE, Moschos SA, Patel K, Rossios C, Jiang X, Adams OD, Macedo P, Booton R, Gibeon D, Chung KF, Lindsay MA. Transcriptome analysis shows activation of circulating CD8+ T cells in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jan;129(1):95-103.
64. Maccani MA, Avissar-Whiting M, Banister CE, McGonnigal B, Padbury JF, Marsit CJ. Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21, and miR-146a in the placenta. *Epigenetics*. 2010 Oct 1;5(7):583-9.
65. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, Fagan JK, Fahy JV, Fish J, et al. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet*. 2004. 364,1505-1512.
66. Zuurhout MJ, Vijverberg SJ, Raaijmakers JA, Koenderman L, Postma DS, Koppelman GH, Maitland-van der Zee AH. Arg16 ADRB2 genotype increases the risk of asthma exacerbation in children with a reported use of long-acting β 2-agonists: results of the PACMAN cohort. *Pharmacogenomics*. 2013 Dec;14(16):1965-71.
67. Israel E, Lasky-Su J, Markezich A, Damask A, Szeffler SJ, Schuemann B et al. Genome-wide association study of short-acting β 2-agonists. A novel genome-wide significant locus on chromosome 2 near ASB3. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Mar 1;191(5):530-7.

68. Padhukasahasram B, Yang JJ, Levin AM, Yang M, Burchard EG, Kumar R. Gene-based association identifies SPATA13-AS1 as a pharmacogenomic predictor of inhaled short-acting beta-agonist response in multiple population groups. *Pharmacogenomics J*. 2014 Aug;14(4):365-71.
69. Drake KA, Torgerson DG, Gignoux CR, Galanter JM, Roth LA, Huntsman S et al. A genome-wide association study of bronchodilator response in Latinos implicates rare variants. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;133(2):370-8
70. Davis JS, Weiss ST, Tantisira KG. Asthma Pharmacogenomics: 2015 Update. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015 Jul;15(7):42.
71. Tantisira KG, Lake S, Silverman ES, Palmer LJ, Lazarus R, Silverman EK et al. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Hum Mol Genet*. 2004 Jul 1;13(13):1353-9.
72. Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A, Litonjua AA, Himes BE, Lange C, Lazarus R, Sylvia J, Klanderman B, et al. (2011) Genomewide association between GLCCII and response to glucocorticoid therapy in asthma. *New England Journal of Medicine*. 365, 1173–1183.
73. Asano K, Shiomi T, Hasegawa N, Nakamura H, Kudo H, Matsuzaki T, et al. Leukotriene C4 synthase gene A(-444)C polymorphism and clinical response to a CYS-LT(1) antagonist, pranlukast, in Japanese patients with moderate asthma. *Pharmacogenetics*. 2002 Oct;12(7):565-70.
74. Lima JJ, Zhang S, Grant A, Shao L, Tantisira KG, Allayee H et al. Influence of leukotriene pathway polymorphisms on response to montelukast in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Feb 15;173(4):379-85.
75. Klotsman M, York TP, Pillai SG, Vargas-Irwin C, Sharma SS, van den Oord EJ, Anderson WH. Pharmacogenetics of the 5-lipoxygenase biosynthetic pathway and variable clinical response to montelukast. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Mar;17(3):189-96.
76. Telleria JJ, Blanco-Quiros A, Varillas D, Armentia A, Fernandez-Carvajal I, Jesus-Alonso M, et al. ALOX5 promoter genotype and response to montelukast in moderate persistent asthma. *Respir Med*. 2008 Jun;102(6):857-61.
77. Kang MJ, Kwon JW, Kim BJ, Yu J, Choi WA, Shin YJ, Hong SJ. Polymorphisms of the PTGDR and LTC4S influence responsiveness to leukotriene receptor antagonists in Korean children with asthma. *J Hum Genet*. 2011 Apr;56(4):284-9.
78. Mougey EB, Feng H, Castro M, Irvin CG, Lima JJ. Absorption of montelukast is transporter mediated: a common variant of OATP2B1 is associated with reduced plasma concentrations and poor response. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Feb;19(2):129-38.
79. Qiu W, Rogers AJ, Damask A, Raby BA, Klanderman BJ, Duan QL et al. Pharmacogenomics: novel loci identification via integrating gene differential analysis and eQTL analysis. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 15;23(18):5017-24.
80. Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC, Spite-ri MA. (2000) Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 161,1437-1442.
81. Ercan H, Birben E, Dizdar EA, Keskin O, Karaaslan C, Soyer OU, Dut R, Sackesen C, Besler T, Kalayci O.(2006) Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1118,1097-1104.
82. Dut R, Dizdar EA, Birben E, Sackesen C, Soyer OU, Besler T, Kalayci O. (2008) Oxidative stress and its determinants in the airways of children with asthma. *Allergy*. 63,1605-1609.
83. Leung TF, Sy HY, Ng MC, Chan IH, Wong GW, Tang NL et al. Asthma and atopy are associated with chromosome 17q21 markers in Chinese children. *Allergy*. 2009 Apr;64(4):621-8.
84. Bisgaard H, Bønnelykke K, Sleiman PM, Brasholt M, Chawes B, Kreiner-Møller E, et al. Chromosome 17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1;179(3):179-85.
85. Faber TE, Schuurhof A, Vonk A, Koppelman GH, Hennis MP, Kimpen JL et al. IL1RL1 gene variants and nasopharyngeal IL1RL1-a levels are associated with severe RSV bronchiolitis: a multicenter cohort study. *PLoS One*. 2012;7(5):e34364.
86. Bønnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Møller E, Mercader JM, Belgrave D, et al. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nat Genet*. 2014 Jan;46(1):51-5.
87. Che Z, Zhu X, Yao C, Liu Y, Chen Y, Cao J et al. The association between the C-509T and T869C polymorphisms of TGF-β1 gene and the risk of asthma: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2014 Feb;75(2):141-50.
88. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Dec;158(6):1958-62.
89. Meng J, Thongngarm T, Nakajima M, Yamashita N, Ohta K, Bates CA et al. Association of transforming growth factor-beta1 single nucleotide polymorphism C-509T with allergy and immunological activities. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005 Oct;138(2):151-60.
90. Chiang CH, Chuang CH, Liu SL, Shen HD. Genetic polymorphism of transforming growth factor β1 and tumor necrosis factor α is associated with asthma and modulates the severity of asthma. *Respir Care*. 2013 Aug;58(8):1343-50.
91. Jones BL, Rosenwasser LJ. Linkage and Genetic Association in Severe Asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016 Aug;36(3):439-47.
92. Ober C, Tan Z, Sun Y, Possick JD, Pan L, Nicolae R et al. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med*. 2008 Apr 17;358(16):1682-91
93. Tsai Y, Ko Y, Huang M, Lin M, Wu C, Wang C et al. CHI3L1 polymorphisms associate with asthma in a Taiwanese population. *BMC Med Genet*. 2014 Jul 23;15:86.
94. Cortes A, Brown MA. Promise and pitfalls of the Immunochip. *Arthritis Res Ther*. 2011 Feb 1;13(1):101.
95. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, Bakker SF et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet*. 2011 Nov 6;43(12):1193-201.
96. Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. 1000 Genomes Project Consortium., A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010 Oct 28;467(7319):1061-73.
97. Benoist C, Lanier L, Merad M, Mathis D; Immunological Genome Project. Consortium biology in immunology: the perspective from the Immunological Genome Project. *Nat Rev Immunol*. 2012 Oct;12(10):734-40.