Gdański Uniwersytet Medyczny

Martyna Wesserling

Związek między występowaniem określonych wariantów polimorficznych genu LELP1 kodującego białko koperty rogowej a rozwojem atopowego zapalenia skóry

Praca doktorska

Praca wykonana
w Zakładzie Medycyny Molekularnej
Katedry Biochemii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego

Promotor
prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Zakładu
prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Kierownik Katedry
prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk

Gdańsk 2016

Składam serdeczne podziękowania mojemu
Promotorowi Panu Profesorowi Tadeuszowi Pawełczykowi
za wsparcie i pomoc podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dziękuję moim koleżankom z Zakładu Medycyny Molekularnej za okazaną życzliwość, pomoc i wyjątkową atmosferę pracy.

Praca została wykonana w ramach grantu NCN 2011/03/D/NZ5/00837 kierowanego przez dr Magdalenę Trzeciak z Katedry Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Część wyników pracy doktorskiej została opublikowana w artykułach:

Magdalena Trzeciak, Martyna Wesserling, Tomasz Bandurski, Jolanta Glen, Roman Nowicki, Tadeusz Pawelczyk. *Association of single nucleotide polymorphism in a late cornified envelope-like proline-rich 1 gene with atopic dermatitis.* Acta Derm Venerol 2016;12;96(4):459-63

Magdalena Trzeciak, Monika Sakowicz-Burkiewicz, Martyna Wesserling, Daria Dobaczewska, Jolanta Glen, Roman Nowicki, Tadeusz Pawelczyk. *Expression of cornified envelope proteins in skin and its relationship with atopic dermatitis phenotype.* Acta Derm Venerol, DOI: 10.2340/00015555-2482

Margarida Cortez, Andreia Matos, Martyna Wesserling, Tadeusz Pawelczyk, Magdalena Trzeciak, Manuel Bicho. *Lelp-1, its role in atopic dermatitis and asthma: Poland and Portugal.* J Allergy Ther 2016; 7:1-X

Spis treści

Wykaz skrótów 7
1. Streszczenie 9
2. Wprowadzenie 13
2.1 Skóra — charakterystyka 14
2.2 Skóra — budowa 14
2.3 Naskórek — budowa 15
2.3.1 Warstwa podstawna 16
2.3.2 Warstwa kolczysta 16
2.3.3 Warstwa ziarnista 16
2.3.4 Warstwa jasna 17
2.3.5 Warstwa rogowa 17
2.4 Białka koperty rogowej 18
2.5 Atopowe zapalenie skóry oraz choroby współistniejące 22
2.6 Gen *LELP1* 24
2.6.1 Lokalizacja genu *LELP1* i jego organizacja 24
2.6.2 Ekspresja genu *LELP1* w tkankach ludzkich 24
2.7 Białko LELP1 26
2.7.1 Budowa białka LELP1 26
2.7.2 Lokalizacja białka LELP1 w komórce 27
2.7.3 Tkankowa lokalizacja białka LELP1 27
2.8 Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu 28
3. Cele pracy 32
4. Materiały i metody 33
4.1 Charakterystyka grupy badanej 33
4.1.1 Charakterystyka grupy poddanej badaniu występowania polimorfizmów w regionie genu *LELP1* 33
4.1.2 Charakterystyka grupy u której przeprowadzono ilościową ocenę poziomu ekspresji genu *LELP1* oraz białka LELP1 35
4.2 Materiał badany 36
4.2.1 Materiał do badania polimorfizmów genu *LELP1* 36
4.2.2 Materiał do ilościowej oceny poziomu ekspresji genu *LELP1* i poziomu białka LELP1 36
4.3 Bufory i roztwory 37
4.4 Wykaz odczynników wykorzystanych w pracy 38

4.5 Metody ... 39
4.5.1 Oznaczenie poziomu IgE w surowicy ... 39
4.5.2 Określenie stopnia ciężkości choroby atopowej ... 39
4.5.3 Ocena poziomu świądu ... 39
4.5.4 Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej ... 39
4.5.5 Izolacja całkowitego RNA z fragmentów skóry ... 40
4.5.6 Elektroforeza agarozowa DNA ... 40
4.5.7 Wykrywanie polimorfizmów rs7534334, rs4845529, rs149304390, COSM529080 w regionie genu *LELP1* za pomocą analizy PCR-RFLP ... 40
4.5.8 Wykrywanie polimorfizmów rs140466902, rs142724966, rs144538546 w regionie genu *LELP1* za pomocą sond typu FRET ... 43
4.5.9 Amplifikacja fragmentów DNA metodą PCR ... 47
4.5.10 Amplifikacja fragmentów DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) i genotypowanie z użyciem sond molekularnych ... 48
4.5.11 Ilościowa ocena ekspresji genu *LELP1* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT- PCR) ... 50
4.5.12 Ocena poziomu białka LELP1 w skórze ... 51
4.5.13 Metody statystyczne ... 52
4.6 Programy i bazy danych, z których korzystano w pracy ... 53
5. Wyniki ... 54
5.1 Modelowanie molekularne ... 54
5.2 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs140466902 w regionie genu *LELP1* ... 57
5.3 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs142724966 w regionie genu *LELP1* ... 58
5.4 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs144538546 w regionie genu *LELP1* ... 59
5.5 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs7534334 w regionie genu *LELP1* ... 61
5.6 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs149304390 w regionie genu *LELP1* ... 64
5.7 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs4845529 w regionie genu *LELP1* ... 65
5.8 Częstotliwość występowania polimorfizmu COSM529080 w regionie genu *LELP1* ... 67
5.9 Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów w regionie genu *LELP1* ... 69
5.10 Poziom transkryptu genu *LELP1* w skórze ... 71

5.11 Poziom białka LELP1 w skórze 73
5.12 Współwystępowanie badanych zmian molekularnych 76
6. Dyskusja 80
7. Obserwacje 91
8. Wnioski 92
9. Spis tabel 93
10. Spis rycin 94
11. Bibliografia 97

Wykaz skrótów

AZS – atopowe zapalenie skóry

CE (ang. *cornified envelope)* – koperta rogowa

CRNN (ang. *cornulin)* – kornulina

DEPC – dietylopirowęglan

ECAP – Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce

EDC (ang. *epidermal differentiation complex)* – kompleks genów różnicowania naskórka

FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*) – mechanizm przenoszenia energii między dwoma chromoforami

FLG – filagryna

FLG2 – filagryna 2

GC (ang. *glucocorticosteroids*) – glukokortykosteroidy

GWAS (ang. *genome-wide association studies*) – badania analizy sprzężeń

HRNR – hornerina

HTH (ang. *helix-turn-helix*) – konserwatywny motyw helisa-skręt-helisa

INV – inwolukryna

LCE (ang. *late cornified envelope proteins*) – późne białka koperty rogowej

LELP1 (ang. *late cornified envelope like proline-rich 1)* – białko późnego rogowacenia bogate w prolinę

LOR – lorykryna

NRS (ang. *numeric rating scale*) – skala oceny służąca do liczbowej oceny poziomu świądu

Pax (ang. *paired box family*) – czynnik transkrypcyjny

pz – par zasad

RPTN – repetyna

SCORAD (ang. *scoring atopic dermatitis*) – skala oceny stopnia ciężkości AZS

SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SPRR (ang. *small proline-rich proteins*) – małe białka bogate w prolinę

TCHH – trichohialina

TJS (ang. *tight junction*) – połączenia ścisłe między komórkami

VNS (ang. *visual analogue scale*) – wizualna skala analogowa służąca do oceny poziomu świądu

1. Streszczenie

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest powszechną, przewlekłą, nawracającą chorobą zapalną skóry. Charakteryzuje się występowaniem czerwonych ognisk zapalnych, świądu i suchej skóry. Pomimo prowadzenia na całym świecie wielu badań etiopatogeneza AZS nie została szczegółowo poznana. Hipotezę badawczą przedstawionej pracy stanowi założenie, że rozwój chorób alergicznych w tym AZS jest związany z nadmiernym wnikaniem alergenów do organizmu spowodowanym zmianami w obrębie białek koperty rogowej. Zmiany te mogą być wynikiem występowania różnych wariantów polimorficznych genów kodujących te białka.

Celem pracy doktorskiej było określenie częstotliwości występowania polimorfizmów rs140466902, rs142724966, rs144538546, COSM529080, rs149304390 oraz rs7534334 w regionie genu *LELP1* u osób chorujących na atopowe zapalenie skóry wraz z oceną wpływu tych polimorfizmów na ryzyko wystąpienia AZS, jego rozwój i ciężkość przebiegu, a także analiza korelacji w/w polimorfizmów genowych z poziomem IgE, eozynofilią oraz poziomem świądu w AZS. W pracy zbadano również poziom ekspresji genu *LELP1* we fragmentach skóry niezmienionej chorobowo oraz skóry z wypryskiem atopowym a także zbadano poziom białka LELP1 w biopsjach skórnych.

Badaniem objęto 256 osób. Grupę chorych w badaniu stanowiło 152 pacjentów z rozpoznanym atopowym zapaleniem skóry, a grupę kontrolną 104 zdrowych ochotników bez chorób alergicznych i immunologicznych. Grupę, u której przeprowadzono ilościową ocenę poziomu ekspresji genu *LELP1* oraz białka LELP1 stanowiło19 pacjentów oraz 26 zdrowych ochotników.

Polimorfizmy rs7534334, rs4845529, rs149304390, COSM529080 zostały przeanalizowane metodą PCR-RFLP z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych. Częstotliwość występowania polimorfizmów rs140466902, rs142724966, rs144538546 określono przy użyciu sond molekularnych w układzie FRET. Poziom ekspresji genu *LELP1* oceniono w reakcji real-time PCR, a ilość białka LELP1 w skórze zmierzono z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego.

Otrzymane wyniki wskazują, że warianty polimorficzne w regionie genu *LELP1* rs4845529[C], rs144538546[A] i rs7534334[C] mają związek z rozwojem atopowego zapalenia skóry oraz z ciężkością przebiegu choroby. Wystąpienie wariantu polimorficznego rs4845529[C] u badanych osób było związane z podwyższonym stężeniem całkowitego IgE w surowicy. Wariant polimorficzny rs144538546[A] był związany z wyższym poziomem świądu odczuwanym przez pacjentów, natomiast wariant rs7534334[C] był związany z ciężkością przebiegu choroby, współwystępowaniem astmy, podwyższonym stężeniem całkowitego IgE w surowicy, eozynofilią i zwiększonym odczuciem świądu. Żaden z analizowanych polimorfizmów nie miał związku z poziomem ekspresji *LELP1*. Przeprowadzone badania pokazały, że poziom transkryptu genu *LELP1* oraz poziom białka LELP1 był wyższy w skórze osób z atopowym zapaleniem.

Summary

Atopic dermatitis (AD) is a common, chronic, inflammatory skin disease. It is characterized by the appearance of red inflammatory foci, itch and dry skin. Despite carrying out many studies all over the world, the pathogenesis of AD remain unrevealed in details. The research hypothesis lays on an assumption that, the development of allergic diseases including atopic dermatitis is related to an excessive penetration of allergens into the body caused by changes within the cornified envelope proteins. These changes could be the result of the presence of various polimorfic variants of genes encoding these proteins.

The aim of this study was to search for the association between some polymorphisms (rs140466902, rs142724966, rs144538546, COSM529080, rs149304390, rs7534334) in the region of the *LELP1* gene and the AD severity, total IgE concentration, pruritus, eosinophilia in the of AD patients. The study determined also the expression level of *LELP1*gene and the level of LELP1 protein in AD skin.

The study population consisted of 256 subjects (152 patients with atopic dermatitis and control group of 104 healthy volunteers with no allergic diseases and immune disorders). For the *LELP1* gene expression and LELP1 protein level 19 biopsies were taken from AD patients and 26 healthy volunteers.

Rs7534334, rs4845529, rs149304390, COSM529080 gene polymorphisms were analyzed by PCR-RFLP method using the restriction enzymes. The frequency of the rs140466902, rs142724966, rs144538546 polymorphism were determined using the molecular probes. The mRNA level of *LELP1* was analyzed by the real-time PCR. The LELP1 protein content in the skin was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay.

The obtained results indicated that some polymorphic variants (rs4845529[C], rs144538546[A] and rs7534334[C]) in the region of *LELP1*gene were associated with the development of atopic dermatitis and severity of the disease. The presence of rs4845529[C] in AD patients was associated with elevated total serum IgE level. Polymorphic variant rs144538546[A] was associated with increased itching, whereas rs7534334[C] associated with elevated serum IgE levels, eosinophilia, the level of itching, and concomitant asthma. None

of analyzed polimorphisms were associated with the expression level of *LELP1* gene. The levels of *LELP1* transcript and protein were significantly increased in AD skin.

2. Wprowadzenie

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest powszechną, przewlekłą, nawracającą chorobą zapalną skóry [1]. Charakteryzuje się występowaniem czerwonych ognisk zapalnych, świądu i suchej skóry. U niemowląt wyprysk atopowy uwidacznia się zazwyczaj jako krosty na policzkach, podczas gdy u starszych dzieci i dorosłych zmiany występują na kolanach, łokciach oraz dłoniach [2]. Pierwsze objawy AZS pojawiają się zwykle u 3-6 miesięcznych niemowląt, ale mogą wystąpić po raz pierwszy w każdym wieku. U osób chorujących na atopowe zapalenie skóry często rozwijają się inne choroby atopowe, takie jak astma i katar sienny. Szacuje się, że u 85% chorych dzieci, w czasie pierwszego roku życia dojdzie do rozwoju innych alergii [3, 4]. Wieloletnie obserwacje wskazują na rodzinne występowanie chorób atopowych, jednak jak dotąd brak jednoznacznych dowodów na ich dziedziczenie. Częstość występowania AZS stale wzrasta, szczególnie w krajach zachodnich, wysokorozwiniętych i na terenach zurbanizowanych. W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w latach 1990 i 2010 zaobserwowano tendencję wzrostową zachorowalności i występowania wyprysku atopowego w Azji Wschodniej, Afryce oraz w Europie [5]. Szacuje się, że obecnie w populacji ogólnoświatowej z powodu AZS cierpi 5-20% dzieci oraz 3-10% dorosłych [3]. Jednakże częstotliwość występowania choroby jest odmienna w różnych regionach świata. Przeprowadzone w Polsce badanie ECAP (Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce) wykazało, że 4-6,5% polskiej populacji choruje na AZS [6]. Pomimo, że częstotliwość występowania choroby w Polsce jest poniżej średniej wartości dla Europy (7,1%), AZS stanowi poważny problem zdrowia publicznego w naszym kraju. Atopowe zapalenie skóry jest chorobą, której obraz i cechy kliniczne zdecydowanie obniżają jakość życia pacjentów. Na skutek zaburzeń snu towarzyszących AZS, często stosowanej restrykcyjnej, wybiórczej diety oraz braku samoakceptacji, atopowe zapalenie dotyka nie tylko chorych ale również ich rodziny [7].

Etiopatogeneza AZS jest złożona i nadal niewyjaśniona; zaangażowane są w nią czynniki immunologiczne, środowiskowe i genetyczne, które jak się

obecnie uważa, powinny być rozpatrywane w kontekście genów kodujących białka koperty rogowej oraz genów dla głównych elementów układu immunologicznego.

2.1 Skóra — charakterystyka

Skóra ludzka jest organem złożonym, pełniącym wiele, skomplikowanych funkcji. Charakteryzuje się dużą odpornością na działanie czynników chemicznych i fizycznych. Stanowi zewnętrzną, ochronną warstwę organizmu. Skóra osłania narządy wewnętrzne oraz spełnia funkcje bierne i aktywne [8, 9]. Do funkcji biernych skóry zalicza się ochronę przed wnikaniem alergenów i patogenów w jej głębsze warstwy, zdolność absorpcji promieniowania ultrafioletowego, ochronę przed uszkodzeniami mechanicznymi. Funkcje aktywne skóry związane są z zapewnieniem właściwej termoregulacji, efektywną wymianą gazową i prawidłową gospodarką wodno-mineralną organizmu. Skóra jest również istotnym elementem układu odpornościowego. Dzięki receptorom znajdującym się w skórze człowiek odbiera bodźce ze środowiska zewnętrznego, odczuwa ciepło, zimno, ucisk, wibracje oraz ból. W skórze wchłaniane są lipidy i witaminy, syntetyzowana jest witamina D3 oraz niektóre hormony [8, 9]. W tkance podskórnej magazynowane są tłuszcze. Skóra jest jednym z najważniejszych i największych narządów ciała człowieka, jej powierzchnia zawiera się w przedziale 1,5–2 m^2 a całkowity ciężar wynosi około 20 kilogramów.

2.2 Skóra — budowa

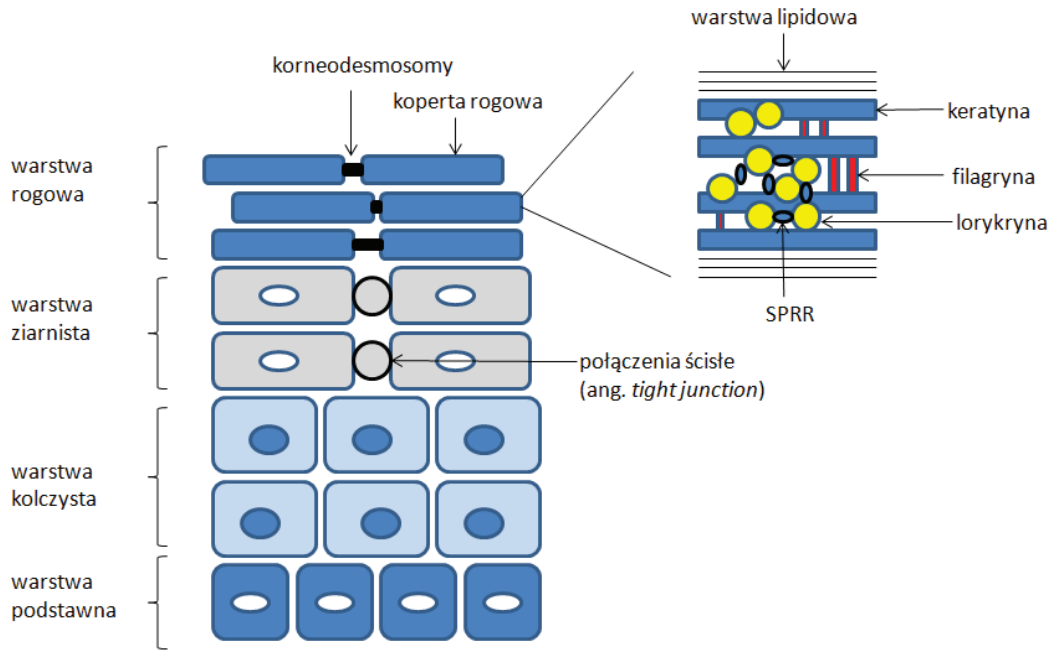
Skóra składa się z trzech warstw: tkanki podskórnej, skóry właściwej, naskórka. Nabłonek wielowarstwowy rogowaciejący płaski stanowi pierwszą warstwę skóry, która zbudowana jest z kilkunastu warstw keratynocytów [10, 11].

Skóra właściwa jest ukrwioną i unerwioną warstwą pochodzenia mezodermalnego, zbudowaną z włókien kolagenowych i elastynowych, które pełnią rolę podporową. W obrębie tej struktury znajdują się gruczoły potowe i łojowe, naczynia krwionośne, włókna nerwowe oraz inne wytwory skóry, takie jak paznokcie i włosy [8].

Podskórna tkanka tłuszczowa jest magazynem energii zbudowanym ze zrazików tłuszczowych, pomiędzy którymi znajduje się tkanka łączna włóknista. Jej komórki magazynują tłuszcz oraz są swoistą izolacją cieplną organizmu. Tkanka podskórna łączy skórę właściwą ze ścięgnami, podwięziami, mięśniami oraz kośćmi. Różni się ona od skóry właściwej budową – zawiera więcej elementów komórkowych oraz jest bardziej wiotka. Posiada włókna klejodajne oraz sprężyste. Jest utkana siecią naczyń i nerwów. Charakteryzuje się zmienną grubością, w zależności od lokalizacji skóry, płci, wieku, statusu hormonalnego organizmu oraz rasy [10].

2.3 Naskórek — budowa

Naskórek składa się z warstwy podstawnej, kolczystej, ziarnistej, warstwy jasnej oraz rogowej [Ryc. 1]. Naskórek to wielowarstwowy nabłonek, złożony z keratynocytów, które podlegają regularnemu złuszczaniu. Jednocześnie następuje jego ciągła odbudowa na skutek różnicowania się komórek macierzystych naskórka. Komórki te znajdują się w warstwie podstawnej. Charakteryzują się wysokim potencjałem proliferacyjnym, przez co możliwe jest między innymi zabliźnianie się ran w skórze [12].



Ryc. 1. Budowa naskórka. SPRR; małe białka bogate w prolinę.

2.3.1 Warstwa podstawna

Warstwa podstawna to najgłębiej leżąca warstwa naskórka. Zbudowana jest głównie z komórek o zasadochłonnych jądrach oraz wody. W tej warstwie znajdują się obok komórek macierzystych naskórka również komórki Merkla i komórki Langerhansa. Komórki Merkla oddziałują z komórkami nerwowymi, dlatego uważa się, że uczestniczą w procesie odbierania bodźców z otoczenia [13]. Wskazuje na to również ich lokalizacja. Komórki Merkla w organizmie ludzkim występują w macierzy paznokci oraz na dłoniach. Natomiast funkcja komórek Langerhansa związana jest z prawidłową pracą układu immunologicznego. Po przejściu do węzłów chłonnych komórki Langerhansa prezentują antygen limfocytom, chronią przed drażniącymi czynnikami, które poprzez uszkodzenia w naskórku wniknęły w głębsze warstwy skóry [9].
W warstwie podstawnej naskórka występują również melanocyty – komórki barwnikowe skóry. Melanocyty wytwarzają melaniny – pigmenty skórne. Intensywność zabarwienia skóry, skład melanin i ich ilość w naskórku jest cechą osobniczą, warunkowaną genetycznie [8].

2.3.2 Warstwa kolczysta

Komórki podstawne przesuwają się na powierzchnię skóry i tworzą warstwę kolczystą naskórka, zbudowaną z żywych, wielobocznych komórek, które połączone są poprzez desmosomy. W warstwie kolczystej rozpoczyna się proces keratynizacji [13].

2.3.3 Warstwa ziarnista

Warstwa ziarnista złożona jest z kilku warstw komórek o spłaszczonym kształcie, których jądra uległy zniekształceniu. Keratynocyty znajdujące się w warstwie ziarnistej w cytoplazmie zawierają liczne ziarna keratohialiny oraz mniejsze granule zwane ciałkami Odlanda. Ciałka Odlanda (keratynosomy) produkują glikofosfolipid, który skleja łuski rogowe i wypełnia przestrzenie

pomiędzy nimi, przez co zapewniona jest spójność między komórkami w warstwie rogowej naskórka [14].

2.3.4 Warstwa jasna

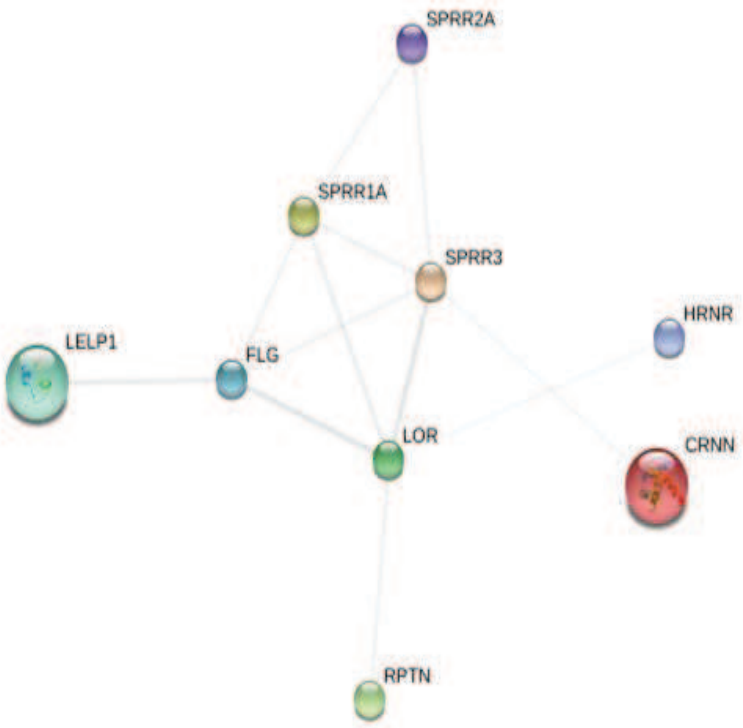
Warstwa jasna tworzy się tylko w niektórych obszarach ciała, na podeszwach stóp i wewnętrznej stronie dłoni. Komórki warstwy jasnej zawierają białko — eleidynę [9].

2.3.5 Warstwa rogowa

Warstwa zrogowaciała jest najważniejszą warstwą naskórka z punktu widzenia ochrony przed urazami mechanicznymi czy związkami chemicznymi. Składa się z warstw martwych komórek, zmienionych w płaskie rogowe płytki. Jest mocna i elastyczna. Jednym z czynników odpowiedzialnych za efektywne funkcjonowanie bariery naskórkowej i skuteczną ochronę organizmu przed środowiskiem zewnętrznym jest tzw. koperta rogowa (ang. *cornified envelope*, CE) [15]. Koperta rogowa wytwarzana jest na skutek ciągłej odnowy i złuszczania się keratynocytów. Proces złuszczania się komórek warstwy rogowej jest ściśle kontrolowany poprzez syntezę białek i ich degradację przez specyficzne proteazy [16]. Ich aktywność enzymatyczna zależy od gradientu pH w wyższych warstwach naskórka oraz od wpływu inhibitorów tych proteaz. Koperta rogowa jest strukturą nierozpuszczalną, o grubości 5-20 nm, zbudowaną z wewnętrznej warstwy białek oraz zewnętrznej warstwy lipidowej [13, 17]. W końcowym stadium zróżnicowania zastępuje ona błonę cytoplazmatyczną keratynocyta.
Kopertę rogową tworzy wiele wyspecjalizowanych białek takich jak lorykryna (LOR), inwolukryna (INV), fuzyjne białka S-100 do których należą filagryna (FLG), filagryna 2 (FLG2), kornulina (ang. *cornulin*; CRNN), hornerina (HRNR), repetyna (RPTN), trichohialina (TCHH), małe białka bogate w prolinę (ang. *small proline-rich proteins*; SPRR), grupa białek S 100 i białko późnego rogowacenia bogate w prolinę (ang. *late cornified envelope like proline-rich 1*, LELP1), [18], [Ryc. 1, 2].

Do wytworzenia warstwy rogowej prowadzi kornifikacja [19]. W proces ten zaangażowane są różne geny, których ekspresja zachodzi w określonej kolejności. Białka takie jak lorykryna, inwolukryna, małe białka bogate w prolinę, filagryna są ściśle sieciowane poprzez transglutaminazy katalizujące powstawanie izopeptydowych wiązań. Sieciowanie oraz skład aminokwasowy prekursorów koperty rogowej nadają jej dużą wytrzymałość oraz nierozpuszczalność [19, 20].

Geny kodujące białka CE znajdują się w kompleksie genów różnicowania naskórka (ang. *epidermal differentiation complex*, EDC). Jest to klaster genów w regionie 1q21, których produkty są odpowiedzialne za końcowe różnicowanie keratynocytów [18], [Ryc. 2.].



Ryc. 2. Sieć prawdopodobnych interakcji białko-białko w obrębie kompleksu EDC (wygenerowana przez program ExPASy STRING).

2.4 Białka koperty rogowej

Białka koperty rogowej tworzą warstwę odporną na działanie czynników chemicznych i fizycznych, wpływają na wytworzenie się naturalnego czynnika

nawilżającego, zapewniają właściwe pH skóry przez co zapobiegają penetracji czynników infekcyjnych w jej głębsze warstwy [21]. Przypuszcza się, że nieprawidłowości w budowie bariery skórnej ułatwiają penetrację alergenów i promują rozwój reakcji alergicznych [22, 23]. Ponadto obniżony poziom czynników antybakteryjnych w naskórku powoduje nawracające zakażenia u chorych [1]. Obserwacje kliniczne i wyniki badań molekularnych wskazują na silne uwarunkowanie genetyczne chorób atopowych, w tym atopowego zapalenia skóry i astmy. Przeprowadzane w ostatnich latach badania skupiają się na poszukiwaniu molekularnych determinant i czynników prowadzących do dysregulacji funkcji bariery naskórkowej w AZS. Przełomowe w tym zakresie były badania przeprowadzone przez Palmera i wsp. [24], które wskazały na zmiany w sekwencji genu *FLG* jako czynniki wysokiego ryzyka rozwoju AZS. Wyniki tych badań wykazały silny związek między ryzykiem wystąpienia atopowego zapalenia skóry a mutacją w genie *FLG*. Mutacje w genie *FLG* są również czynnikiem wysokiego ryzyka rozwoju astmy związanej z atopowym zapaleniem skóry [25]. Zauważono, że będąca następstwem mutacji w genie *FLG* zmniejszona ilość filagryny w naskórku, zdarza się głównie u pacjentów z wczesnym początkiem wystąpienia AZS, oraz jest związana z ciężkim przebiegiem choroby i podwyższonym stężeniem IgE w surowicy [24, 26, 27]. Zaobserwowano także, że cytokiny wydzielane przez limfocyty Th2, zaangażowane w patogenezę AZS takie jak: IL-4 i IL-13, wpływają na obniżenie transkrypcji *FLG* niezależnie od obecność mutacji w tym genie [28, 29]. Wieloośrodkowe badania pokazały, że mutacje w genie filagryny występują u 18-40% chorych. Jednocześnie około 9% populacji jest nosicielem tych zmian i nie dochodzi u tych osób do rozwoju AZS [24, 30]. Dlatego rozpoczęto poszukiwanie nowych genów, które mogłyby być związane z ryzykiem rozwoju choroby. Badania analizy sprzężeń (ang. *genome-wide association studies*, *GWAS*) w populacji niemieckiej oraz brytyjskiej, wskazały, że poza mutacjami *FLG*, dodatkowe czynniki ryzyka rozwoju AZS, mogą znajdować się pośród genów EDC, gdzie kodowane są białka odpowiedzialne za terminalne różnicowanie keratynocytów [31].

Lorykryna jest głównym białkiem koperty rogowej. Obecność licznych reszt cysteinowych determinuje formowanie przez lorykrynę mostków disiarczkowych stabilizujących strukturę CE. Białko to ulega ekspresji w warstwie ziarnistej naskórka [32]. Zaobserwowano związek między nieprawidłową ekspresją *LOR* a rozwojem chorób skóry. Mutacja 730insG w *LOR*, na skutek której białko zostaje wydłużone o 22 aminokwasy jest czynnikiem ryzyka wystąpienia nadmiernego rogowacenia skóry [33]. Natomiast w skórze objętej wypryskiem atopowym obserwowano obniżoną ekspresję lorykryny [34]. Badania przeprowadzone przez Koch i wsp. wykazały, że myszy z genetycznym brakiem *LOR* rodziły się z erytrodermią. Fenotyp ten zanikał w 4-5 dniu po urodzeniu, a badacze zaobserwowali u myszy wzrost ekspresji innych białek CE (SPRRP2D, SPRRP2H, RPTN, S100) [35].

Na przestrzeni ostatnich lat okazało się, że polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w genie kodującym hornerynę również są związane z wysokim prawdopodobieństwem wystąpienia AZS. HRNR *in vitro* jest sieciowana przez transglutaminazę, formując oligomery o dużej masie molekularnej [36]. Horneryna zlokalizowana jest wraz z profilagryną w granulkach w ziarnistej warstwie naskórka. Można przypuszczać, że pełni ona zbliżoną funkcję lub wzajemnie się uzupełnia z profilagryną [37]. W badaniach Esparza-Gordillo i wsp. [38] alel C rs877776 *HRNR* występował częściej u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry w porównaniu do osób zdrowych, nawet po wykluczeniu nosicieli mutacji w *FLG*. Zaobserwowano również obniżoną ekspresję horneryny w AZS i łuszczycy [36, 40].

Ludzkie białko kornulina zbudowane jest z dwóch reszt glutaminowych i powtórzeń bogatych w treoninę w C-końcowej domenie [41]. Gen *CRNN* ulega ekspresji głównie w górnych warstwach zróżnicowanych, płaskonabłonkowych komórek, w tym w naskórku [41]. Ekspresja *CRNN* jest znacząco obniżona w ludzkich komórkach nowotworowych jamy ustnej i przełyku oraz w wyprysku, ale tendencji tej nie zaobserwowano w łuszczycy [42, 43]. Badania przeprowadzone wśród szwedzkich rodzin pokazały, że polimorfizm rs941934 *CRNN* jest znacząco związany z AZS, jednakże tylko u nosicieli wariantu delecyjnego genu kodującego filagrynę (2282del4) [43].

Repetyna jest białkiem zbudowanym z 784 aminokwasów tworzących strukturę przypominającą domenę heliakalną wiążącą wapń oraz z wewnętrznych, tandemowych powtórzeń typowych dla białek prekursorowych koperty rogowej [44]. Lokalizacja chromosomową genu dla RPTN, jej ekspresja podczas różnicowania komórek skóry oraz wyniki najnowszych doniesień naukowych wskazują, że białko to może mieć wpływ na rozwój atopowego zapalenia skóry [45].

W regionie EDC zlokalizowana jest również grupa genów kodujących małe białka bogate w prolinę (SPRR1, SPRR2, SPRR3, SPRR4). Wypełniają one sieć białek wiązanych przez transglutaminazy podczas każdego etapu tworzenia się koperty rogowej [46]. Ludzkie geny kodujące białka SPRR zbudowane są z dwóch eksonów i zostały po raz pierwszy wyizolowane przez Kartasova i wps. [47]. *SPRR1* i *SPRR2* ulegają ekspresji w skórze oraz śluzówce jamy ustnej [48, 49]. Obecność białka SPRR3 wykryto w nabłonku jamy ustnej i przełyku [49]. Nomura i wsp. [50] wykazali, że poziom SPRR2C wzrasta w łuszczycy i w atopowym zapaleniu skóry. Analogiczne wyniki uzyskali polscy naukowcy. W biopsjach skóry osób z AZS objętych wypryskiem zaobserwowano wzrost ekspresji *SPRR1A* przy jednoczesnym znacznym spadku ekspresji *LOR* [51]. Wysunięto hipotezę, że wzrost ilości tran skryptów *SPRR1A* związany jest z mechanizmem kompensacyjnym w odpowiedzi na brak LOR w kopercie rogowej, jednak jest on niewystarczający do zahamowania rozwoju stanu zapalnego skóry. Zaobserwowano również korelacje między występowaniem polimorfizmów w genach kodujących małe białka bogate w prolinę i AZS. Na podstawie swoich badań Marenholz i wsp. [52] zasugerowali związek *SPRR3* z rozwojem wyprysku. W badaniu tym oceniano częstotliwość występowania polimorfizmu rs28989168 *SPRR3* u osób chorujących na AZS i w grupie kontrolnej. Wariant alleliczny obejmujący 24-nukleotydowe powtórzenie w centralnej domenie białka był związany z ryzkiem wystąpienia AZS a obecność takiego białka może wpływać na właściwości fizyczne koperty rogowej [52].

LCE (ang. *late cornified envelope proteins*) to grupa białek ulegających ekspresji bardzo późno w górnej warstwie ziarnistej koperty rogowej. Ekspresję LCE obserwuje się głównie w skórze [53]. Dane pokazują, że białka te (LCE1, 2,

5, 6) są zaangażowane w prawidłowe działanie bariery skórnej, podczas gdy LCE3 bierze udział w naprawie tej bariery po urazie lub zapaleniu [54]. Przeprowadzona przez zespół Riveira-Munoz meta-analiza wykazała związek między delecją *LCE3B i LCE3C* a rozwojem łuszczycy w populacjach europejskich [55].

2.5 Atopowe zapalenie skóry oraz choroby współistniejące

Defekt bariery naskórkowej jest powszechnie uznawany za istotny czynnik rozwoju atopowego zapalenia skóry i może również prowadzić do rozwoju astmy [56]. Badania pokazują, że u osób z atopowym zapaleniem skóry (AZS) dochodzi do zwiększonej ekspresji receptora IgE w skórze a na skutek przewlekłego stanu zapalnego do całego organizmu wydzielane są limfocyty Th2 oraz cytokiny IL-4 i IL-13 [57, 58, 59]. Natomiast podwyższony poziom IgE i poszczególnych cytokin obserwowany jest u pacjentów z astmą [60]. Znalezienie przyczyn odpowiedzialnych za występowanie defektu bariery naskórkowej wydaje się ważne zwłaszcza w kontekście współczesnych poglądów, które zakładają, że defekt bariery naskórkowej może być punktem wyjścia „marszu alergicznego" a odpowiednie i wczesne jego korygowanie może zatrzymać proces dalszej alergizacji. W grupie stu angielskich dzieci, u których w rodzinie co najmniej jedno z rodziców chorowało na AZS, podczas dwudziestu dwóch lat obserwacji stwierdzono zwiększone wraz z wiekiem ryzyko wystąpienia AZS, świszczącego oddechu oraz astmy [61]. Przeprowadzone w Polsce badania pokazują, że dzieci z rozpoznanym AZS częściej osiągają pozytywne wyniki testów skórnych na alergeny wziewne, szczególnie pyłków traw i roztoczy kurzu domowego [62]. W badaniu Gustafsson i wsp., w którym obserwowano do siódmego roku życia grupę dziewięćdziesięciu czterech dzieci z atopowym zapaleniem skóry u 43% z nich zdiagnozowano astmę a u 45% wystąpił alergiczny nieżyt nosa [63]. Istnieje coraz więcej dowodów, że wystąpienie AZS poprzedza rozwój uczulenia na alergeny wziewne oraz astmy [64, 65].

Wyniki prowadzonych badań wskazują na złożone mechanizmy patogenezy AZS. Przeprowadzone w populacji europejskiej, kaukaskiej i afrykańskiej badania zmierzające do identyfikacji genetycznych czynników ryzyka wskazują na różnice

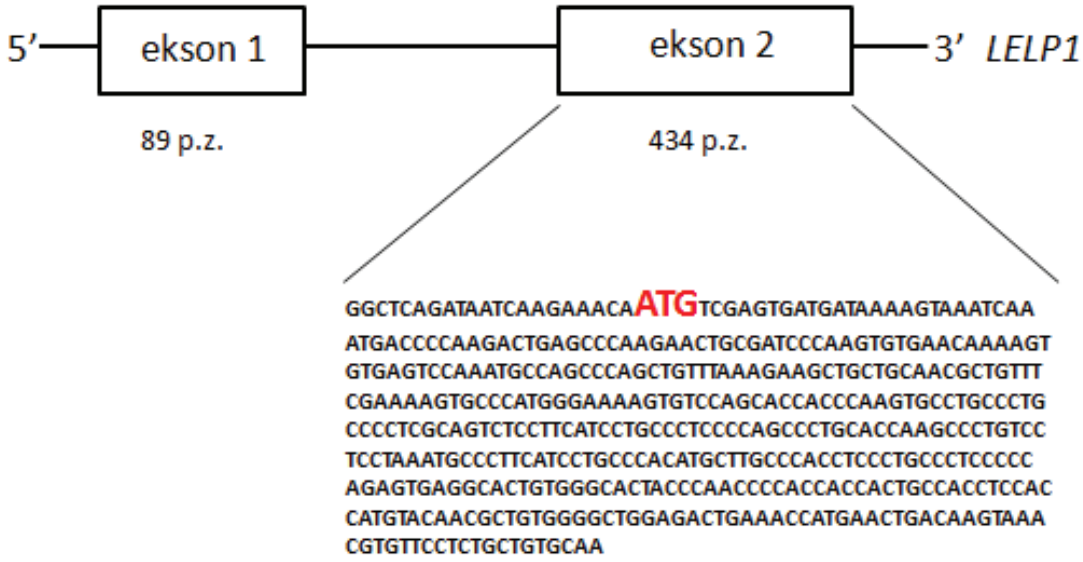
etniczne występowania mutacji w genie *FLG*. Dlatego wydaje się, że niezwykle ważnym jest poszukiwanie nowych markerów genetycznych związanych z ryzykiem rozwoju AZS. Ostatnie doniesienia wskazują, że jednym z nowych czynników genetycznych związanych z rozwojem AZS może być *LELP1*.

W obrębie genu *LELP1* zidentyfikowano dotąd szereg zmian, które mogą mieć wpływ na właściwości i funkcję białka LELP1.

2.6 Gen *LELP1*

2.6.1 Lokalizacja genu *LELP1* i jego organizacja

Gen *LELP1* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 1, w regionie 21, w prążku 3 (1q21.3). *LELP1* składa się z 3 intronów oraz 2 eksonów, a początek startu translacji znajduje się w obrębie drugiego eksonu [Ryc. 3.]. Sekwencję nukleotydową genu *LELP1* przedstawiono na rycinie 4.



Ryc. 3. Struktura genu *LELP1*. Kolorem czerwonym oznaczono miejsce startu translacji.

2.6.2 Ekspresja genu *LELP1* w tkankach ludzkich

Ekspresję genu *LELP1* obserwowano w tkance tłuszczowej, skórze, nadnerczach, krwi, szpiku kostnym, mózgu, płucach, oskrzelach, jelicie grubym, ośrodkowym układzie nerwowym, przełyku, gardle, jamie ustnej, szyjce macicy, pochwie, cewce moczowej (wg bazy danych *Bgee: Gene Expression Evolution*).

>chromosom:GRCh38:1:153202843:153205720:1

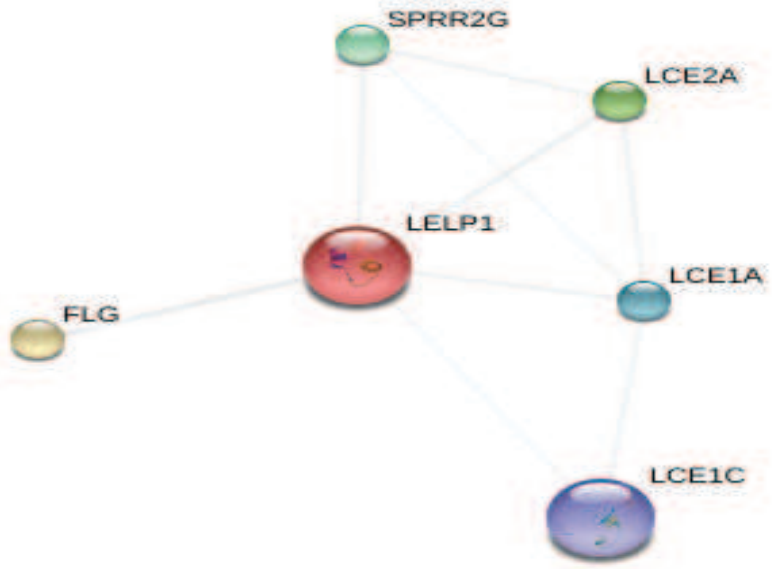
GCACTCCAGCCTCCCATCGCCACTCCTAACACACCCCCATTCCAACCACAAAGACCCTGGTCAGGC
CTTTAAAAAAGGCAAGGAAGGAATTCTGAGAGGCAAATCTTTGTGCCCTAAGGCAGGATCTGGGGC
TAACCCAATTGTGTGGGGTGGTAAGAAGAGGTTTCAGAATCTCACATTAGAAAAATAAAGAAAAGA
AGAATGTCAAAATGGCAGTGATCAATTCAGGGTTGCTCTCCTAGAAGGGTGGGGAAGGAGCAGGTT
CAGAGGAATTAAACTTTGAGGGTGGAAGAGGAGCTGGAGACCATGTGTCAACAGTGGGCCAGCTTT
TCTGCTCCCAGCAACAATGAGCCTCCCATCCTCAGAGCCCAGGACTCTTCACTGCAGCCTCATTTT
ACCAGCCTGAATGTTGAGGGGTCTAGGGAGGGGTGGGACAGCCAAGGGGGGTGATTCATCATGGCT
CTATTCTGGTGTTCAGGGCTTGTTGTGCTGGGAGCTATGGAGTCACACAACAATTGCCCCTCGATG
ATGCTGCAATGACCTCATAAGTGGAGGTCATTTCCCCTGCCCCCACCCCCAGCTTCCTCAGATCTG
GGCAGA**GGAACCAAAGGGAAAAGCCACCTTCCCAGGCACAGCCATAACATCCACCTCACTCAACTG**
CTTGTCAAGTTCACCACCAACACAGAGGGGTAAGTTGCATTTGGACAGGTGGAAGTGGCCACTCTT
TGGCCTCTTCTACCCTGGGAGTGACCTGAAGTACCCCACGCACTGAGCAGGGTTGGGAAAGTCATG
TTTGAATGAAAGTTTCCTGTTATTTTCAGTGGTAAGAACTGGTGTGTGCTTCACCTTGGAATAGAG
TCTCAACAATTTTAGAGTTCAACTTAATAATATGCCTCCCCAGAGAGCTATACTGATTTTAAAACA
AAATTTAAAATGTTATTTTTATATTGTTAAAAGAAATCAAAGAAATATAACCAATTAGATCCAACT
TGAAGTATTGTGAGGGACTGAAAATCCCTGTCCATATCTAGGAGTTAAACTGTCCGTGCAGAAATG
CCTAGCTCAGGGCAAAACTCAACAGGAGAGAAAAGGAATTCCCTTCTGAAAATCACATTTTGTGGC
TCTATCATTCAGATTTTCAGAGAAATTGGAATTTCGTGGTTCATCTCCTGATTTCTTCCCTTACCC
TATTATTTATCAGAACCTGGATGGAGACAAAGGAGTGGGCAGTTCTAGAGTAGCCCATGGGAACCC
ACTCATGGCAGGGATTAAATTACTTTCCCTCCCATGGCCTCTAGTAAAGAAAGCAATTCTCAAGGT
TCAGGGAACTTAGGTGGGACACAGGATTGAAAGCAGTGTCCTAGGCCCCCAAGTCTGCTAGTGTAC
CTCCCATCTATCTTCAGAGGAACAGGAAGTGGCCTTAGAGGAGCGAAACTTCTATTGTGCCATGAA
TGCCTTGAGCAATCTGGTCAAACTTAGGGACTCCTTGGAATCATGTTTCTAAATGAATTAAATACA
ACATATGGAGTTACAGAGACACCAACTCTACTGAAATACAGTTTCAGTGGGGTGGGGGAGGTGGGG
GGTCCAAAACCATAGGTTAAGAACTCCTACTAGAGTCTATAGCATGGAAGCAAGAATAAGTGAAAA
GGAAGCAGAGTTAAGGGTGGAGAGATTAAGAAATGCTATCTCAAACTCATACAAGGATGAGGGCGG
CCCTAAATGAGAAGATGATCTAGAGCCTGAATGCATCTCAGGGAAGACTTTCTTAAGTACAAGGAT
AAGCTGTAAGAAGCCTGTAGGTATCCTCTCCCACCTACAATGCATCTCATATTTCTTTGCAG**GGCT**
CAGATAATCAAGAAACAATGTCGAGTGATGATAAAAGTAAATCAAATGACCCCAAGACTGAGCCCA
AGAACTGCGATCCCAAGTGTGAACAAAAGTGTGAGTCCAAATGCCAGCCCAGCTGTTTAAAGAAGC
TGCTGCAACGCTGTTTCGAAAAGTGCCCATGGGAAAAGTGTCCAGCACCACCCAAGTGCCTGCCCT
GCCCCTCGCAGTCTCCTTCATCCTGCCCTCCCCAGCCCTGCACCAAGCCCTGTCCTCCTAAATGCC
CTTCATCCTGCCCACATGCTTGCCCACCTCCCTGCCCTCCCCCAGAGTGAGGCACTGTGGGCACTA
CCCAACCCCACCACCACTGCCACCTCCACCATGTACAACGCTGTGGGGCTGGAGACTGAAACCATG
AACTGACAAGTAAACGTGTTCCTCTGCTGTGCAAGACTTCTCCTGGTGTTTCTGGTGGGTTTTGAT
TTGTTTTGTTTGTTGTTTTACAGCACTAAACCACCAACAAGCAATCCCTGAGAAGTGAGGCTAGAA
CCCTGCACTCTCAACAACCTTTGAGAACTGACTTTCCCTCTGACCCCACCTGCTGCTTAGAGGCAG
GTGCCCACTTCTGAAGGGTGTACCCAGGTAATGCCAGGCTGTGTTAGAGCAAAGCCTGAGAGATCC
ATAAATATGGTTGCAGCTGTGAAAGCGTCTAACGCCAGGAAGCAGGAAAGAGATGGTATGAGGGAG
AAAGAGGAGTAGAATATTGGTGAAAGGTCCAGGAAGGCTCAGGAAAAGGCATTGTACTACTTTTCT
GTTAGTCCTGTTGCATAATGCTTATGCAGAAGGGCTCTCAGTACAGGCTGCATGGGTTTAATGCAA
CTCTATCTCTGCTCCCTAACACCTTGTAACCTTAGGCAAGTTGCTTAACTTCTTTGTGTCTCAGTT
TTCCTCTCTTTGCAAAAGGAATGATGATGCTAACAGTACTGCTGTTATGAAGTTGTTGTGAGGCTA
AAGAATTAACAGACGCCAGGCCAGGCACAGTGGCTCATGC

Ryc. 4. Sekwencja nukleotydowa genu *LELP1*. Kolorem zaznaczono sekwencje kodujące. Dane pochodzą z bazy *Ensemble Genome Browser*.

2.7 Białko LELP1

2.7.1 Budowa białka LELP1

Białko LELP1 należy do rodziny późnych białek koperty rogowej (ang. *late cornified envelope proteins,* LCE), które podobnie jak SPRR są prekursorami koperty rogowej i pełnią funkcje sieciujące w tej strukturze (ang. *cross linking proteins*) [Ryc. 5].



Ryc. 5. Sieć prawdopodobnych oddziaływań LELP1 z innymi białkami budującymi kopertę rogową (wygenerowana przez program ExPASy STRING).

LELP1 jest białkiem zbudowanym z 98 aminokwasów, bogatym w prolinę (25 aminokwasów), cysteinę (17 aminokwasów) oraz lizynę (14 aminokwasów), [Ryc. 6].

MSSDDKSKSNDPKTEPKNCDPKCEQKCESKCQPSCLKKLLQR
CFEKCPWEKCPAPPKCLPCPSQSPSSCPPQPCTKPCPPKCPSSCP
HACPPPCPPPE

Ryc. 6. Sekwencja aminokwasowa białka LELP1. Białko LELP1 zbudowane jest z 98 aminokwasów. Dane pochodzą z bazy *Ensemble Genome Browser.*

Wyniki modelowania przestrzennego wskazują, że białko LELP1 w przestrzeni przyjmuje formę podobną do lustrzanego odbicia litery L zbudowanej z 5 alfa-helis [Ryc. 7].

Ryc. 7. Przewidywana struktura trzeciorzędowa LELP1 (wygenerowana przez program Phyre[2], procent ufności modelu: 96,7%). Poszczególne kolory (w kolejności kolory: czerwony, pomarańczowy, żółty, zielony, jasnoniebieski, ciemnoniebieski) oznaczają stopień ufności (wyliczony przez program Phyre[2]) dla wystąpienia danej struktury drugorzędowej w białku LELP1. Kolor czerwony — wysoka ufność; kolor ciemnoniebieski — niska ufność.

2.7.2 Lokalizacja białka LELP1 w komórce

Białko LELP1 zlokalizowane jest w zewnętrznej warstwie korneocytu zwanej kopertą rogową oraz w cytoplazmie komórki (wg bazy danych *UniProt*).

2.7.3 Tkankowa lokalizacja białka LELP1

Białko LELP1 zlokalizowane jest w skórze, w nabłonku wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym (wg bazy danych *UniProt*). Należy zaznaczyć, że informacje zawarte w dostępnych bazach danych, dotyczące dystrybucji LELP1 w obrębie innych tkanek są niejednoznaczne i nie potwierdzone przez piśmiennictwo.

2.8 Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP) polega na zamianie pojedynczej zasady w sekwencji DNA na inną (substytucja). Zmienność tą obserwuje się w regionach kodujących genu, sekwencjach niekodujących i w regionach międzygenowych. Pomimo, iż nie każda substytucja w sekwencji kodującej genu prowadzi do zmiany kodowanego aminokwasu, to jednak rozmaite warianty genów charakteryzujące się występowaniem zmian w obrębie sekwencji rozpoznawanych np. przez czynniki transkrypcyjne mogą podlegać odmiennej regulacji.

Dlatego w ramach pracy doktorskiej postanowiono zbadać częstotliwości występowania wybranych polimorfizmów rs140466902, rs142724966, rs144538546, COSM529080, rs149304390, rs4845529 oraz rs7534334 w regionie genu *LELP1* u osób chorujących na atopowe zapalenie skóry. Wyboru określonych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu dokonano w oparciu o wyniki przeprowadzonych analiz bioinformatycznych.

rs140466902

Polimorfizm ten występuje w obrębie kodonu startu transkrypcji genu *LELP1*, prowadzi do substytucji adeniny (A) guaniną (G) w pozycji 153204708 na chromosomie 1. Substytucja ta skutkuje zmianą sekwencji kodowanych aminokwasów: metioniny (**A**TG) na walinę (**G**TG) i zanikiem miejsca startu translacji, co może skutkować przesunięciem ramki odczytu i występowaniem w komórce krótszego białka LELP1 o zmienionych właściwościach.

rs142724966

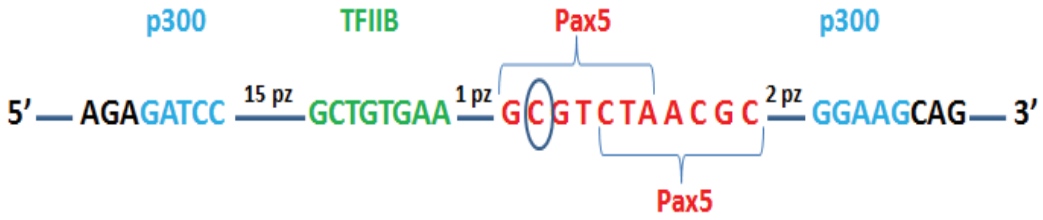
Polimorfizm ten prowadzi do substytucji cytozyny (C) adeniną (A) w pozycji 153204890 na chromosomie 1. Substytucja ta skutkuje zmianą kodonu dla cysteiny (TG**C**) na kodon stop (TG**A**), powodujący zahamowanie translacji, co może skutkować zmniejszoną ilością białka LELP1 w komórce i nieprawidłowościami w budowie koperty rogowej.

rs144538546

Polimorfizm ten występuje w obrębie promotora genu *LELP1*, prowadzi do substytucji adeniny (A) tyminą (T) w pozycji 153203922 na chromosomie 1. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne wykazały, że wystąpienie allelu T rs144538546 powoduje zmianę miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego GR-alfa (ACAGG).

rs7534334

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji cytozyny (C) tyminą (T) w pozycji 153205376 na chromosomie 1. Zmiana ta występuje 255 par zasad poniżej genu *LELP1*. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne wykazały, że polimorfizm ten znajduje się w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny Pax5 (GCGTCTAACGC) a 2 pary zasad poniżejrs7534334 znajduje się miejsce rozpoznawane przez acetylotransferazę histonów p300 (GGAAG), która jest koaktywatorem transkrypcji [Ryc. 8]. Wykazano, że p300 poprzez acetylację silnie wzmacnia aktywność transkrypcyjną Pax5 [81]. Można przypuszczać, że w przypadku wystąpienia allelu T rs7534334 wiązanie Pax5 z DNA i jego oddziaływanie z p300 ulegnie zmianie co może skutkować inną aktywnością transkrypcyjną.



Ryc. 8. Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych (TFIIB, Pax5) oraz acetylotransferazy histonów (p300) w regionie polimorfizmu rs7534334. Owalną ramką zaznaczono miejsce polimorficzne rs7534334.

rs4845529

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji cytozyny (C) guaniną (G) w pozycji 153201885 na chromosomie 1. Wariant sekwencji zlokalizowany na końcu

5’ genu *LELP1*. Analiza bazy danych *HapMap* oraz informacji zawartych w bazie *Ensemble Genome Browser* wykazała, że rs4845529 znajduje się w nierównowadze sprzężeń z rs7534334 (r^2=0,7, D’=0,9) i oba SNP są ze sobą powiązane (dane dla populacji europejskiej 1000GENOMES:phase_3:CEU). Wystąpienie allelu G rs4845529 powoduje zmianę potencjalnego miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego HNF-1 (**C**ACTCTAAC).

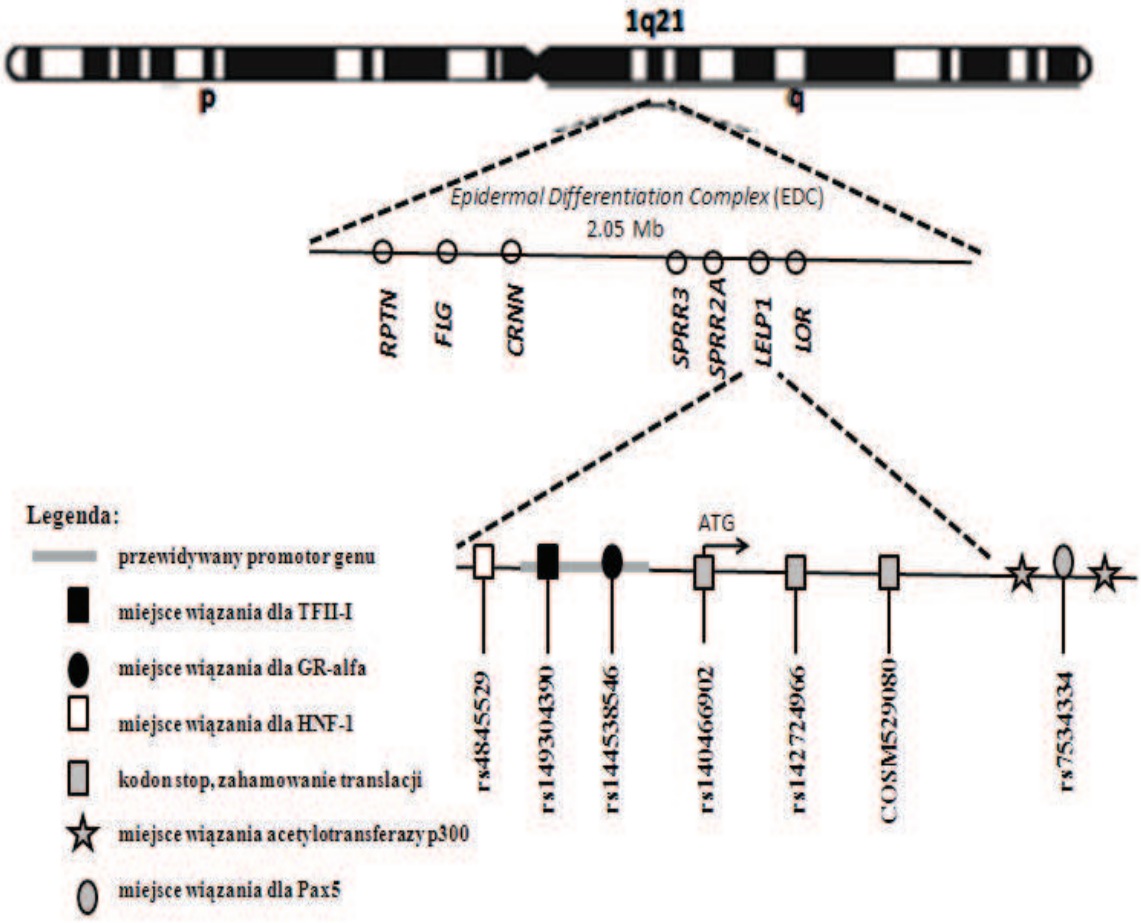
rs149304390

Polimorfizm ten występuje w obrębie promotora genu *LELP1*, prowadzi do substytucji cytozyną (C) tyminy (T) w pozycji 153203826 na chromosomie 1. Wystąpienie allelu C rs149304390 powoduje zmianę miejsca wiązania dla czynnika transkrypcyjnego TFII-I (AGA**T**CC).

COSM529080

Substytucja cytozyny (C) adeniną (A) w pozycji 153204895 na chromosomie 1, która skutkuje zmianą sekwencji kodonu dla seryny (T**C**G) na kodon stop (T**A**G) i zahamowaniem transkrypcji genu, co może skutkować zmniejszoną ilością białka LELP1 w komórce i nieprawidłowościami w budowie koperty rogowej.

Lokalizacje wybranych polimorfizmów w obrębie genu *LELP1* przedstawione są na rycinie 9.



Ryc. 9. Położenie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w regionie genu *LELP1* (chromosom 1q21).

3. Cele pracy

1. Zbadanie częstotliwości występowania polimorfizmów w regionie genu *LELP1* u osób chorujących na atopowe zapalenie skóry (AZS) i w grupie osób zdrowych (kontrolnej)

2. Zbadanie poziomu ekspresji genu *LELP1* we fragmentach skóry niezmienionej chorobowo oraz z wypryskiem atopowym

3. Zbadanie poziomu białka LELP1 we fragmentach skóry niezmienionej chorobowo oraz z wypryskiem atopowym

4. Analiza związku badanych polimorfizmów *LELP1* z przebiegiem AZS (momentem wystąpienia pierwszych objawów i ich nasileniem) oraz wybranymi parametrami klinicznymi AZS (poziomem całkowitego IgE w surowicy, eozynofilią, poziomem świądu, wartością SCORAD)

5. Analiza związku badanych polimorfizmów *LELP1* z współwystępowaniem astmy i AZS

4. Materiały i metody

4.1 Charakterystyka grupy badanej

4.1.1 Charakterystyka grupy poddanej badaniu występowania polimorfizmów w regionie genu *LELP1*

Badaniem objęto 256 osób. Grupę chorych na atopowe zapalenie skóry stanowiło 152 pacjentów Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wśród których znajdowało się 65 mężczyzn (42,8%) i 87 kobiet (57,2%); stosunek liczbowy mężczyzn i kobiet wynosił 0,7:1; średnia wieku (± SD) wynosiła 24,8 ± 12,1 lat (przedział wiekowy 10-64 lat). Pacjentów rekrutowano na podstawie kryteriów diagnostycznych Hanifina i Rajki [Hanifin, Rajka, 1980]. Średnia wartość wskaźnika SCORAD wynosiła 48,51±22,09 (zakres5-86). Łagodny przebieg AZS zaobserwowano u 27 pacjentów (17,8%), umiarkowany u 72 (47,3%), a ciężki u 53 (34,9%). Średni wiek (±SD) zachorowania wynosił 4,8±8,6 lat. Wczesne wystąpienie AZS (poniżej 2 roku życia) stwierdzono u 83 pacjentów (54,6%). Towarzyszącą astmę zdiagnozowano u 42 pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (27,6%). W badaniu nie brali udziału pacjenci poddawani leczeniu immunosupresyjnemu lub immunoterapii.

Grupę kontrolną w badaniu stanowiło 104 zdrowych ochotników bez chorób alergicznych i immunologicznych wśród których było 40 mężczyzn (38,5%) i 64 kobiety (61,5%); stosunek liczbowy mężczyzn i kobiet wynosił 0,6:1; średnia wieku (±SD) wynosiła 26,3±9,9 lat (przedział wiekowy 15-61 lat).

Charakterystykę grupy 256 osób objętych badaniem przedstawia tabela nr 1.

Tabela.1. Charakterystyka grupy badanej

cecha		pacjenci z AZS n=152	grupa kontrolna n=104
płeć	mężczyzna	65 (42,8%)	40 (38,5%)
	kobieta	87 (57,2%)	64 (61,5%)
przedział wiekowy		10 – 64 lat	15 – 61 lat
poziom IgE w surowicy		2016 ± 2573 [kU/l]	37±42 [kU/l]
poziom świądu		5,2 ± 2,9	-
eozynofilia		7,8 ± 5,8 [%]	2,4 ± 1,5 [%]
SCORAD		48,51 ± 22,09	-
SCORAD zakres		5 - 86	-
przebieg AZS	łagodny	27 (17,8%)	-
	umiarkowany	72 (47,3%)	
	ciężki	53 (34,9%)	
średni wiek zachorowania		4,8 ± 8,6	-
wczesne wystąpienie AZS		83 (54,6%)	-
astma		42 (27,6%)	-

4.1.2 Charakterystyka grupy u której przeprowadzono ilościową ocenę poziomu ekspresji genu *LELP1* oraz białka LELP1

Grupę tą stanowiło 19 pacjentów, 7 mężczyzn (36,8%) oraz 12 kobiet (63,2%); średnia wieku (±SD) wynosiła 32,6±12,5 lat (zakres14-59). Średnia wartość wskaźnika SCORAD to 62,17±14,18 (zakres 35-86). Średnie nasilenie (±SD) świądu (w skali 0-10) wynosiło7,10 ± 1,85; średni poziom IgE (±SD) wynosił 2376±2021 kU/l. Średnia wieku zachorowania (±SD) to 7,07±9,44 roku. Grupę kontrolną stanowiło 26 fragmentów skóry pobranych od zdrowych ochotników. W grupie tej było12 mężczyzn (46,2%) i 14 kobiet (53,8%); średnia wieku wynosiła 38,6 ±12,1 lat (zakres 22-61); średni poziom IgE w tej grupie wynosił 35,26±37,62 kU/l.

Badania zostały przeprowadzone za zgodą (NCSBN/486/2011) lokalnej komisji etycznej (Niezależna Komisja Bioetyczna Do Spraw Badań Naukowych Przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym). Pisemną zgodę na udział w badaniu uzyskano od wszystkich uczestników przed włączeniem do badania. Dane kliniczne dotyczące pacjentów i osób z grupy kontrolnej uzyskano z Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

4.2 Materiał badany

4.2.1 Materiał do badania polimorfizmów genu *LELP1*

Materiał do badań polimorfizmów genu *LELP1* stanowiła krew (2 x 4 ml) pobrana od pacjentów i osób z grupy kontrolnej. Krew pełną wykorzystano w celu izolacji DNA, surowicę uzyskaną po odwirowaniu krwi wykorzystano do oceny poziomu całkowitego IgE. Po pobraniu krew i surowica były przechowywane w temperaturze -80^{0}C do czasu dalszych analiz.

4.2.2 Materiał do ilościowej oceny poziomu ekspresji genu *LELP1* i poziomu białka LELP1

Materiał do badań stanowiły 64 fragmenty skóry otrzymane za pomocą biopsji sztancowych (średnica 2-4 mm, głębokość 3 mm) wykonanych na skórze ramienia (odcinek od stawu łokciowego do stawu barkowego). Wielkość biopsji (średnica 2 lub 4 mm) determinowana była zgodą pacjenta. Od pacjentów z AZS pobrano19 biopsji ze skóry zmienionej (z odczynem zapalnym) i 19 biopsji ze skóry niezmienionej. Grupę kontrolną w badaniu stanowiło 26 fragmentów skóry pobranych od osób zdrowych.

Ilość materiału uzyskiwana z 2 mm biopsji sztancowych była ograniczona, dlatego 64 fragmentów skóry (19 próbek skóry niezmienionej i 19 próbek skóry zmienionej) od pacjentów z AZS oraz 26 próbek skóry osób zdrowych (kontrolnych) zostało wykorzystanych do analizy poziomu transkryptu genu *LELP1*. Natomiast tylko 26 biopsji 4 mm (6 próbek skóry niezmienionej i 6 próbek skóry zmienionej od pacjentów z AZS oraz 14 próbek skóry osób zdrowych) zostało wykorzystanych do badania poziomu mRNA *LELP1* oraz do pomiaru poziomu białka LELP1. Biopsję skóry niezmienionej chorobowo u osób z AZS pobierano w odległości co najmniej 10 cm od obszaru skóry zmienionej chorobowo. Po pobraniu fragmenty skóry były umieszczane w buforze stabilizującym RNA (*RNA-later*, Qiagen) i przechowywane w temperaturze -20^{0}C do dalszych analiz.

4.3 Bufory i roztwory

Bufor TAE 50 x stężony (1litr)

242 g Tris

57,1 ml kwasu octowego

100 ml EDTA 0,5 M

2% żel agarozowy

3,2 g agarozy

160 ml 1x stężonego buforu TAE

Roztwór bromku etydyny 10 mg/ml

Woda z DEPC (1 litr)

1 litr wody dejonizowanej

1 ml dietylopirowęglanu (DEPC)

Bufory stosowane do trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi

Bufory z firmy *New England Biolabs* dobierane były w celu optymalnego działania stosowanego enzymu restrykcyjnego.

4.4 Wykaz odczynników wykorzystanych w pracy

Nazwa odczynnika	Producent
Agaroza	Sigma-Aldrich
Alkohol etylowy	P. O. Ch. Gliwice
Alkohol izopropylowy	P. O. Ch. Gliwice
BfaI enzym restrykcyjny wraz z buforem	New England Biolabs
BfuCI enzym restrykcyjny wraz z buforem	New England Biolabs
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich
Chloroform	P. O. Ch. Gliwice
Deoksyrybonukleotydy (dNTPs)	Epicentre Technologie
DEPC (dietylopirowęglan)	Sigma-Aldrich
HinfI enzym restrykcyjny wraz z buforem	New England Biolabs
Kit do reakcji ELISA Human LELP1 ELISA Kit	MyBioSource
MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood	Epicentre
Metanol	P. O. Ch. Gliwice
Marker masowy DNA (pUC/MspI, 111-501pz)	A&A Biotechnology
Mix do reakcji Real-Time PCR (genotypowanie) JumpStart TaqReadyMix	Sigma-Aldrich
Mix do reakcji Real-Time PCR (analiza ekspresji) Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR Kit	Applied Biosystems
MwoI enzym restrykcyjny wraz z buforem	New England Biolabs
PCR master mix RAPID	A&A Biotechnology
Proteinaza K	A&A Biotechnology
SDS (sól sodowa siarczanu dodecylu)	Sigma-Aldrich
Sondy do genotypowania	Blirt
Sonda do analizy ekspresji genu *LELP1* NM_001010857.1	Universal Probe Library Probe # 77 Roche
Startery do reakcji PCR	DNA IBB PAN
Starter referencyjny do *TBP*	Roche
Tri Reagent	Sigma-Aldrich
Tris (Tris(hydroksymetylo)aminometan)	Sigma-Aldrich

4.5 Metody

4.5.1 Oznaczenie poziomu IgE w surowicy

Całkowity poziom przeciwciał IgE w surowicy został oznaczony techniką fluoroimmunoenzymatyczną zgodnie z instrukcjami producenta (Phadia, Szwecja). Oznaczenie zostało przeprowadzone w Katedrze i Klinice Dermatologii i Wenerologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

4.5.2 Określenie stopnia ciężkości choroby atopowej

Do oceny stopnia ciężkości choroby atopowej u pacjentów wykorzystano punktową skalę SCORAD (ang. *scoring atopic dermatitis*).
Pacjentów podzielono na trzy grupy: 0-20 punkty — łagodne AZS; 21-60 punktów — umiarkowane AZS; ponad 60 punktów — ciężka postać AZS. Kategoryzacja pacjentów została przeprowadzona w Katedrze i Klinice Dermatologii i Wenerologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego przez dr Magdalenę Trzeciak.

4.5.3 Ocena poziomu świądu

Do oceny poziomu świądu u pacjentów (0-10 punktów) posłużono się wizualną skalą analogową (ang. *visual analogue scale, VNS*) oraz liczbową skalą oceny (ang. *numeric rating scale, NRS*). Ocenę przeprowadziła dr Magdalena Trzeciak z Katedry i Kliniki Dermatologii i Wenerologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

4.5.4 Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej

Genomowe DNA izolowano z 4 ml krwi obwodowej przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu z kolumienkami MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood (*Epicentre*), zgodnie z instrukcją producenta. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C do momentu dalszej analizy. Stężenie i czystości DNA oceniano metodą spektrofotometryczną za pomocą aparatu NanoDrop (*Thermo Scientific*).

4.5.5 Izolacja całkowitego RNA z fragmentów skóry

Fragment skóry homogenizowano w sterylnej probówce z 1 ml odczynnika Tri Reagent (*Sigma-Aldrich*). Izolację całkowitego RNA przeprowadzano zgodnie z procedurą opracowaną przez Chomczyńskiego [Chomczyński, Sacchi, 1987]. Osad RNA przemyto najpierw 96%, a następnie 70% (v/v) etanolem, suszono na powietrzu i zawieszono w jałowej wodzie traktowanej dietylopirowęglanem (50 µl). Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -20°C do momentu dalszej analizy. Stężenie i czystość RNA oceniano metodą spektrofotometryczną za pomocą aparatu NanoDrop (*Thermo Scientific*). Do reakcji RT-PCR używano 25 ng RNA.

4.5.6 Elektroforeza agarozowa DNA

Rozdział elektroforetyczny DNA przeprowadzano w 4% żelu agarozowym, w aparacie poziomym w buforze TAE. 3,2 g agarozy rozpuszczono przez zagotowanie w 80 ml buforu TAE 1x stęż. a następnie po schłodzeniu dodano bromku etydyny tak aby końcowe stężenie wynosiło 0,5 µg/ml. Żel wylewano na saneczki aparatu. Elektroforezę prowadzono przy stałym natężeniu prądu o wartości 50 mA. Żel oglądano przy świetle ultrafioletowym o długości fali 312 nm.

4.5.7 Wykrywanie polimorfizmów rs7534334, rs4845529, rs149304390, COSM529080 w regionie genu *LELP1* za pomocą analizy PCR-RFLP

Układ doświadczalny do analizy polimorfizmów rs7534334, rs4845529, rs149304390, COSM529080 w genie *LELP1* za pomocą enzymów restrykcyjnych został zaprojektowany według sekwencji nukleotydowych fragmentu genu *LELP1* otrzymanych z bazy danych NCBI SNP [Ryc. 10].

rs7534334

CCTCCACCATGTACAACGCTgtgggggctggagactgaaaccatgaactgacaagtaaacgtgttcctctgctgtgcaagactt
ctcctggtgtttctggtgggttttgatttgttttgtttgttgttttacagcactaaaccaccaacaagcaatccctgagaagtgaggctagaaccctgcactc
tcaacaacctttgagaactgactttcctctgaccccacctgctgcttagaggcaggtgcccacttctgaagggtgtacccaggtaatgccaggctgt
gttagagcaaagcctgagagatccataaatatggttgcagctgtgaaag[C/T]gtctaacgccaggaagcaggaaagagatggtatgagggag
aaagaggagtagaatattggtgaaaggtccaggaaggctcaggaaaaggcattgtactacttttctgttagtcctgttgcataatgcttatgcagaagg
gctctcagtacaGGCTGCATGGGTTTAATGCAA

rs149304390

AGTACCCCACGCACTGAGCAGggttgggaaagtcatgtttgaatgaaagtttcctgttattttcagtggtaagaactggtgtgtg
cttcaccttggaatagagtctcaacaattttagagttcaacttaataatatgcctccccagagagctatactgattttaaaacaaaatttaaaatgttatttta
tattgttaaaagaaatcaaagaaatataaccaattaga[C/T]ccaacttgaagtattgtgagggactgaaaatccctgtccatatctaggagttaaact
gtccgtgcagaaatgcctagctcagggcaaaactcaacaggagagaaaaggaattcccttctgaaaatcacattttgtggctctatcattcagattttca
gagaaattggaatttcgtggttcatctcctgatttcttcccttaccctattatttatcagaacctggatggagacaaaggagtgggcagttctagagtagc
ccatgggAACCCACTCATGGCAGGG

rs4845529

ATAAACCCCATATGAGGTTTCtccatcttcaactcatgatcttctattcaataaacacttgttaaactgaaatgaactgaaggcctc
aggtctccccagtggcccaagggccaaagccatatttccaataaccacccaagagggtt[C/G]actctaactaaactcttctcagacttaaacccat
attcttttagcacaaatctgttcccctgtttcctcagctctcattaaaagtaatactaacaccccaaaacctggtgaaacattgtcccaaagagttaaacaa
acgagtgactaatacaaattcttgagtttacatgatagtagattttaaaaaaagaacaacttgctgaaatgCTGAAACTCTCTCCATT
TG

COSM529080

TATTTCTTTGCAGGGCTCAGAtaatcaagaaacaatgtcgagtgatgataaaagtaaatcaaatgaccccaagactgagccc
aagaactgcgatcccaagtgtgaacaaaagtgtgagtccaaatgccagcccagctgtttaaagaagctgctgcaacgctgtttcgaaaagtgcccat
gggaaaagtgtccagcaccacccaagtgcctgccctgcccct[A/C]gcagtctccttcatcctgcccctcccagccctgcaccaagccctgtcct
cctaaatgcccttcatcctgcccacatgcttgcccacctccctgcccctcccccagagtgaggcactgtgggcactacccaaccccaccaccactgcc
acctccaccatgtacaacgctgtggggctggagactgaaaccatgaactgacaagtaaacgtgttcctctgctgtgcaagacttctcctggtgtttctg
gtgggttttgatttgttttgtttgttgttttacagcactaaaccaccaacaAGCAATCCCTGAGAAGTGAGG

Ryc. 10. Fragmenty sekwencji genu *LELP1* zawierające miejsca występowania SNP. W sekwencji fragmentu genu *LELP1* dla czterech badanych SNP, kolorem niebieskim oznaczono umiejscowienie sekwencji startera sensownego, na zielono startera antysensownego. Miejsce polimorficzne zaznaczono kolorem czerwonym.

Genomowy DNA poddawano trawieniu w buforze o optymalnym składzie dla danego enzymu. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl. Reakcje przeprowadzano w cienkościennych, jałowych probówkach.

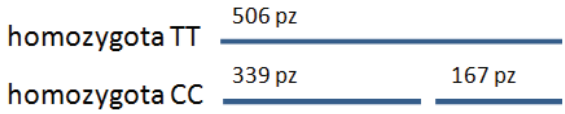
Poszczególne składniki mieszaniny:

jałowa woda dejonizowana, 2 µl optymalnego dla używanego enzymu buforu reakcyjnego 10x stęż., roztwór DNA, enzym restrykcyjny.

Po dodaniu wszystkich składników mieszaninę osadzono przez wirowanie (10 sek. 12000 obr./min.). Trawienie prowadzono w temperaturze zalecanej przez producenta, właściwej dla działania użytego enzymu restrykcyjnego. Czas trawienia zależny był od ilości DNA w próbie oraz aktywności enzymu. Produkty reakcji trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi rozdzielano na żelu agarozowym.

polimorfizm rs7534334

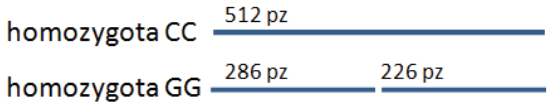
Produkt PCR wielkości 506 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego MwoI. Po rozdziale elektroforetycznym uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel T identyfikowano obecnością fragmentu o wielkości 506 pz, natomiast allel C za pomocą fragmentów 339 pz i 167 pz [Ryc. 11].



Ryc. 11. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu rs7534334 [C/T].

polimorfizm rs149304390

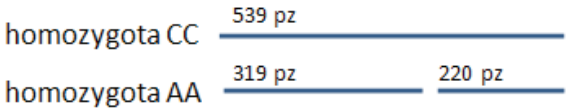
Produkt PCR wielkości 512 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego BfuCI. Po rozdziale elektroforetycznym uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel C identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 512 pz, natomiast allel T za pomocą fragmentów 226 pz i 286 pz [Ryc. 12].



Ryc. 12. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu rs149304390[C/T].

polimorfizm COSM529080

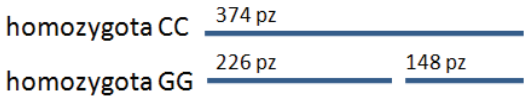
Produkt PCR wielkości 539pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego BfaI. Po rozdziale elektroforetycznym uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel C identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 539 pz, natomiast allel A za pomocą fragmentów 319 pz i 220 pz [Ryc. 13].



Ryc. 13. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu COSM529080[A/C].

polimorfizm rs4845529

Produkt PCR wielkości 374pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego HinfI . Po rozdziale elektroforetycznym uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel C identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 374 pz, natomiast allel G za pomocą fragmentów 226 pz i 148 pz [Ryc. 14].



Ryc. 14. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu rs4845529[C/G].

4.5.8 Wykrywanie polimorfizmów rs140466902, rs142724966, rs144538546 w regionie genu *LELP1* za pomocą sond typu FRET

Układ doświadczalny do analizy polimorfizmów rs140466902, rs142724966, rs144538546 w regionie genu *LELP1* za pomocą sond typu FRET,

został zaprojektowany według sekwencji nukleotydowych fragmentu genu *LELP1* otrzymanych z bazy danych NCBI SNP [Ryc. 15]. Zakonserwowanie sekwencji genu *LELP1* w genomie ludzkim oraz zbadanie homologii do sekwencji genomowej innych typów organizmów określono na podstawie porównania sekwencji badanej z innymi dostępnymi w bazie NCBI. Zaprojektowano 3 układy amplifikacyjne składające się z dwóch starterów i jednej sondy FRET. Fluorofory do sond zostały dobrane zgodnie z wymaganiami aparatu *LightCycler 480* firmy *Roche*. Do analizy struktur II-rzędowych wykorzystano program *Beacon Designer Online Edition* firmy *PrimerBiosoft*. Analiza wykazała, że żadne z wyszczególnionych struktur nie powinny mieć wpływu na wydają amplifikację i specyficzność układu. Specyficzność i selektywność zaprojektowanych układów potwierdzono z wykorzystaniem programu *NCBI NucleotideBlast* (sekwencje sond) oraz *NCBI PrimerBlast* (sekwencje starterów). Wstępna analiza sekwencji badanego fragmentu genu *LELP1* wykazała homologię do analogicznych sekwencji w kilku innych organizmach. Listę gatunków względem, których zaprojektowany układ doświadczalny wykazuje homologię przedstawiono w tabeli 2.

W obrębie ludzkiego genomu startery oraz sondy zaprojektowane do układów *LELP1* rozpoznawały tylko sekwencję genu *LELP1*. Przeanalizowano wszystkie możliwe stabilne struktury II-rzędowe tworzone przez oligonukleotydy. Otrzymane wyniki wykazały, że żadna ze struktur, które mogły powstać w mieszaninie reakcyjnej nie powinna mieć wpływu na wydajność amplifikacji i specyficzność układu doświadczalnego.

Ryc. 15. Fragmenty sekwencji genu *LELP1* w obrębie których występują badane za pomocą sond typu FRET miejsca polimorficzne.
W sekwencji fragmentu genu *LELP1* dla trzech badanych SNP, kolorem niebieskim oznaczono sekwencje komplementarne dla startera sensownego, na fioletowo dla startera antysensownego, a dla sondy kolorem czerwonym.

Tabela. 2. Specyficzność i selektywność zaprojektowanych układów doświadczalnych (oceniono za pomocą programu *Beacon Designer Online Edition*).

SNP	**specyficzność w obrębie *Homo sapiens***	**specyficzność do innych gatunków**			
		gatunek	startery	sonda A	sonda B
rs140466902	*envelope-like proline-rich 1* (*LELP1*)	*Pongoabelii*	-	X	X
		Aotusnancymaae	-	X	X
		Macacanemestrima	-	X	X
		Cercocebusatys	-	X	X
		Mandrilluslecophaeus	-	X	-
		Pan troglodytes	X	X	-
		Papioanubis	-	X	-
		Pan paniscus	-	X	-
		Chlorocebussabeus	-	X	X
		Macacamulatta	-	X	X
		Macacafascicularis	-	X	X
		Colobusangolensis	-	-	X
		Rhinopithecusroxellana	-	-	X
		Gorillagorilla	-	-	X
rs142724966	*envelope-like proline-rich 1* (*LELP1*)	*Pan troglodytes*	X	X	-
		Pan paniscus	X	X	-
		Gorillagorilla	X	X	-
		Macacanemestrima	-	-	X
		Pongoabelii	X	-	-
		Nomascusleucogenys	X	-	-
		Colobusangolensis	X	-	-
rs144538546	*envelope-like proline-rich 1* (*LELP1*)	———	-	-	-

4.5.9 Amplifikacja fragmentów DNA metodą PCR

Reakcję PCR prowadzono z zastosowaniem specyficznych starterów zaprojektowanych do analizy polimorfizmu pojedynczego nukleotydu [Tab. 3] i wykorzystaniem komercyjnie dostępnej gotowej mieszaniny reakcyjnej (*2xPCR Master Mix RAPID, A&A Biotechnology*). Reakcje przeprowadzano w cienkościennych, jałowych probówkach, przy użyciu termocyklera Eppendorf Personal. Do każdej serii doświadczenia dołączono kontrolę ujemną (dodanie wody zamiast matrycy).

Skład mieszaniny reakcyjnej o całkowitej objętości 20 µl:

2 x PCR RAPID	10 µl
genomowy DNA matrycowy	5 µl (100 ng/µl)
starter 1 (10 µM)	1 µl
starter 2 (10 µM)	1 µl
woda dejonizowana	3 µl

Profil termiczny reakcji PCR:

denaturacja wstępna 3min. temp. 96^{o}C

30 cykli amplifikacji

- denaturacja 3min. temp. 96^{o}C
- przyłączenie starterów 1min., temp. optymalna dla danej pary
- wydłużanie czasu w zależności od długości spodziewanego produktu, średnio 1min. na każde 1000 pz, temp. 72^{o}C
- wydłużanie końcowe 3min. temp. 72^{o}C

Tabela 3. Startery używane w reakcjach PCR

gen SNP	starter	sekwencja	produkt
LELP1 **rs7534334**	LELR	5'-TTGCATTAAACCCATGCAGCC -3'	**506 pz**
	LELF	5'-CCTCCACCATGTACAACGCT -3'	
LELP1 **rs149304390**	149R	5'- CCCTGCCATGAGTGGGTT-3'	**512 pz**
	149F	5'- AGTACCCCACGCACTGAGCAG-3'	
LELP1 **rs4845529**	529R	5'-CAAATGGAGAGAGTTTCAG -3'	**373 pz**
	529F	5'-ATAAACCCCATATGAGGTTTC -3'	
LELP1 **COSM529080**	CR	5'-CCTCACTTCTCAGGGATTGCT -3'	**539 pz**
	CF	5'-TATTTCTTTGCAGGGCTCAGA -3'	
LELP1 **rs140466902**	AGR	5'-GGACTCACACTTTTGTTCACAC -3'	**149 pz**
	AGF	5'-GTATCCTCTCCCACCTACAATG -3'	
LELP1 **rs142724966**	ACR	5'-TAGGAGGACAGGGCTTGGTG -3'	**142 pz**
	ACF	5'-AGCTGTTTAAAGAAGCTGCTGC -3'	
LELP1 **rs4845529**	ATF	5'-TCTAGGAGTTAAACTGTCCGTG -3'	**154 pz**
	ATR	5'-GAAGAAATCAGGAGATGAACCA -3'	
LELP1 **NM_001010857.1** **RT-PCR**	F	5'-GAGGCACTGTGGGCACTAC -3'	**62 pz**
	R	5'-ACAGCGTTGTACATGGTGGA -3'	
TBP	Universal ProbeLibrary Reference Gene Assay Roche, Human TBP Gene Assay		

4.5.10 Amplifikacja fragmentów DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) i genotypowanie z użyciem sond molekularnych

Do amplifikacji fragmentów DNA metodą RT-PCR wykorzystano komercyjnie dostępny mix (*JumpStart Taq Ready Mix for Quantitative PCR, Sigma-Aldrich*). Reakcje przeprowadzano w 96-dołkowych płytkach, przy użyciu aparatu LightCycler 480 firmy Roche. Dla każdej próbki nastawiano dwie

oddzielne reakcje [z sondą A i sondą A', Tab.4]. Do każdej serii doświadczenia dołączono kontrolę ujemną (dodanie wody zamiast matrycy).

Skład mieszaniny reakcyjnej o całkowitej objętości 10 µl:

genomowy DNA matrycowy 2 µl (100 ng/µl)

sonda 1 (10 µM)	0,25 µl
sonda 2 (10 µM)	0,25 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	0,8 µl
mix reakcyjny (Sigma)	5 µl
starter 1 (10 µM)	0,5 µl
starter 2 (10 µM)	0,5 µl
woda dejonizowana	0,7 µl

Profil termiczny reakcji RT-PCR (program *Multi Color HybProbe Red 640, Light Cycler 480 Roche*):

- denaturacja 10 min. temp. 94^{o}C (1 cykl)
- amplifikacja (50 cykli):
    - denaturacja 10 sek. temp. 94^{o}C
    - przyłączenie starterów 20 sek., temp. optymalna dla danej pary
    - wydłużanie czasu w zależności od długości spodziewanego produktu, 15 sek. temp. 72^{o}C
- topienie produktu (1 cykl):
    - 2 min. temp. 94^{o}C
    - 2 min. temp. 40^{o}C
    - temp. 80^{o}C
- chłodzenie (1 cykl) 30 min. temp. 37^{o}C

Do identyfikacji produktów DNA i genotypów używano analizy krzywej topnienia (ang. *Tm calling, LightCycler 480 Software, Roche*).

Tabela 4. Sondy molekularne stosowane w reakcjach PCR.

gen SNP	sonda	sekwencja w kierunku 5'-3'	temperatura topnienia [^{0}C]
LELP1 **rs140466902**	AG-A	AGGGCTCAGATAATCAAGAAACA**G**TGT - 3'-fluoresceina	62
	AG-A'	AGGGCTCAGATAATCAAGAAACA**A**TGT - 3'-fluoresceina	60,5
	AG-B	5'-LC640-AGTGATGATAAAAGTAAATCAAATGACCCCAAG-fosforylowana	63
LELP1 **rs142724966**	AC-A	ATGAAGGAGACTGCGAGGG**G**CA-3'-fluoresceina	64
	AC-A'	ATGAAGGAGACTGCGAGGG**T**CA-3'-fluoresceina	62
	AC-B	5'-LC640-AGGCACTTGGGTGGTGCTGGACAC-fosforylowana	68
LELP1 **rs144538546**	AT-A	GGCAAAACTCAAC**A**GGAGAGAAAAGGA-3'-fluoresceina	63
	AT-A'	GGCAAAACTCAAC**T**GGAGAGAAAAGGA-3'-fluoresceina	63
	AT-B	5'-LC640-TCCCTTCTGAAAATCACATTTTGTGGC-fosforylowana	68

4.5.11 Ilościowa ocena ekspresji genu *LELP1* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT- PCR)

Do ilościowej oceny ekspresji genu *LELP1* metodą RT-PCR wykorzystano komercyjnie dostępną mieszaninę reakcyjną (*Path-ID Multiplex One-Step RT-PCR Kit, Applied Biosystems*) umożliwiającą przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacji podczas jednej reakcji PCR. Reakcje

przeprowadzano w 96-dołkowych płytkach, przy użyciu aparatu LightCycler 480 firmy Roche. Do każdej serii doświadczenia dołączono kontrolę ujemną (dodanie wody zamiast matrycy).

Poziom ekspresji badanego genu został znormalizowany względem transkryptu genu referencyjnego *TBP* (ang. *TATA-binding protein gene*), [Tab. 3.].

Skład mieszaniny reakcyjnej o całkowitej objętości 10 µl:

RNA matrycowy	2 µl (~25 ng/reakcję)
mieszanina enzymów	1 µl
sonda nr 77 Roche (10 µM)	0,1 µl
sonda referencyjna do TBP (10 µM)	0,1 µl
mix reakcyjny (*Applied Biosystems*)	5 µl
starter 1 (10 µM)	0,5 µl
starter 2 (10 µM)	0,5 µl
startery do TBP	0,1 µl
woda dejonizowana	0,7 µl

Profil termiczny reakcji Real-Time PCR:

- odwrotna transkrypcja 10 min. temp. 48^{o}C (1 cykl)
- denaturacja 10 min. temp. 95^{o}C (1 cykl)
- amplifikacja (55 cykli):
- denaturacja 15 sek. temp. 95^{o}C
- przyłączenie starterów 45 sek., temp. 60^{o}C
- chłodzenie (1 cykl) 30 sek. temp. 40^{o}C

Do oceny ekspresji genu *LELP1* używano zaawansowanej, względnej analizy ilościowej (ang. *Advance Relative Quantification, LightCycler 480 Software, Roche*).

4.5.12 Ocena poziomu białka LELP1 w skórze

Próbki skóry zważono, następnie płukano w zimnym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) i homogenizowano w PBS zawierającym 0,5% detergent (IgepalCA-630) (1:2) na lodzie. Homogenaty poddawano dwóm cyklom zamrażania i rozmrażania w celu dezintegracji błon

komórkowych. Homogenaty wirowano przez 5 minut (5000 x g). Otrzymane supernatanty były wykorzystywane do pomiaru poziomu białka LELP1 z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego (ELISA), zgodnie z instrukcją producenta (*Antibody-Protein ELISA kit, MyBioSource, Inc*). Ilość badanego białka w próbce była odczytywana z krzywej standardowej i przeliczana na gram tkanki.

4.5.13 Metody statystyczne

Wszystkie otrzymane wyniki oraz informacje o cechach kliniczno-patologicznych pacjentów zostały skatalogowane w bazie danych (program Excel Microsoft) i poddane analizie statystycznej (STATISTICA Version 10.0 StatSoft, Tulsa, USA).

Obserwowane częstości genotypów testowano pod kątem odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga. Sprawdzenia, czy rozkład badanej cechy jest zgodny z rozkładem normalnym dokonano testem Shapiro-Wilka. Rozkład genotypów w badanych grupach porównywano testem χ^2. Gdy liczebności oczekiwane w tabeli 2 x 2 były niższe niż 5, zamiast testu χ^2 użyto test dokładny Fischera. Dla porównania dwóch prób niezależnych, dla danych w skali porządkowej zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya. Do przeprowadzenia wielokrotnych porównań użyto test ANOVA Kruskala-Wallisa. Natomiast, aby dokonać dokładnej oceny, które próby różnią się między sobą istotnie posłużono się testem post-hoc Dunn'a. Dla porównania danych dotyczących skóry zmienionej z niezmienioną chorobowo u tego samego pacjenta posłużono się testem nieparametrycznym Wilcoxona dla dwóch par zależnych.

Występowanie korelacji pomiędzy dwiema zmiennymi oraz określenia kierunku zmian dokonano na podstawie współczynnika korelacji Spearmana (przyjmując wartości: $r_s=0$ brak korelacji, $r_s=1$ pełna korelacja). Wartość $p<0,05$ uznano za statystycznie istotną. Stosując analizę regresji logistycznej obliczono wartość współczynnika ilorazu szans (ang. *odds ratio, OR*) oraz ryzyko względne (ang. *relative risk, RR*) wraz z 95% przedziałami ufności (ang. *confidence intervals, CI*). W celu oceny powiązań alleli w różnych *loci* wykonano analizę nierównowagi sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium, LD*), przyjęto wartości $r^2=0$

loci są w równowadze sprzężeń, $r^2=1$ *loci* są w nierównowadze sprzężeń i dziedziczą się wspólnie. Obliczenie wartości współczynnika D' pozwoliło na porównanie różnic między obserwowaną częstością występowania haplotypów do częstości oczekiwanych. Jeżeli dwa *loci* są niezależne (występują w równowadze sprzężeń i nie dziedziczą się wspólnie) wartość D'=0.

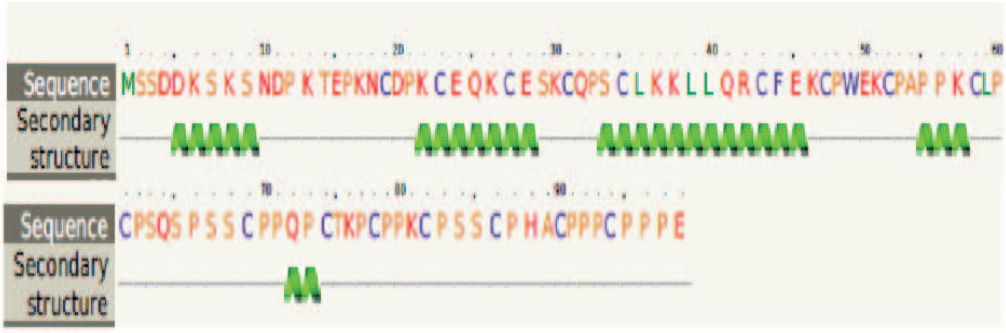
4.6 Programy i bazy danych, z których korzystano w pracy

Beacon Designer Online Edition (http://www.premierbiosoft.com)
Bgee: Gene Expression Evolution (http://www.bgee.org/)
Court lab
(http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20%20HW%20calculator.xls)
Ensemble Genome Browser (http://www.ensembl.org)
HapMap (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)
LightCycler 480 Software, Roche
NCBI Nucleotide-BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)
NCBI Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)
NCBI SNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)
NEBcutter V 2.0 (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/)
Phyre^2 (http:// www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index)
PROMO 3.0 (http://www.alggen.lsi.upc.es/recerca/menu_recerca.html)
UniProt (http://www.uniprot.org/)

5. Wyniki

5.1 Modelowanie molekularne

W celu określenia możliwych konsekwencji biologicznych wystąpienia badanych polimorfizmów w sekwencji kodującej genu *LELP1* przeprowadzono modelowanie molekularne przy użyciu programu Phyre[2] [Met. 4.6]. Analizę rozpoczęto od modelowania przewidywanej struktury drugorzędowej białka LELP1. Przeprowadzone analizy wskazały, że prawdopodobna drugorzędowa struktura białka LELP1 może zawierać pięć α-helis poprzedzielanych odcinkami peptydowymi o nieuporządkowanej strukturze [Ryc. 16]. Z pośród różnych typów struktur drugorzędowych białek, α-helisy są najbardziej regularnymi i najczęściej występującymi strukturami. Ponadto α-helisy mają duże znaczenie w prawidłowym ukształtowaniu domen wiążących DNA, takich jak motyw helisa-skręt-helisa, zamek leucynowy czy motyw palca cynkowego.



Ryc. 16. Przewidywana struktura drugorzędowa LELP1 (wygenerowana przez program Phyre[2]).

Kolejnym etapem modelowania molekularnego było opracowanie przewidywanej struktury trzeciorzędowej LELP1 [Ryc. 7]. W następnym etapie przeprowadzono analizę bioinformatyczną sekwencji genu *LELP1* z wprowadzonymi zmianami wynikającymi z wystąpienia poszczególnych polimorfizmów. Zaobserwowano, że badane polimorfizmy w różny sposób zmieniają trzeciorzędową strukturę białka, co może prowadzić do zaburzenia biologicznej funkcji LELP1 [Ryc. 17, 18, 19].

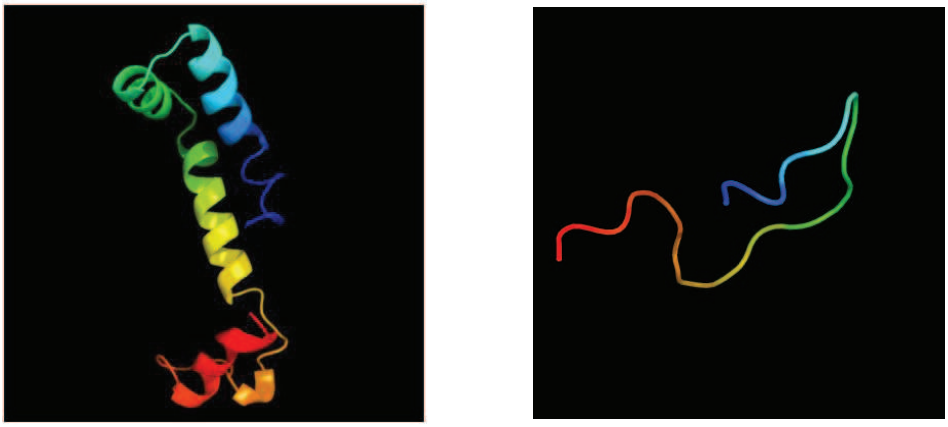
A B

Ryc. 17. Przewidywana zmiana struktury trzeciorzędowej dzikiego LELP1 (A) na skutek wystąpienia wariantu polimorficznego rs140466902[G] (B) w kodonie startu transkrypcji. Wystąpienie SNP prawdopodobnie prowadzi do zaniku struktury trzeciej α-helisy (wygenerowane przez program Phyre[2], procent ufności modelu: 96,7%).
Znaczenie kolorów takie jak w opisie dla Ryc. 7.

A B

Ryc. 18. Przewidywana zmiana struktury trzeciorzędowej dzikiego LELP1 (A) na skutek wystąpienia wariantu polimorficznego z rs142724966[A] (B) w 61 kodonie. Wystąpienie SNP prawdopodobnie skutkuje zanikiem struktur α-helikalnych (wygenerowane przez program Phyre[2], procent ufności modelu: 53%). Znaczenie kolorów takie jak w opisie dla Ryc. 7.

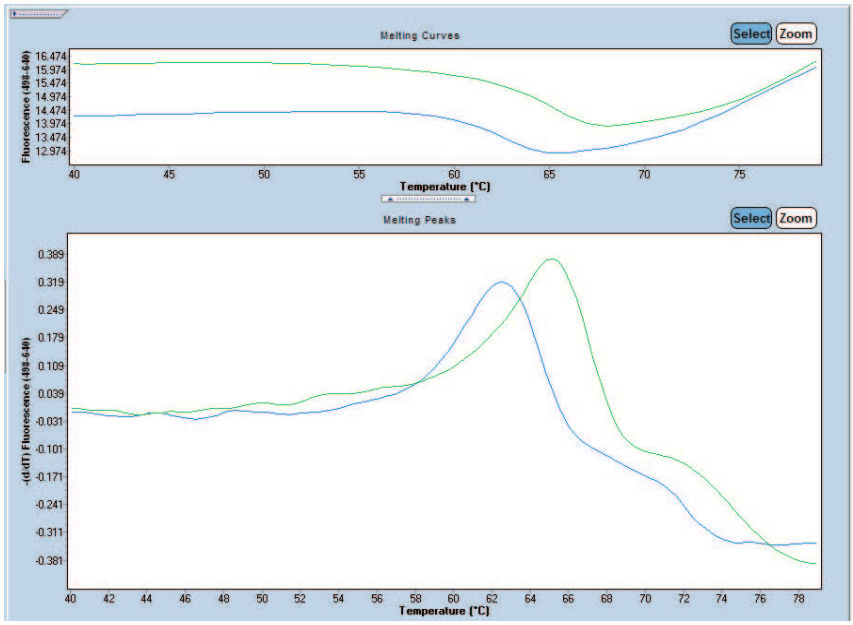
A B



Ryc. 19. Przewidywana zmiana struktury trzeciorzędowej dzikiego LELP1 (A) na skutek wystąpienia wariantu polimorficznego COSM529080[A] (B) w 63 kodonie. Wystąpienie SNP prawdopodobnie skutkuje zanikiem struktur α-helikalnych i całkowitą zmianą uporządkowania struktury trzeciorzędowej białka LELP1(wygenerowane przez program Phyre[2], procent ufności modelu: 75,5%). Znaczenie kolorów takie jak w opisie dla Ryc. 7.

5.2 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs140466902 w regionie genu *LELP1*

Częstotliwość występowania polimorfizmu rs140466902 w regionie genu *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry (n=152) i w grupie kontrolnej (n=104) określono przy pomocy reakcji Real-Time PCR z wykorzystaniem sond molekularnych w układzie FRET [Met. 4.5.8].

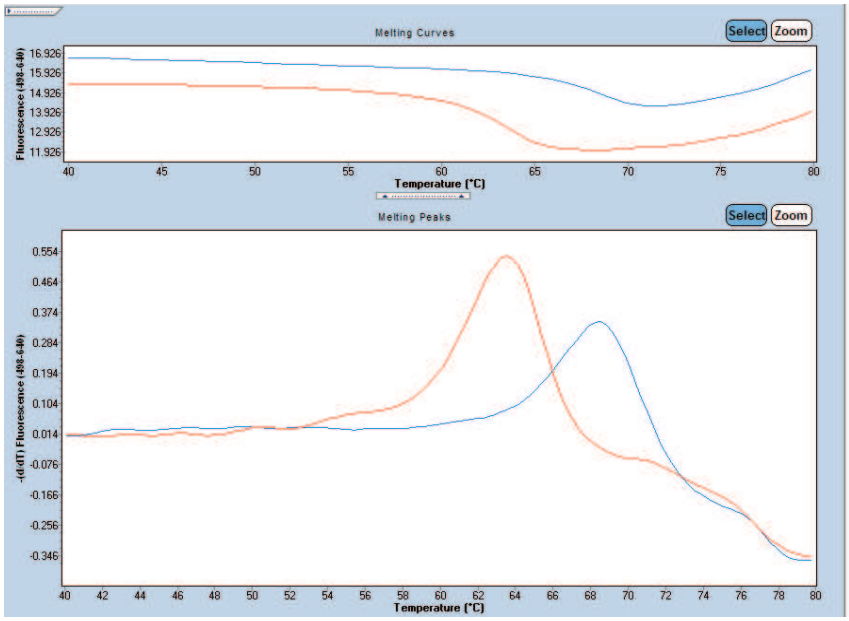


Ryc. 20. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs140466902. Kolorem niebieskim oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu G, na zielono oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu A (próbka o genotypie AA).

Wszystkie analizowane próbki charakteryzowały się ostrym i wyraźnym pikiem z produktu DNA o Tm przy 62^0C (identyfikacja allelu G) oraz pikiem z produktu DNA o Tm przy 66^0C (identyfikacja alleluA), [Ryc. 20]. U całej grupy badanej (n=256) stwierdzono genotyp AA [Tab. 5].

5.3 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs142724966 w regionie genu *LELP1*

Częstotliwość występowania polimorfizmu rs142724966 w regionie genu *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry (n=152) i w grupie kontrolnej (n=104) określono przy pomocy reakcji Real-Time PCR z wykorzystaniem sond molekularnych w układzie FRET [Met. 4.5.8].

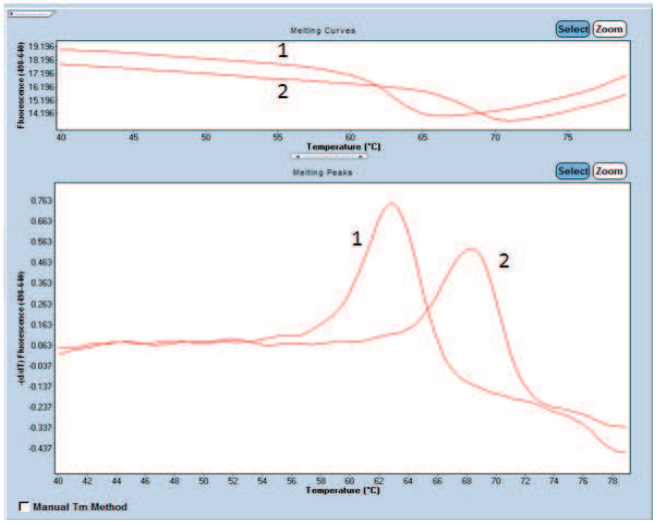


Ryc. 21. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs142724966. Kolorem czerwonym oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu A, na niebiesko oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu C (próbka o genotypie CC).

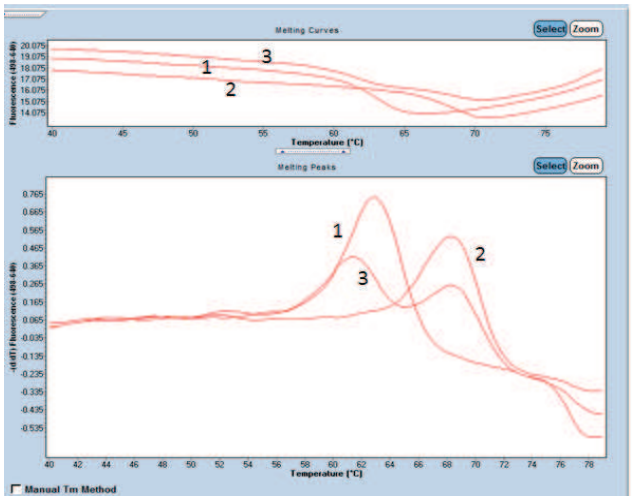
Wszystkie analizowane próbki charakteryzowały się ostrym i wyraźnym pikiem z produktu DNA o Tm przy 63^0C (identyfikacja allelu A) oraz pikiem z produktu DNA o Tm przy 69^0C (identyfikacja allelu C), [Ryc. 21]. U całej grupy badanej (n=256) stwierdzono genotyp CC [Tab. 5].

5.4 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs144538546 w regionie genu *LELP1*

Częstotliwość występowania polimorfizmu rs144538546 w regionie genu *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry (n=152) i w grupie kontrolnej (n=104) określono przy pomocy reakcji Real-Time PCR z wykorzystaniem sond molekularnych w układzie FRET [Met. 4.5.8].



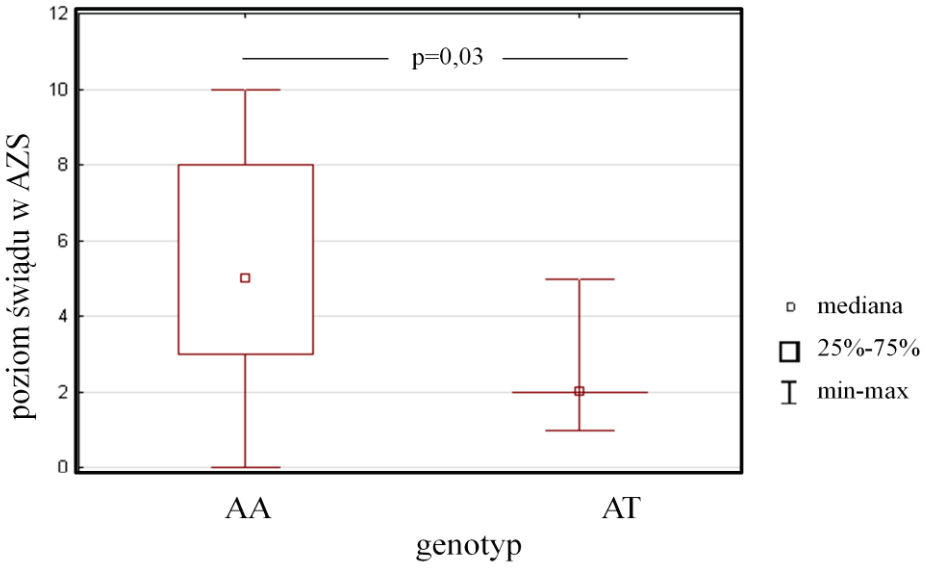
Ryc.22. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs144538546. Numerem 1 oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu T, a numerem 2 oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu A (próbka o genotypie AA).



Ryc. 23. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs144538546. Numerem 1 oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu T, a numerem 2 oznaczono wynik reakcji z sondą specyficzną dla allelu A (próbka o genotypie AA). Numerem 3 oznaczono wynik reakcji dla heterozygoty AT.

147 (97%) próbek wśród grupy pacjentów z AZS oraz 90 (87%) próbek wśród grupy kontrolnej charakteryzowało się ostrym i wyraźnym pikiem dla produktu DNA o Tm przy 63^0C (identyfikacja allelu T) oraz pikiem z produktu DNA o Tm przy 69^0C (identyfikacja allelu A), [Ryc. 22]. W obrębie tej grupy badanych (n=237) stwierdzono genotyp AA. Natomiast wariant heterozygotyczny AT rs144538546 *LELP1* zidentyfikowano u 5 (3%) osób chorych i 14 (13%) zdrowych ochotników [Ryc. 23]. Wykazano, że genotyp AA rs144538546 występuje 1,6-krotnie częściej w grupie osób z AZS i jest to wartość istotna statystycznie (p=0,0023). Allel A rs144538546 występuje 1,5-krotnie częściej u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (p=0,0028). Ponadto genotyp AA i allel A 4-krotnie zwiększają szansę wystąpienia choroby (AA: OR=4,573, p=0,0047, RR=1,118, p=0,0074; A: OR=4,312, p=0,0057, RR=1,054, p=0,008).

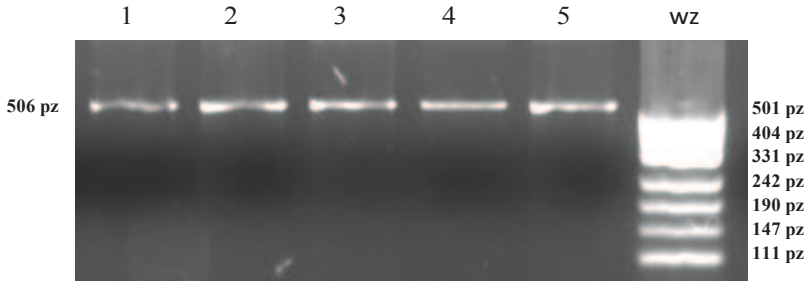
Analiza statystyczna wykazała zależność pomiędzy polimorfizmem rs144538546 *LELP1* a poziomem świądu w grupie osób z AZS (p=0,03), [Ryc. 24].



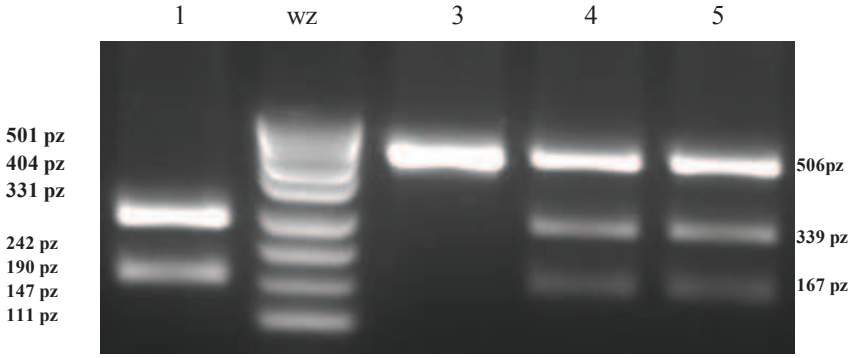
Ryc.24. Związek między genotypem *LELP1* (rs144538546) a poziomem świądu u pacjentów z AZS (analizowano testem ANOVA Kruskala-Wallisa).

5.5 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs7534334 w regionie genu *LELP1*

Częstotliwość występowania polimorfizmu rs7534334 w regionie genu *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry (n=152) i w grupie kontrolnej (n=104) określono przy pomocy metody PCR-RFLP [Ryc. 25, 26].



Ryc. 25. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR rs7534334 (ścieżki 1-5). Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Rozdział prowadzono w 2% żelu agarozowym.

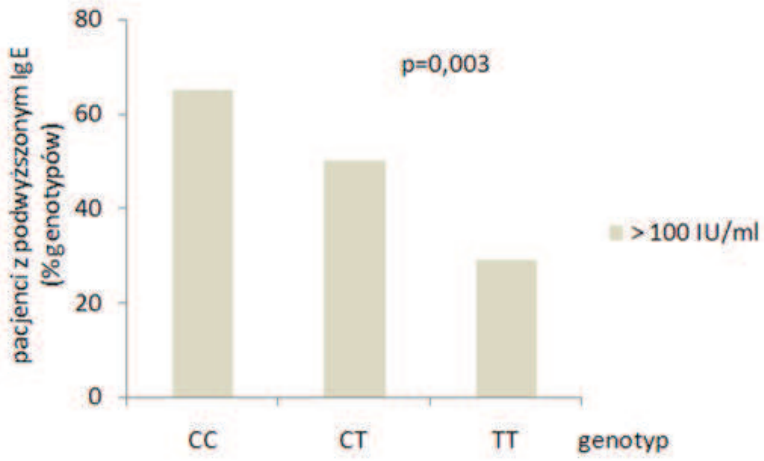


Ryc. 26. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA (ścieżki 1,3-5) enzymem MwoI. Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Na ścieżce 1 wynik trawienia DNA homozygoty CC, na ścieżce 3 wynik trawienia DNA homozygoty TT, na ścieżkach 4 i 5 wynik trawienia DNA heterozygoty CT. Rozdział prowadzono w 4% żelu agarozowym.

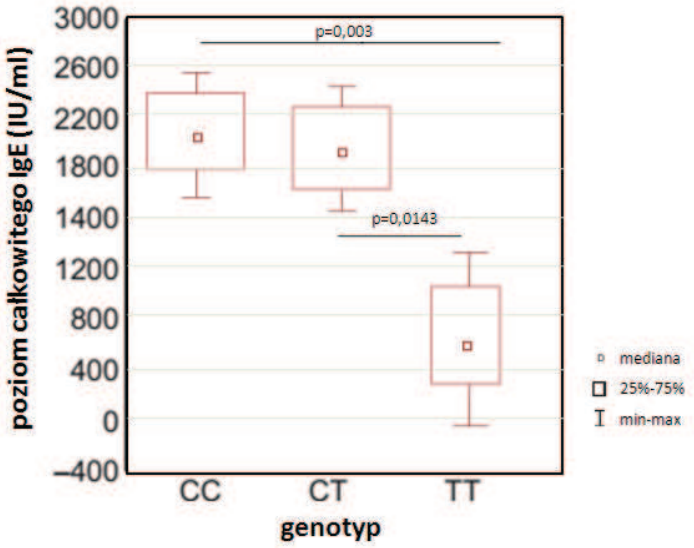
Genotypy określono w całej grupie badanej (n=256). Genotyp CC zaobserwowano u 46% chorych na AZS (n=70) i 31% osób zdrowych (n=32). Genotyp CT zaobserwowano u 44% chorych (n=67) i 56% zdrowych (n=58). Genotyp TT zaobserwowano u 10% chorych (n=15) i 13% zdrowych (n=14),

[Tab. 5]. Allel T występował u 32% chorych na AZS (n=97) i 41% zdrowych (n=86). Allel C występował u 68% chorych (n=207) i 59% zdrowych (n=122).

Porównanie genotypu *LELP1* rs7534334 z cechami klinicznymi wykazało, że genotyp CC (p=0,003) i allel C (p=0,001) były związane z podwyższonym poziomem IgE w surowicy [Ryc. 27, 28]. Ponadto pacjenci z genotypem TT prezentowali łagodniejszy przebieg choroby w porównaniu z osobami o genotypie CT, charakteryzującymi się cięższym przebiegiem AZS (p=0,018).

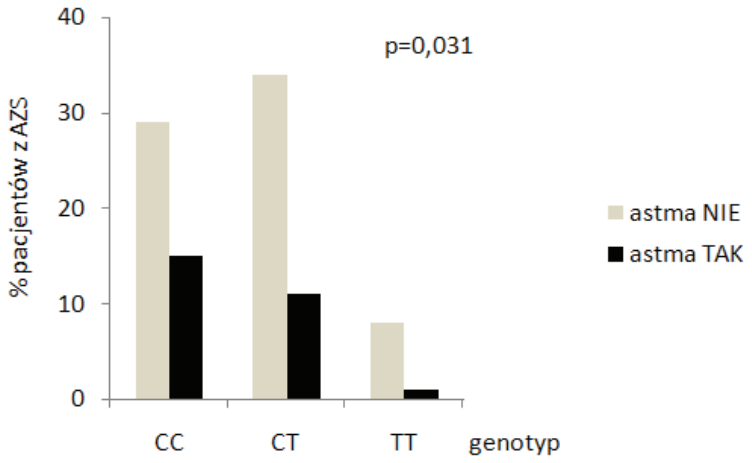


Ryc. 27. Związek między genotypem *LELP1* (rs7534334) a występowaniem podwyższonego poziomu IgE w surowicy (powyżej 100 IU/ml) u pacjentów z AZS (analizowano testem chi-kwadrat).



Ryc.28. Związek między genotypem *LELP1* (rs7534334) a poziomem całkowitego IgE w surowicy (IU/ml) u pacjentów z AZS (analizowano testem ANOVA Kruskala-Wallisa, z testem *post-hoc* Dunna).

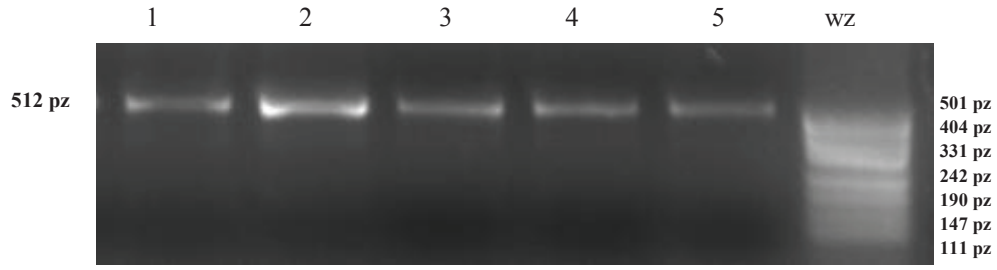
Genotyp CC i allel C *LELP1* rs7534334 były związane z współwystępowaniem astmy u osób chorych na AZS (odpowiednio p=0,03 i p=0,01), [Ryc. 29]. Wykazano także istotny statystycznie związek genotypu CC i allelu C *LELP-1* rs7534334 z eozynofilią (odpowiednio p=0,002 i p=0,001), Polimorfizm rs7534334 *LELP1* około 2,5-krotnie zwiększał szansę wystąpienia AZS (p=0,043, OR=2,41, RR=1,5).



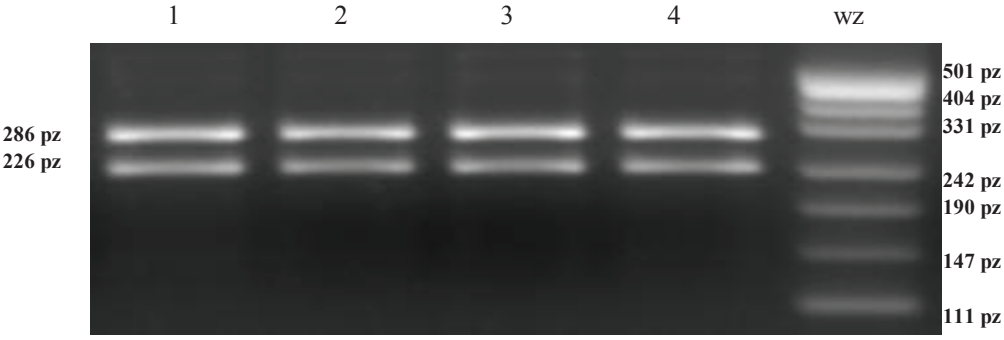
Ryc. 29. Związek między genotypem *LELP1* (rs7534334) a współwystępowaniem astmy u pacjentów z AZS (analizowano testem chi-kwadrat).

5.6 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs149304390 w regionie genu *LELP1*

Częstotliwość występowania polimorfizmu rs149304390 w regionie genu *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry (n=152) i w grupie kontrolnej (n=104) określono przy pomocy metody PCR-RFLP [Ryc. 30, 31].



Ryc. 30. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR rs149304390 (ścieżki 1-5). Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Rozdział prowadzono w 2% żelu agarozowym.

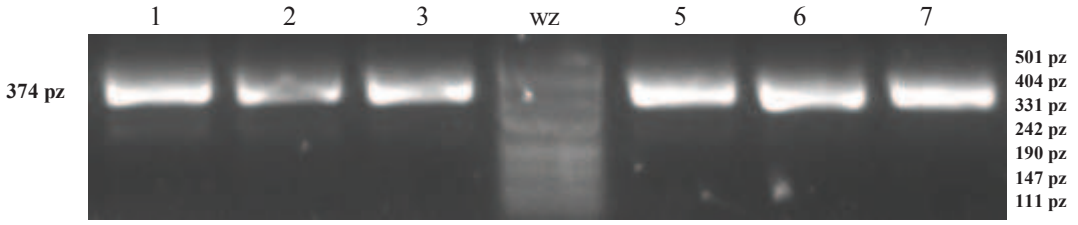


Ryc. 31. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA (ścieżki 1-4) enzymem BfuCI. Na ścieżkach 1-4 wynik trawienia DNA homozygoty TT. Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Rozdział prowadzono w 4% żelu agarozowym.

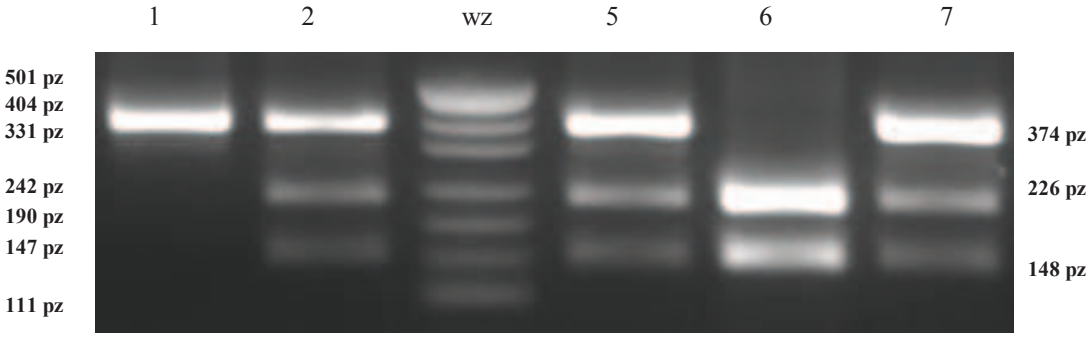
Przeprowadzone analizy pokazały, że u całej grupy badanej (n=256) występował genotyp TT [Tab. 5].

5.7 Częstotliwość występowania polimorfizmu rs4845529 w regionie genu *LELP1*

Częstotliwość występowania polimorfizmu rs4845529 w regionie genu *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry (n=152) i w grupie kontrolnej (n=104) określono przy pomocy metody PCR-RFLP [Ryc. 32, 33].



Ryc. 32. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR rs4845529 (ścieżki 1-3, 5-7). Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Rozdział prowadzono w 2% żelu agarozowym.

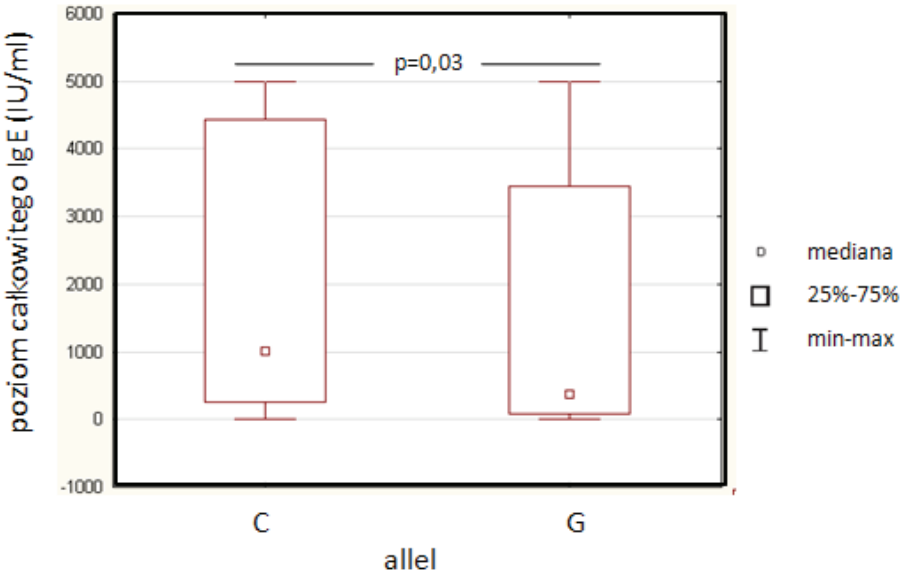


Ryc. 33. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA (ścieżki 1,2,5-7) enzymem HinfI. Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Na ścieżce 1 wynik trawienia DNA homozygoty CC, na ścieżkach 2, 5, 7 wynik trawienia DNA heterozygoty GC, na ścieżce 6 wynik trawienia DNA homozygoty GG. Rozdział prowadzono w 4% żelu agarozowym.

Genotypy określono w całej grupie badanej (n=256). Genotyp CC zaobserwowano u 36% chorych na AZS (n=55) i 26% zdrowych (n=27), [Tab. 5]. Genotyp CG zaobserwowano u 50% chorych (n=76) i 52% zdrowych (n=54). Genotyp GG zaobserwowano u 14% chorych (n=21) i 22% zdrowych (n=23).

Allel C występował u 61% chorych na AZS (n=186) i 52% zdrowych (n=108). Allel G występował u 39% chorych (n=118) i 48% zdrowych (n=100).

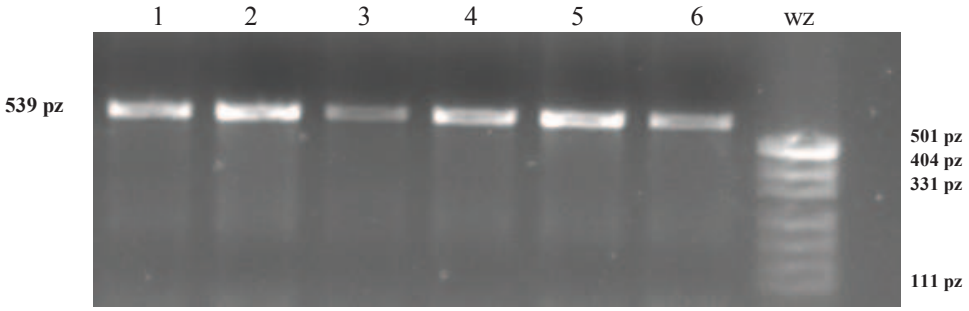
Analiza regresji logistycznej wykazała, że allel C rs4845529 zwiększał około 1,5-krotnie szansę wystąpienia AZS (OR=1,46, p=0,0377, RR=1,178, p=0,042). Zaobserwowano istotny związek allelu C rs4845529 z poziomem IgE w surowicy u osób chorych (p=0,032), [Ryc. 34].



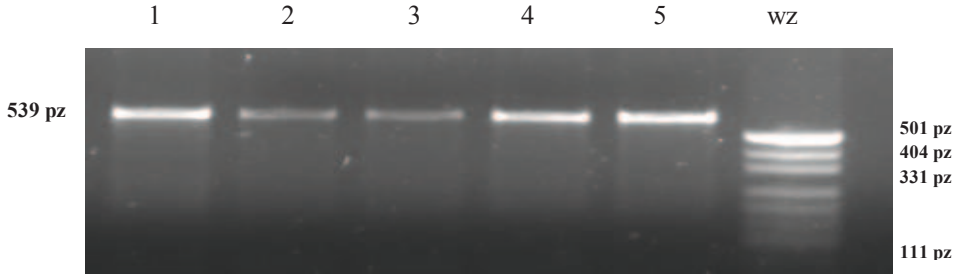
Ryc. 34. Związek między allelami genu *LELP1* (rs4845529) a poziomem całkowitego IgE w surowicy (IU/ml) u pacjentów z AZS (analizowano testem ANOVA Kruskala-Wallisa, z testem *post-hoc* Dunna).

5.8 Częstotliwość występowania polimorfizmu COSM529080 w regionie genu *LELP1*

Częstotliwość występowania polimorfizmu COSM529080 w regionie genu *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry (n=152) i w grupie kontrolnej (n=104) określono przy pomocy metody PCR-RFLP [Ryc. 35, 36].



Ryc. 35. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR COSM529080 (ścieżki 1-6). Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Rozdział prowadzono w 2% żelu agarozowym.



Ryc. 36. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA (ścieżki 1-5) enzymem BfaI. Ścieżka wz zawiera wzorzec masowy. Na ścieżkach 1-5 wynik trawienia DNA homozygoty CC. Rozdział prowadzono w 4% żelu agarozowym.

Przeprowadzone analizy pokazały, że u całej grupy badanej (n=256) występował genotyp CC [Tab. 5].

Tabela 5. Częstotliwość występowania genotypów i alleli genu *LELP1* u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i w grupie kontrolnej, z analizą regresji logistycznej dla badanych polimorfizmów. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości istotne statystycznie (p<0,05).

SNP	genotyp /allel	częstotliwość w grupie pacjentów z AZS (n=152)	częstotliwość w grupie kontrolnej (n=104)	p	OR	-95%CL	+95%CL	p
rs7534334	CC	70 (46%)	32 (31%)	**0,046**	2,415	1,022	5,707	**0,043**
	TT	15 (10%)	14 (13%)					
	CT	67 (44%)	58 (56%)					
	C	207 (68%)	122 (59%)	**0,0022**	1,5	1,043	2,170	**0,029**
	T	97 (32%)	86 (41%)					
rs144538546	AA	147 (97%)	90 (87%)	**0,0023**	4,573	1,594	13,125	**0,0047**
	TT	0	0					
	AT	5 (3%)	14 (13%)					
	A	299 (98%)	194 (93%)	**0,0028**	4,312	1,530	12,173	**0,0057**
	T	5 (2%)	14 (7%)					
rs4845529	CC	55 (36%)	27 (26%)	0,085	1,617	0,934	2,801	0,0863
	GG	21 (14%)	23 (22%)					
	CG	76 (50%)	54 (52%)					
	C	186 (61%)	108 (52%)	**0,037**	1,46	1,022	2,085	**0,0377**
	G	118 (39%)	100 (48%)					
rs149304390	TT	152 (100%)	104 (100%)	-	-	-	-	-
	CC	0	0					
	CT	0	0					
	T	304 (100%)	208 (100%)	-	-	-	-	-
	C	0	0					
rs140466902	AA	152 (100%)	104 (100%)	-	-	-	-	-
	CC	0	0					
	AC	0	0					
	A	304 (100%)	208 (100%)	-	-	-	-	-
	C	0	0					
rs142724966	CC	152 (100%)	104 (100%)	-	-	-	-	-
	AA	0	0					
	CA	0	0					
	C	304 (100%)	208 (100%)	-	-	-	-	-
	A	0	0					
COSM529080	CC	152 (100%)	104 (100%)	-	-	-	-	-
	AA	-	-					
	CA	-	-					
	C	304 (100%)	208 (100%)	-	-	-	-	-
	A	-	-					

5.9 Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów w regionie genu *LELP1*

Dla wszystkich badanych polimorfizmów wartości obserwowane porównywano z wartościami oczekiwanymi na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga, zużyciem testu chi-kwadrat lub dokładnego testu Fishera.

Analizę nierównowagi sprzężeń przeprowadzono dla trzech polimorfizmów w regionie genu *LELP1* (rs7534334, rs144538546, rs4845529), dla których wykazano istotny statystycznie związek z wystąpieniem atopowego zapalenia skóry.

Ocenę, czy obserwowane częstości genotypów były w równowadze Hardy'ego-Weinberga przeprowadzono posługując się kalkulatorem statystycznym opracowanym przez M. Court [Court M. 2005-2008, Met. 4.6].

Badane polimorfizmy (rs7534334, rs144538546, rs4845529) znajdowały się w równowadze Hardy'ego-Weinberga ($p>0,05$), [Tab.6].

Badane polimorfizmy nie były ze sobą skorelowane ($r^2=0$), [Tab. 7].

Tabela 6. Porównanie częstości genotypów (rs7534334, rs144538546, rs4845529) obserwowanych z wartościami oczekiwanymi na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga.

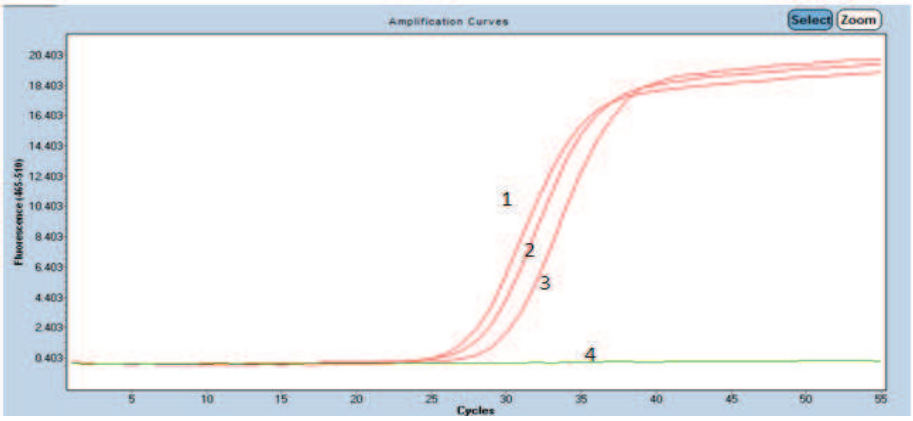
SNP (pozycja na chromosomie 1)	genotyp	wartości obserwowane	wartości oczekiwane	p
rs7534334 (1:153205376)	CC	70	70,5	0,86
	CT	67	66	
	TT	15	15,5	
rs144538546 (1:153203922)	AA	147	147	0,84
	AT	5	4,9	
	TT	0	0	
rs4845529 (1:153201885)	CC	55	56,9	0,52
	CG	76	72,2	
	GG	21	22,9	

Tabela 7. Analiza nierównowagi sprzężeń przeprowadzona dla badanych polimorfizmów w regionie genu *LELP1* (rs7534334, rs144538546, rs4845529).

SNP	SNP locus	D	r^2
rs7534334	A1=C A2=T	0,028	0,015
rs4845529	B1=C B2=G		
rs7534334	A1=C A2=T	0	0
rs144538546	A1=A A2=T		
rs4845529	B1=C B2=G	0	0
rs144538546	B1=A B2=T		

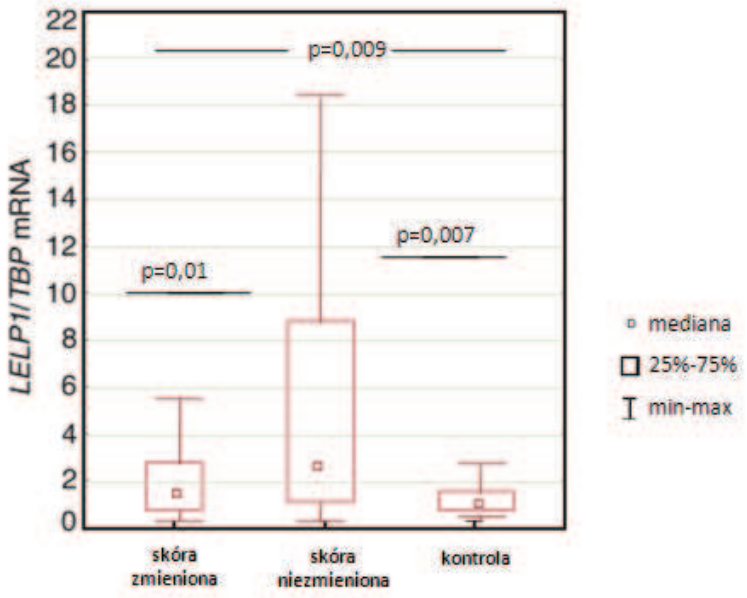
5.10 Poziom transkryptu genu *LELP1* w skórze

Dla ilościowej oceny ekspresji genu *LELP1* w badanych tkankach wykorzystano technikę łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym [Met. 4.5.11], [Ryc. 37]. Analizę przeprowadzono w 64 fragmentach skóry pochodzących z 19 biopsji skóry zmienionej chorobowo, 19 biopsji skóry niezmienionej chorobowo od osób z atopowym zapaleniem skóry oraz 26 biopsji pochodzących od zdrowych ochotników, [Met. 4.2.2].



Ryc. 37. Przykładowy wykres fluorescencji.
Numerem 1 oznaczono wynik reakcji RT-PCR z RNA wyizolowanym ze skóry niezmienionej chorobowo, nr 2; zmienionej chorobowo, nr 3; skóry osoby zdrowej, nr 4; próba ujemna (woda zamiast matrycy).

Poziom mRNA *LELP1* był istotnie statystycznie wyższy w skórze pacjentów z AZS w porównaniu do poziomu w skórze osób zdrowych ($p<0,05$). Tendencja ta była obserwowana również po podzieleniu wyników na trzy grupy: skóra zmieniona (n=19), skóra niezmieniona (n=19), kontrola (n=26), ($p<0,05$), [Ryc. 38].



Ryc. 38. Względny poziom ekspresji genu *LELP1*. Poziom mRNA znormalizowano do poziomu ekspresji genu referencyjnego *TBP*. Analizę przeprowadzono testem ANOVA Kruskala-Wallisa.

Poziom ekspresji *LELP1* nie korelował istotnie z cechami klinicznymi pacjentów. Zaobserwowano słabą korelację między poziomem mRNA *LELP1* w skórze niezmienionej a poziomem całkowitego IgE w surowicy (r_s=0,318), związek ten był jednak nieistotny statystycznie (p>0,05), [Tab. 8].

Tabela. 8. Wartości współczynnika korelacji Spearmana (r_s) pomiędzy poziomem ekspresji genu *LELP1* w skórze pacjentów z AZS a cechami klinicznymi.

transkrypt *LELP1*	całkowite IgE	eozynofilia	SCORAD	poziom świądu
skóra niezmieniona	0,318 *p=0,228*	0,421 *p=0,357*	0,192 *p=0,477*	0,045 *p=0,862*
skóra zmieniona	0,274 *p=0,270*	0,328 *p=0,391*	0,073 *p=0,774*	-0,177 *p=0,479*

5.11 Poziom białka LELP1 w skórze

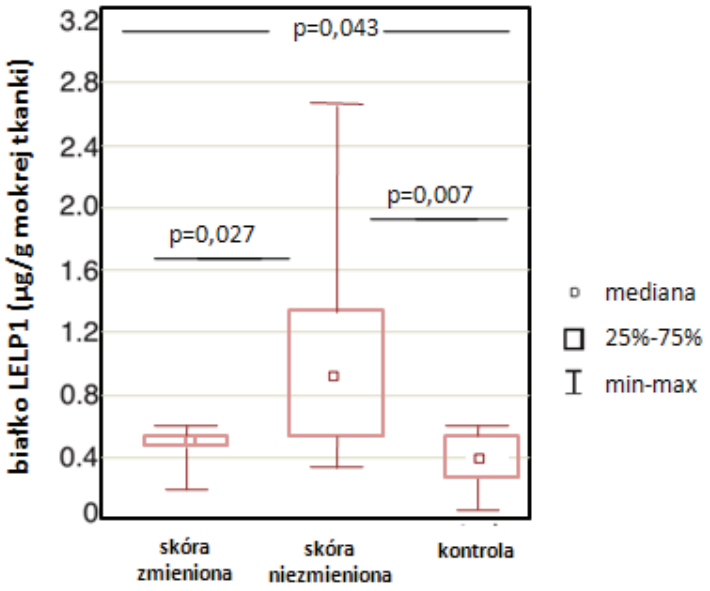
Dla oceny poziomu białka LELP1 w badanych tkankach wykorzystano test immunoenzymatyczny ELISA [Met. 4.5.12]. Analizę przeprowadzono w 26 biopsjach skóry (6 fragmentów skóry zmienionej chorobowo i 6 fragmentów skóry niezmienionej chorobowo od osób z atopowym zapaleniem skóry oraz 14 biopsji pochodzących od zdrowych ochotników) [Met. 4.2.2], [Tab. 9].

Tabela. 9. Ilość białka LELP1 zmierzona w biopsjach skóry osób zdrowych (K1-K14), skóry zmienionej chorobowo u pacjentów z AZS (Z1-Z6), oraz skóry niezmienionej chorobowo pacjentów z AZS (NZ1-NZ6).

biopsje skóry	LELP1 µg/g mokrej tkanki
K1	0,36
K2	0,18
K3	0,6
K4	0,6
K5	0,48
K6	0,24
K7	0,3
K8	0,24
K9	0,54
K10	0,18
K11	0,12
K12	0,12
K13	0,6
K14	0,18
Z1	0,48
Z2	0,48
Z3	0,6
Z4	0,18
Z5	0,48
Z6	0,96

biopsje skóry	LELP1 µg/g mokrej tkanki
NZ1	2,7
NZ2	0,72
NZ3	1,26
NZ4	0,36
NZ5	0,96
NZ6	0,48

Analiza statystyczna wykazała, że poziom białka LELP1 w skórze osób z atopowym zapaleniem skóry jest istotnie statystycznie wyższy niż w biopsjach skóry pobranych od osób zdrowych ($p<0,05$). Tendencja ta była obserwowana również po podzieleniu wyników na trzy grupy: skóra zmieniona (n=6), skóra niezmieniona (n=6), kontrola (n=14), ($p<0,05$), [Ryc. 39]. Porównując poziom białka w skórze zmienionej i niezmienionej osób z AZS, zaobserwowano istotnie niższy poziom LELP1 w skórze objętej wypryskiem niż w skórze niezmienionej chorobowo (p=0,027), [Ryc. 39].



Ryc. 39. Względny poziom białka LELP1 w skórze osób z AZS i w grupie kontrolnej. Analizę przeprowadzono testem ANOVA Kruskala-Wallisa.

Zaobserwowano wysoką ujemną korelację między poziomem białka LELP1 w skórze niezmienionej chorobowo a poziomem całkowitego IgE w surowicy (rs= -0,664) oraz wskaźnikiem SCORAD (rs=0,522). Słabą korelację między poziomem białka LELP1 w skórze niezmienionej chorobowo a poziomem świądu (rs=0,279) oraz eozynofilią (rs=0,286), [Tab. 10].

Zaobserwowano również wysoką korelację między poziomem białka LELP1 w skórze zmienionej chorobowo a poziomem świądu (rs=0,686) oraz przeciętną korelację z eozynofilią (rs=0,491) i wskaźnikiem SCORAD (rs=0,338), [Tab. 10]. Związki te były jednak nieistotne statystycznie (p>0,05).

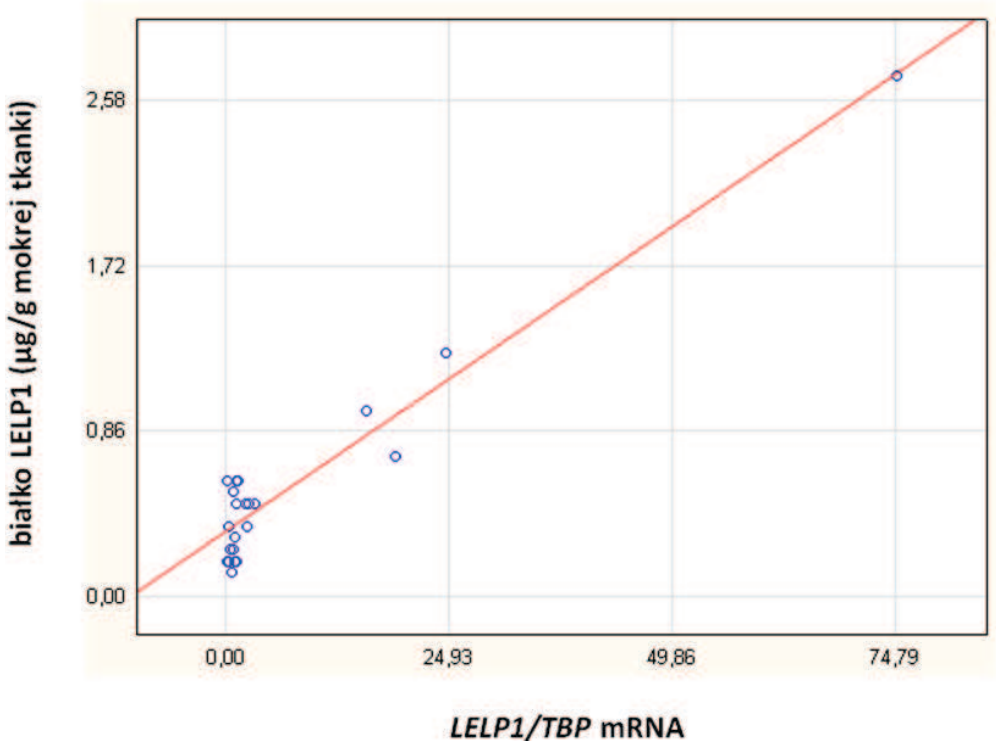
Tabela. 10. Wartości współczynnika korelacji Spearmana (r_s) pomiędzy poziomem białka LELP1 w skórze pacjentów z AZS a cechami klinicznymi.

białko LELP1	**całkowite IgE**	**eozynofilia**	**SCORAD**	**poziom świądu**
skóra niezmieniona	- 0,664 *p=0,150*	0,286 *p=0,614*	0,522 *p=0,288*	0,279 *p=0,591*
skóra zmieniona	0,000 *p=1,000*	0,491 *p=0,428*	0,338 *p=0,512*	0,686 *p=0,132*

5.12 Współwystępowanie badanych zmian molekularnych

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między badanymi polimorfizmami w regionie genu *LELP1* a względnym poziomem ekspresji genu i poziomem białka LELP1 w fragmentach skóry pobranych od osób z AZS ($p>0,05$). Dane dotyczące genotypów polimorfizmów istotnie związanych z AZS, względnym poziomem mRNA i białka w biopsjach skóry zebrano w tabeli nr 11. Dane dotyczące genotypów polimorfizmów istotnie związanych z AZS oraz względnym poziomem mRNA zebrano w tabeli nr 12.

Przeprowadzając analizę korelacji między badanymi czynnikami molekularnymi wykazano istotną statystycznie, dodatnią korelację między poziomem mRNA a ilością białka LELP1 w fragmentach skóry, w całej grupie badanej ($r_2=0,65$, $p=0,0028$), [Ryc. 40].



Ryc. 40. Wykres rozrzutu względnego poziomu mRNA *LELP1/TBP* i poziomu białka LELP1 w biopsjach skórnych (n=26). Korelację określono na podstawie współczynnika korelacji Spearmana ($r_s=0,65$, $p=0,0028$).

Tabela. 11. Zestawienie genotypów (rs7534334, rs4845529, rs144538546 *LELP1*), wartości poziomu mRNA *LELP1* i ilości białka LELP1 u osób z grupy badanej, od których pobrano fragmenty skóry (K – kontrola, Z – skóra zmieniona chorobowo, NZ – skóra niezmieniona chorobowo).

biopsje skóry	**rs7534334**	**rs4845529**	**rs144538546**	**LELP1 µg/g mokrej tkanki**	**względny poziom mRNA *LELP1***
K1	CT	CG	AA	0,36	0,34
K2	CT	CG	AA	0,18	0,95
K3	CC	CG	AA	0,6	0,21
K4	CC	CG	AA	0,6	1,11
K5	CC	CC	AA	0,48	2,23
K6	CT	CG	AA	0,24	0,5
K7	-	-	-	0,3	0,98
K8	-	-	-	0,24	0,93
K9	CC	CC	AA	0,54	0,91
K10	TT	GG	AT	0,18	0,25
K11	CT	CC	AA	0,12	0,73
K12	CT	CG	AA	0,12	0,42
K13	CC	CC	AT	0,6	1,17
K14	TT	GG	AA	0,18	0,39
Z1	CT	CG	AA	0,48	1,22
Z2	CT	CC	AA	0,48	3,26
Z3	CT	CG	AA	0,6	1,42
Z4	CT	CG	AA	0,18	1,25
Z5	CT	CG	AA	0,48	2,58
Z6	CT	CG	AA	0,48	2,58
NZ1	CT	CG	AA	2,7	75
NZ2	CT	CC	AA	0,72	19,02
NZ3	CT	CG	AA	1,26	24,67
NZ4	CT	CG	AA	0,36	2,43
NZ5	CT	CG	AA	0,96	15,8
NZ6	CT	CG	AA	0,96	15,8

Tabela. 12. Zestawienie genotypów (rs7534334, rs4845529, rs144538546 *LELP1*) z wartością względnego poziomu mRNA *LELP1* u osób z grupy badanej, od których pobrano fragmenty skóry (K – kontrola, Z – skóra zmieniona chorobowo, NZ – skóra niezmieniona chorobowo).

biopsje skóry	rs7534334	rs4845529	rs144538546	względny poziom mRNA *LELP1*
K1	CT	CG	AA	0,34
K2	CT	CG	AA	0,95
K3	CC	CG	AA	0,21
K4	CC	CG	AA	1,11
K5	CC	CC	AA	2,23
K6	CT	CG	AA	0,50
K7	-	-	-	0,98
K8	-	-	-	0,93
K9	CC	CC	AA	0,91
K10	TT	GG	AT	0,25
K11	CT	CC	AA	0,73
K12	CT	CG	AA	0,42
K13	CC	CC	AT	1,17
K14	TT	GG	AA	0,39
K15	CT	CG	AA	0,21
K16	CC	CC	AA	0,79
K17	CT	GG	AA	1,72
K18	CT	CC	AA	1,97
K19	TT	GG	AA	1,24
K20	CC	CC	AT	0,27
K21	CC	CC	AA	1,99
K22	-	-	-	2,53
K23	-	-	-	0,17
K24	CC	CC	AA	0,91
K25	TT	CG	AT	0,32
K26	TT	GG	AA	0,39
Z1	CT	CG	AA	1,22
Z2	CT	CC	AA	3,26
Z3	CT	CG	AA	1,42
Z4	CT	CG	AA	1,25
Z5	CT	CG	AA	2,58

biopsje skóry	rs7534334	rs4845529	rs144538546	względny poziom mRNA *LELP1*
Z6	CT	CG	AA	2,58
Z7	CT	CG	AA	3,21
Z8	CC	CC	AA	0,41
Z9	CT	CC	AA	0,89
Z10	CC	CC	AA	2,10
Z11	CC	CC	AA	0,25
Z12	CT	CG	AA	3,61
Z13	TT	GG	AA	7,27
Z14	CC	CG	AA	2,70
Z15	CC	CG	AA	1,05
Z16	CT	CG	AA	5,49
Z17	CT	CG	AA	0,83
Z18	CC	CG	AA	1,12
Z19	CT	GG	AA	1,18
NZ1	CT	CG	AA	75
NZ2	CT	CC	AA	19,02
NZ3	CT	CG	AA	24,67
NZ4	CT	CG	AA	2,43
NZ5	CT	CG	AA	15,8
NZ6	CT	CG	AA	15,8
NZ7	CT	CG	AA	5,69
NZ8	CC	CC	AA	0,41
NZ9	CT	CC	AA	1,33
NZ10	CC	CC	AA	3,74
NZ11	CC	CC	AA	1,02
NZ12	CT	CG	AA	2,91
NZ13	TT	GG	AA	11,65
NZ14	CC	CG	AA	13,65
NZ15	CC	CG	AA	0,88
NZ16	CT	CG	AA	5,93
NZ17	CT	CG	AA	19,01
NZ18	CC	CG	AA	6,42
NZ19	CT	GG	AA	0,70

6. Dyskusja

W swojej pracy przeanalizowałam częstotliwość występowania siedmiu zmian genetycznych (rs140466902, rs142724966, rs144538546, COSM529080, rs149304390, rs4845529 oraz rs7534334) w regionie genu *LELP1* u osób chorujących na atopowe zapalenie skóry i w grupie osób zdrowych oraz przeprowadziłam analizę związku między obecnością tych polimorfizmów a niektórymi parametrami klinicznymi AZS. LELP1 jest niedawno poznanym, małym białkiem bogatym w prolinę, występującym w kopercie rogowej korneocytu, o którego funkcji i dystrybucji tkankowej wiadomo niewiele.

Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, że trzy zmiany genetyczne (rs7534334, rs4845529, rs144538546) związane są z wystąpieniem atopowego zapalenia skóry.

Wiedza dotycząca roli LELP1 w patogenezie chorób atopowych jest znikoma. Przed rozpoczęciem mojej pracy literatura przedmiotu ograniczała się do jednego badania wskazującego na związek rs7534334 *LELP1* z podwyższonym poziomem IgE w surowicy u pacjentów z astmą atopową [4]. W swojej pracy wykazałam związek CC rs7534334 oraz CC rs4845529 z podwyższonym poziomem IgE w surowicy pacjentów z AZS. Ponadto genotyp CC i allel C *LELP1* rs7534334 były związane z współwystępowaniem astmy u osób chorych na AZS. Rozwój astmy atopowej jest wynikiem szeregu patologii w układzie immunologicznym, ale także może być związany z modyfikacją ekspresji genów kodujących białka koperty rogowej. W odróżnieniu do moich wyników poprzednie badania przeprowadzone przez zespół Sharma i wsp. [66] nie wykazały związku rs7534334 z astmą. Badania te przeprowadzono w hinduskich rodzinach obciążonych chorobą (111 astmatyków) oraz w niezależnych, prospektywnych badaniach kliniczno-kontrolnych (165 chorych i 166 osób zdrowych). Badana grupa obejmowała pacjentów z astmą atopową, a analiza tekstu publikacji wskazuje, że przypuszczalnie w grupie pacjentów nie było osób z czystą postacią AZS. Natomiast wśród pacjentów przebadanych w mojej pracy 73% chorych stanowili pacjenci z AZS, a 27% chorych miało AZS z towarzyszącą astmą. Można przypuszczać, że obserwowane w tych dwóch

badaniach różnice mogły wynikać z odmiennych struktur badanych grup. Związek rs7534334 *LELP1* z astmą może być znamienny tylko wśród chorujących na AZS z współtowarzyszącą astmą. Podobne zależności obserwowano dla filagryny, której mutacje R501X oraz 2282del4 były silnymi czynnikami ryzyka AZS oraz astmy, ale astmy rozwijającej się w związku z AZS [24, 67]. Dane literaturowe wskazują, że znaczący procent pacjentów z atopią wykazuje podwyższony poziom IgE w surowicy oraz cierpi z powodu alergii na czynniki środowiskowe. Niektórzy badacze twierdzą, że mutacje (R501X, 2282del4) w genie *FLG* mają związek z astmą jedynie u pacjentów chorujących również na atopowe zapalenie skóry [68, 69]. Natomiast polskie badania osób chorujących na AZS wskazują, że mutacje (R501X, 2282del4) w genie *FLG* są niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju astmy atopowej [70]. Filagryna jest obecnie najszerzej przebadanym białkiem spośród białek koperty rogowej. Jednakże znaczenie zmian w *FLG* w rozwoju chorób dróg oddechowych jest wciąż niejasne i podlega intensywnym badaniom. Postuluje się również, że nadmierna penetracja alergenów do organizmu i proces zapalny w drogach oddechowych w astmie, mogą być związane z polimorficznymi wariantami genów kompleksu EDC, kodującymi małe białka bogate w prolinę (SPRRs), do których należy LELP1. Natomiast ekspresja genów kodujących białka koperty rogowej nie zawsze ogranicza się do skóry. Przykładem może być filagryna, której obecność obserwuje się również w części przedsionkowej nosa [71]. Z kolei dystrybucja tkankowa LELP1 nie jest poznana i w piśmiennictwie brak jakichkolwiek informacji na ten temat a informacje pochodzące z baz danych są niepełne i niejednoznaczne. Zatem obecności białka LELP1 w komórkach nabłonka nie można obecnie wykluczyć, tym bardziej, że ekspresję genów *SPRR2A* i *SPRR2B* należących do tej samej rodziny co *LELP1* obserwuje się w płucach, gdzie ich ekspresja podlega indukcji w odpowiedzi na ekspozycję na alergeny [72-75]. Indukcja tych genów zależy od IL-13 i STAT-6. Natomiast białko STAT-6 jest podstawowym czynnikiem transkrypcyjnym dla IgE. Dlatego można przypuszczać, że ekspresja *LELP1* może być również regulowana przez te same czynniki co IgE np. STAT-6 [76]. Przypuszcza się także, że białka SPRR w nabłonku oddechowym mogą odgrywać rolę sygnalizacyjną, co może wskazywać na ich znaczenie w rozwoju nadmiernej

wrażliwości organizmu na kontakt z antygenem oraz skutkować wystąpieniem astmy atopowej [73]. Biorąc pod uwagę kontrowersje dotyczące związku mutacji *FLG* i nieokreślonej dotąd roli *LELP1* w patogenezie astmy, wydaje się że niezbędne są dalsze badania dla wyjaśnienia związku *LELP1* z astmą. Badania te planuję prowadzić we współpracy z ośrodkiem naukowym w Parmie, we Włoszech, gdzie genotypowaniu poddam próbki pochodzące od pacjentów z tamtejszej Kliniki Alergologii. Planuję określić częstość polimorfizmów w genie *LELP1* u pacjentów z astmą i pacjentów z atopowym zapaleniem skóry z współwystępującą astmą.

Analiza sekwencji genu *LELP1* oraz obszarów flankujących (± 1 kpz) przy użyciu programu bioinformatycznego Phyre[2] wskazuje, że miejsce występowania polimorfizmu rs7534334 znajduje się w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez czynnik transkrypcyjny Pax5 [Ryc. 8]. W obrębie sekwencji GCGTCTAACGC leżącej 255 pz poniżej genu *LELP1* znajdują się dwa miejsca wiązania Pax5, które są względem siebie przesunięte i częściowo się nakładają. Białko Pax5, należy do rodziny czynników transkrypcyjnych Pax (ang. *pairedbox family*) składającej się z dziewięciu wysoce konserwatywnych białek (Pax 1-9) [77]. Białka Pax łączą się z DNA za pomocą domeny PD składającej się z dwóch subdomen; N-końcowej (NTD) i C-końcowej (CTD). Każda z tych subdomen zawiera konserwatywny motyw helisa-skręt-helisa (ang. *helix-turn-helix*, HTH) [78]. Zdolność wiązania DNA przez obie subdomeny jest inna. Domena CTD charakteryzuje się zdolnością do wiązania DNA w miejscach o niskiej zgodności z sekwencją konsensusową, natomiast domena NTD rozpoznaje efektywnie tylko specyficzne sekwencje nukleotydowe [79, 80]. Badania strukturalne białka Pax5 pokazały, że siła wiązania sekwencji nukleotydowych o niskiej zgodności z sekwencją konsensusową przez domenę CTD jest 10 razy słabsza niż wiązanie specyficznych sekwencji przez domenę NTD, która z kolei nie rozpoznaje niespecyficznych sekwencji [79]. Można zatem przypuszczać, że zdolność wiązania Pax5 do sekwencji GCGTCTAACGC będzie zależała od wariantu polimorficznego rs7534334.

Sposób regulacji Pax5 nie jest do końca poznany. Wyniki ostatnich badań pokazały, że acetylotransferaza p300 oddziałuje z C-końcem białka Pax5,

w wyniku czego dochodzi do acetylacji szeregu lizyn w obrębie domeny PD, co skutkuje znaczącym wzmocnieniem aktywności transkrypcyjnej Pax5 [81]. Przeprowadzona przeze mnie analiza bioinformatyczna wykazała, że 2 pary zasad poniżej rs7534334 znajduje się miejsce rozpoznawane przez acetylotransferazę histonów p300 [Ryc. 8]. Można zatem przypuszczać, że rodzaj wariantu polimorficznego rs7534334 może mieć wpływ na wiązanie Pax5 z DNA oraz oddziaływanie tego białka z acetylotransferazą p300 i w efekcie może wpływać na aktywność transkrypcyjną Pax5. Przeprowadzone dotąd badania wykazały, że białko Pax5 posiada również zdolność do tworzenia kompleksów z czynnikami transkrypcyjnymi należącymi do rodziny białek Ets (np. Ets-1, Net-1, Elk-1, SAP-1). Białka te wiążą się do DNA poprzez domenę ETS oraz do białka Pax5 w obrębie domeny PD [82]. Badania strukturalne wykazały, że utworzenie kompleksu Pax5/Ets-1 prowadzi do zmian konformacyjnych w białku Ets-1 indukujących zmiany w obrębie domeny ETS i zwiększających powinowactwo do DNA [82]. Można spekulować, że podobny mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego przez Pax5 może również występować w obrębie genu *LELP1*. Jak zaznaczyłam na rycinie 8 w bezpośrednim sąsiedztwie (oddzielone jednym nukleotydem) sekwencji rozpoznawanej przez Pax5 zlokalizowane jest potencjalne miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego TFIIB. Jednak dla wyjaśnienia ewentualnego wpływu poszczególnych wariantów polimorficznych rs7534334 na formowanie się i aktywność ewentualnego kompleksu czynników transkrypcyjnych w omawianym rejonie polimorficznym *LELP1* niezbędne są dalsze szczegółowe badania.

W obrębie genów kompleksu EDC zauważa się zróżnicowanie etniczne w częstości występowania zmian genetycznych [70, 83-85]. Również analizy przeprowadzone przez zespół Seldini i wsp. wykorzystujące panel SNP w całym genomie ludzkim wskazały na znaczące różnice między populacjami północnych i południowych Europejczyków [86]. Jest to istotne zagadnienie w badaniach mających na celu znalezienie nowych markerów molekularnych chorób. Zależności te obserwuje się także dla zmian w obrębie genu kodującego filagrynę. Związek mutacji typu stop (R501X, 2282del4) w genie *FLG* z rozwojem atopowego zapalenia skóry jest jednym z najsilniejszych związków

genotypu z fenotypem obserwowanym w wieloczynnikowych, ludzkich chorobach genetycznych i wskazuje na znaczenie defektu bariery skórnej w rozwoju chorób alergicznych. Mediana częstości występowania mutacji *FLG* wynosi 7,7% w ogólnej populacji w Europie i 3% w Azji [87]. Ponadto w populacji europejskiej istnieją różnice regionalne, zmiany w genie *FLG* są częstsze u osób pochodzących z północnej Europy niż u Europejczyków z południa [87]. Przeprowadzone w Polsce, wieloośrodkowe badanie wykazało, że wśród polskich atopików 0,8% jest nosicielem mutacji R501X *FLG* [70]. Podobne wyniki otrzymano również w badaniach populacji chorwackiej gdzie częstotliwość występowania tej zmiany była również na bardzo niskim poziomie (0,2%) [84]. Natomiast powszechne występowanie czterech mutacji typu stop w *FLG* (2282del4, R501X, R2447X, S3247X) wykazano w populacjach: angielskiej, irlandzkiej, niemieckiej, holenderskiej [88-91]. Dane te mogą wskazywać, że w populacjach o niskim odsetku nosicieli mutacji w *FLG*, zmiany genetyczne w obrębie innych białek koperty rogowej mogą odgrywać dominującą rolę w patogenezie AZS. Ciekawe w tym kontekście wyniki uzyskałam w badaniach przeprowadzonych przeze mnie podczas stażu naukowego w Laboratorium Genetycznym w Lizbonie w Portugali [92]. Badaniem objęto 384 osoby, w tym z populacji portugalskiej 129 pacjentów z astmą i 110 osób zdrowych oraz z populacji polskiej 45 pacjentów z AZS z współwystępującą astmą i 100 zdrowych osób.

Analiza przeprowadzona dla alleli rs7534334 *LELP1* wykazała, że allel T związany był z ryzykiem wystąpienia astmy w populacji portugalskiej w odróżnieniu do populacji polskiej, w której allel C występował znacząco częściej u chorych na AZS z współwystępującą astmą. Jest to pierwsze międzypopulacyjne badanie dotyczące związku polimorfizmu *LELP1* z występowaniem chorób atopowych — AZS i astmy.

Wyniki doświadczeń przedstawione w niniejszej pracy wskazują także na związek polimorfizmu rs144538546 *LELP1* z poziomem świądu u pacjentów z AZS. Chorzy z genotypem AA *LELP1* charakteryzowali się niższym poziomem świądu w porównaniu do homozygot TT. W piśmiennictwie nie ma doniesień na temat związku polimorfizmu rs144538546 z AZS oraz z cechami klinicznymi

pacjentów. Analizy bioinformatyczne wykazały, że rs144538546 występuje w obrębie promotora genu *LELP1* oraz miejsca wiązania dla czynnika GR-alfa. Dodatkowo wystąpienie allelu T może skutkować zmianą miejsca wiązania dla tego czynnika transkrypcyjnego. Receptor glukokortykoidowy (GR) jest czynnikiem transkrypcyjnym, który ulega aktywacji przez związanie liganda oraz indukuje ekspresję wielu genów [93]. W skórze myszy pozbawionych genu kodującego GR rozwijał się stan zapalny i zauważalne były nieprawidłowości w funkcjonowaniu bariery skórnej [94, 95]. Myszy wykazywały zaburzenia w tworzeniu się koperty rogowej. Ponadto w obrazie mikroskopowym barwionym immunohistochemicznie nie wykryto sygnału dla filagryny i lorykryny [94]. W innym badaniu utrata funkcji GR prowadziła również do niepełnego wykształcenia się naskórka, o czym świadczył brak filagryny, lorykryny i inwolukryny [95]. W badaniach *in vitro*, w których hodowlę keratynocytów traktowano glukokortykosteroidami (GC) zaobserwowano zahamowanie wczesnego różnicowania naskórka z jednoczesną aktywacją końcowego różnicowania. Po 48 godzinach hodowli z GC dochodziło do indukcji LCE2B (ang. *late cornified envelope protein 2B*) [96]. Wyniki te dostarczają informacje o znaczeniu receptora glukokortykoidowego w rozwoju AZS. Rozpatrując konsekwencje wystąpienia rs144538546 nie można jednoznacznie stwierdzić, jakie mechanizmy molekularne regulują ekspresję *LELP1*. Poznanie przypuszczalnego wpływu GR-alfa na aktywację *LELP1* pozostaje tematem otwartym i wymagającym dalszych badań.

W badaniach opartych na pomiarze transepidermalnej utraty wody u osób charakteryzujących się nadmiernie wrażliwą skórą zaobserwowano zaburzenia w budowie bariery naskórkowej [97]. Wykazano, że u osób z AZS intensywność świądu zależy od ilości utraconej wody ze skóry. Im wyższy współczynnik transepidermalnej utraty wody tym silniejszy świąd odczuwali pacjenci [98]. Związek zmniejszonego nawodnienia skóry, jej nadmiernej suchości z przewlekłym świądem, który jest jednym z dominujących objawów w AZS pozostaje niejasny. Najprawdopodobniej nie jest on ograniczony jedynie do roli filagryny w prawidłowym wykształceniu się koperty rogowej.

W pracy wykazałam wyższy poziom mRNA *LELP1* oraz wyższy poziom białka LELP1 w skórze osób chorujących na AZS w porównaniu do kontroli. Tendencja ta była obserwowana również po podzieleniu wyników na trzy grupy: skóra zmieniona, skóra niezmieniona, kontrola. Otrzymane wyniki były dość zaskakujące. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na obniżony poziom ekspresji genów EDC (*FLG, FLG2, CRNN, LOR*) w skórze atopików [99, 43, 34]. Bazując na tych danych spodziewałam się, że ekspresja *LELP1* będzie obniżona w skórze atopowej a poziom białka LELP1 będzie niższy w skórze pacjentów z AZS w porównaniu do poziomu tego białka w skórze osób zdrowych. Również hipoteza na temat patogenezy AZS oparta jest na obniżonym poziomie białek koperty rogowej, który prowadzi do nieprawidłowości w budowie bariery naskórkowej, nadmiernym wnikaniu alergenów w głębsze warstwy skóry i indukcji stanu zapalnego oraz nadmiernej alergizacji chorych [1, 4]. Wydaje się, że wzrost poziomu LELP1 w skórze atopowej w porównaniu do skóry osób zdrowych może być spowodowany specyficznymi oddziaływaniami pomiędzy gęsto usieciowanymi białkami budującymi kopertę rogową korneocytów. W analizie ekspresji 23 tysięcy genów w biopsjach skórnych od osób z AZS wykazano wzrost ekspresji *SPRR1A, S100A8, S100A7* przy równoczesnym obniżeniu ekspresji *FLG* oraz *LOR* [31]. Zespół Jarząba i wsp. również zaobserwował, że wzrost ekspresji genu *SPRR1* w naskórku koreluje z obniżeniem poziomu lorykryny w fragmentach skóry objętych wypryskiem atopowym [51]. Małe białka bogate w prolinę pełnią rolę cząsteczek sieciujących i wiążą się z lorykryną, która stanowi główny budulec koperty rogowej [100]. Także w badaniach przeprowadzonych przez zespół prof. Tadeusza Pawełczyka wykazano wyższy poziom mRNA *RPTN* w skórze atopowej [dane nie opublikowane]. W badaniach Jansena i wsp. spadkom poziomu filagryny i inwolukryny, towarzyszył wzrost poziomu LOR w skórze osób z AZS w porównaniu do kontroli. Przy czym w grupie chorych na AZS ilość tego białka była znacząco wyższa w skórze objętej wypryskiem [101].

Przypuszcza się, że w obrębie wyspecjalizowanej struktury jaką jest koperta rogowa, możliwe jest występowanie mechanizmów kompensujących niski poziom jednego białka, podwyższeniem poziomu drugiego. Najnowsze badania

z wykorzystaniem myszy z usuniętym genem kodującym lorykrynę dowodzą, że białka LCE1 oraz SPRR2, do których należy LELP1 ulegają nadprodukcji i inkorporacji w kopertę rogową w celu wyrównania niedoborów LOR [102]. Autorzy tych badań sugerują, że białka LCE1 pełnią funkcję kompensacyjną ze względu na podobny do lorykryny skład aminokwasowy i obecność analogicznych motywów strukturalnych glicyna/seryna. Białka SPRR2, podobnie jak LELP1 nie posiadają motywu Gly/Ser ale charakteryzują się dużą zawartością reszt aminokwasowych Pro/Lys. Dzięki takiej budowie aminokwasowej białka te nadają kopercie rogowej elastyczność [102].

Nadekspresja genów kodujących białka ważne w procesie różnicowania naskórka występuje także w płaskonabłonkowym raku skóry oraz w płaskonabłonkowym raku krtani [103, 104]. Najbardziej znaczący wzrost ekspresji odnotowano dla *SPRR* (1A, 1B, 2B, 2C, 3), *LCE3D* oraz genów *S100* [103]. W raku krtani również zaobserwowano nadekspresję genu *LCE3D,* kodującego białko z rodziny do której należy LELP1 [104]. Wartym, podkreślenia jest fakt, że atopia może wpływać na ryzyko wczesnego rozwoju płaskonabłonkowych nowotworów [105]. Możliwe, że podwyższone ryzyko zachorowania na nowotwór związane jest także ze wzrostem ekspresji *LELP1* u osób z atopowym zapaleniem skóry. Zagadnienie to wymaga dalszych, szczegółowych badań.

W swojej pracy porównałam także poziom białka LELP1 w skórze chorych na AZS pobranej z obszarów objętych zmianami chorobowymi i obszarów wolnych od tych zmian. Poziom LELP1 w skórze objętej wypryskiem był istotnie niższy niż w skórze niezmienionej chorobowo. Dane literaturowe potwierdzają, że poziom białek zaangażowanych w prawidłowe funkcjonowanie bariery naskórkowej jest obniżony w skórze zmienionej u osób z AZS [106-108]. Takie same zależności obserwowaliśmy w badaniach własnych zespołu, gdzie wykazaliśmy obniżony poziom białek FLG, FLG2 oraz SPRR3 w skórze zmienionej w porównaniu do skóry niezmienionej [109]. Należy zwrócić uwagę, że skóra pozornie niezmieniona u chorych na AZS charakteryzuje się zaburzeniami procesu różnicowania keratynocytów oraz odmienną odpowiedzią immunologiczną w stosunku do skóry osób zdrowych [110, 111]. Widoczna jest także zmieniona dystrybucja białek w naskórku [101]. Dlatego też, zauważa się

różny wzór ekspresji i niejednakowy poziom białek porównując skórę osób zdrowych do chorych jak i dwa fragmenty tkanki pobrane od pacjenta z AZS.

W swojej pracy doktorskiej zaobserwowałam również zależności między poziomem białka LELP1 w skórze niezmienionej chorobowo a poziomem całkowitego IgE w surowicy, wynikami SCORAD oraz z poziomem świądu. Zależności te były jednak nieistotne statystycznie przypuszczalnie ze względu na zbyt małą liczbę analizowanych fragmentów skóry. Jednakże odwrotna zależność między LELP1 a poziomem IgE w surowicy sugeruje, że defekt bariery skórnej może promować odpowiedź Th-2 komórkową, wydzielanie cytokin i rozwój stanu zapalnego. W badaniach oceniających profil 33 cytokin w płynie śródmiąższowym u osób z przewlekłym AZS wykazano wzrost poziomu IL-13 u nosicieli mutacji w *FLG* [112]. Trend ten nie był obserwowany w skórze nie objętej wypryskiem, co może wskazywać na to, że zmiany w sekwencji filagryny nie indukują bezpośrednio nadprodukcji interleukin, ale mogą wzmacniać obecny już stan zapalny w skórze. Fakt, że cytokiny takie jak IL-13 oraz IL-31 obniżają ekspresję filagryny, potwierdza wzajemny wpływ układu immunologicznego i bariery skórnej w rozwoju AZS [113, 114]. Potwierdzają to również badania *in vitro*. W hodowlach komórkowych po 12 godzinnej stymulacji interleukiną 17A zaobserwowano obniżenie poziomu mRNA profilagryny oraz obniżenie poziomu białka filagryny w keratynocytach [115]. Co ciekawe, w tym doświadczeniu nie wykazano zmian w ekspresji filagryny 2 i białek z rodziny S100, co może wskazywać na odmienny mechanizm regulacji ekspresji tych genów. Interleukiny wpływają na wiele procesów komórkowych, które mogą mieć znaczenie w różnicowaniu komórek naskórka oraz w formowaniu koperty rogowej. Niektórzy naukowcy uważają, że do zaburzeń funkcji bariery skórnej w AZS i rozwoju wtórnego zapalenia dochodzi na skutek niedostatecznej produkcji filagryny i wzmocnionej odpowiedzi Th2 komórkowej [116, 117]. Niewykluczone, że analogiczne mechanizmy regulują poziom LELP1 w skórze osób z AZS.

W swojej pracy nie stwierdziłam istotnych statystycznie zależności między badanymi polimorfizmami w regionie genu *LELP1* a względnym poziomem ekspresji genu i poziomem białka LELP1 w badanych fragmentach skóry. Wydaje

się, że zmiany w sekwencji genu *LELP1* oraz poziom mRNA wraz z poziomem białka powinny być rozpatrywane jako niezależne determinanty molekularne związane z AZS. Jednak najbardziej prawdopodobną przyczyną braku zależności między obecnością badanych polimorfizmów (a zwłaszcza rs7534334 i rs144538546) a poziomem ekspresji LELP1mogła być mała liczba analizowanych próbek i niskie zróżnicowania genotypów *LELP1* u pacjentów, od których pobrano biopsje skórne.

W ostatnich latach zwraca się również uwagę na wzajemny wpływ białek koperty rogowej i tak zwanych połączeń ścisłych między komórkami w warstwie ziarnistej naskórka (ang. *tight junction,* TJS) w prawidłowym funkcjonowaniu bariery skórnej [118-120]. Funkcje tych połączeń spełniają wyspecjalizowane białka takie jak cytoplazmatyczne białka wiążące aktynę oraz trans membranowe białka adhezyjne a wśród nich klaudyny (Cldn) [121]. Zespół Sugawara i wsp. wykazał, że myszy z delecją genu *Cldn1* (*Cldn1*$^{-/-}$) charakteryzowały się nieprawidłową budową warstwy rogowej naskórka [122]. W badaniach przeprowadzonych na ludzkich keratynocytach z delecją *Cldn1* zaobserwowano wyraźne obniżenie poziomu transglutaminazy 1 i inwolukryny, białek biorących udział w tworzeniu się koperty rogowej oraz wzrost ekspresji mRNA lorykryny [123]. Nakai i wsp. wykazali obniżoną ekspresję receptora naskórkowego czynnika wzrostu, E-kadheryny oraz okludyny w odpowiedzi na obniżenie poziomu białka lorykryny i filagryny w skórze myszy *Flg*^{ft}, stosowanych jako model atopowego zapalenia skóry [124]. Natomiast badania japońskich naukowców przeprowadzone na myszach z delecją genu *FLG* wykazały, że niedobór filagryny w warstwie rogowej nie wpływa bezpośrednio na morfologię i funkcję TJS [125]. Badacze sugerują, że chroniczny proces zapalny w skórze, wywołany pośrednio przez brak filagryny w naskórku i przerwanie bariery skórnej może prowadzić do nieprawidłowych podziałów keratynocytów oraz zaburzenia funkcji TJS. Również doświadczenia przeprowadzone z udziałem pacjentów chorych na AZS wskazują na wzajemne oddziaływanie bariery TJS i koperty rogowej. De Benedetto i wsp. w biopsjach skórnych zaobserwowali znacząco niższy poziom ekspresji mRNA genów kodujących białka klaudynę 1 oraz klaudynę 23 jedynie w grupie pacjentów

z AZS. Co ciekawe ekspresja klaudyny 1 była zmniejszona w skórze nie objętej wypryskiem [126]. Jest wysoce prawdopodobnym, że LELP1, tak jak FLG oddziałuje z białkami TJS a zmiany w jego budowie mogą skutkować zaburzeniami w funkcjonowaniu bariery skórnej i układu immunologicznego.

W jaki sposób zmiany ilości białka zaangażowanego w różnicowanie keratynocytów w naskórku może przyczynić się do ujawnienia fenotypu AZS? Jakie mechanizmy molekularne związane są z rozwojem dermatozy jaką jest AZS? Pytania te wciąż pozostają otwarte. Poznanie i zrozumienie złożonych mechanizmów patogenezy atopowego zapalenia skóry jest niewątpliwie wyzwaniem oraz stanowi olbrzymi obszar badań. Bariera skórna jest niezwykle skomplikowanym systemem, zbudowanym z licznych, powiązanych ze sobą elementów. Wpływ czynników genetycznych, immunologicznych oraz środowiskowych może doprowadzić do deregulacji funkcji bariery a w konsekwencji do wystąpienia cech klinicznych chorób atopowych, w tym AZS. Aktualnym zadaniem jest zatem poszukiwanie nowych genów, związanych z ryzykiem wystąpienia choroby w celu określenia roli poszczególnych elementów molekularnych w etiopatogenezie AZS. Znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy istnieje związek między częstotliwością występowania danego wariantu genu a ryzykiem zachorowania na AZS pomoże w lepszym zrozumieniu patogenezy tej choroby. W przyszłości może posłużyć do opracowania swoistych biomarkerów podatności zachorowania na choroby atopowe, w tym AZS oraz do opracowania bardziej precyzyjnej klasyfikacji stopnia ciężkości choroby, co zwiększy efektywność leczenia. Można przypuszczać, że istnieją specyficzne, populacyjne markery genetyczne chorób alergicznych i dlatego warto jest je poszukiwać.

7. Obserwacje

1. Wystąpienie wariantu polimorficznego rs4845529[C], rs144538546[A] i rs7534334[C] w regionie genu *LELP1* ma związek z rozwojem atopowego zapalenia skóry (AZS) oraz z ryzykiem wystąpienia choroby.

2. Polimorfizm rs4845529[C] w regionie genu *LELP1* jest związany z podwyższonym stężeniem całkowitego IgE w surowicy.

3. Polimorfizm rs144538546[A] w regionie genu *LELP1* jest związany z poziomem świądu odczuwanym przez pacjentów z AZS.

4. Wariant polimorficzny rs7534334[C] w regionie genu *LELP1* jest związany z niektórymi cechami klinicznymi AZS do których należą: ciężkość przebiegu choroby, podwyższone stężenie całkowitego IgE w surowicy, eozynofilia oraz poziom świądu.

8. Wnioski

1. Jednym z czynników związanych z współwystępowaniem astmy i AZS jest obecność wariantu polimorficznego rs7534334[C] w regionie genu *LELP1*.

2. Zmiany zachodzące w skórze osób chorych na AZS związane są ze wzrostem ekspresji genu *LELP1* oraz poziomu białka LELP1.

3. Niektóre polimorfizmy w obrębie genu *LELP1*, po potwierdzeniu otrzymanych w niniejszej pracy doktorskiej wyników na większej grupie chorych, mogą być wykorzystane jako molekularne markery diagnostyczne w AZS.

4. Ze względu na różnice etniczne w częstości występowania zmian genetycznych związanych z atopowym zapaleniem skóry poszukiwanie markerów molekularnych AZS należy prowadzić odrębnie dla różnych populacji.

9. Spis tabel

1. Charakterystyka grupy badanej.
2. Specyficzność i selektywność zaprojektowanych układów doświadczalnych.
3. Startery używane w reakcjach PCR.
4. Sondy molekularne stosowane w reakcjach PCR.
5. Częstotliwość występowania genotypów i alleli genu *LELP1* u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i w grupie kontrolnej, z analizą regresji logistycznej dla badanych polimorfizmów.
6. Porównanie częstości genotypów (rs7534334, rs144538546, rs4845529) obserwowanych z wartościami oczekiwanymi na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga.
7. Analiza nierównowagi sprzężeń przeprowadzona dla badanych polimorfizmów w regionie genu *LELP1* (rs7534334, rs144538546, rs4845529).
8. Wartości współczynnika korelacji Spearmana (r_s) pomiędzy poziomem ekspresji genu *LELP1* w skórze pacjentów z AZS a cechami klinicznymi.
9. Ilość białka LELP1 zmierzona w biopsjach skóry osób zdrowych (K1-K14), skóry zmienionej chorobowo u pacjentów z AZS (Z1-Z6), oraz skóry niezmienionej chorobowo pacjentów z AZS (NZ1-NZ6).
10. Wartości współczynnika korelacji Spearmana (r_s) pomiędzy poziomem białka LELP1 w skórze pacjentów z AZS a cechami klinicznymi.
11. Zestawienie genotypów (rs7534334, rs4845529, rs144538546 *LELP1*), wartości poziomu mRNA *LELP1* i ilości białka LELP1 u osób z grupy badanej, od których pobrano fragmenty skóry.
12. Zestawienie genotypów (rs7534334, rs4845529, rs144538546 *LELP1*) z wartością względnego poziomu mRNA *LELP1* u osób z grupy badanej, od których pobrano fragmenty skóry.

10. Spis rycin

1. Budowa naskórka.
2. Sieć prawdopodobnych interakcji białko-białko w obrębie kompleksu EDC.
3. Struktura genu *LELP1*.
4. Sekwencja nukleotydowa genu *LELP1*.
5. Sieć prawdopodobnych oddziaływań LELP1 z innymi białkami budującymi kopertę rogową.
6. Sekwencja aminokwasowa białka LELP1.
7. Przewidywana struktura trzeciorzędowa LELP1.
8. Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych (TFIIB, Pax5) oraz acetylotransferazy histonów (p300) w regionie polimorfizmu rs7534334.
9. Położenie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w regionie genu *LELP1*.
10. Fragmenty sekwencji genu *LELP1* zawierające miejsca występowania SNP.
11. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu rs7534334[C/T].
12. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu rs149304390[C/T].
13. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu COSM529080[A/C].
14. Przewidywany wzór cięcia restrykcyjnego dla polimorfizmu rs4845529[C/G].
15. Fragmenty sekwencji genu *LELP1* w obrębie których występują badane za pomocą sond typu FRET miejsca polimorficzne.
16. Przewidywana struktura drugorzędowa LELP1.
17. Przewidywana zmiana struktury trzeciorzędowej dzikiego LELP1 (A) na skutek wystąpienia wariantu polimorficznego rs140466902[G] (B) w kodonie startu transkrypcji.

18. Przewidywana zmiana struktury trzeciorzędowej dzikiego LELP1 (A) na skutek wystąpienia wariantu polimorficznego rs142724966[A] (B) w 61 kodonie.
19. Przewidywana zmiana struktury trzeciorzędowej dziekiego LELP1 (A) na skutek wystąpienia wariantu polimorficznego COSM529080[A] (B) w 63 kodonie.
20. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs140466902.
21. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs142724966.
22. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs144538546.
23. Przykładowy wykres krzywej topnienia oraz wykres piku topnienia z analizy Tm polimorfizmu rs144538546.
24. Związek między genotypem *LELP1* (rs144538546) a poziomem świądu u pacjentów z AZS.
25. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR rs7534334.
26. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA (ścieżki 1,3-5) enzymem MwoI.
27. Związek między genotypem *LELP1* (rs7534334) a występowaniem podwyższonego poziomu IgE w surowicy (powyżej 100 IU/ml) u pacjentów z AZS .
28. Związek między genotypem *LELP1* (rs7534334) a poziomem całkowitego IgE w surowicy (IU/ml) u pacjentów z AZS.
29. Związek między genotypem *LELP1* (rs7534334) a współwystępowaniem astmy u pacjentów z AZS.
30. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR rs149304390.
31. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA enzymem BfuCI.

32. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR rs4845529.
33. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA enzymem HinfI.
34. Związek między allelami genu *LELP1* (rs4845529) a poziomem całkowitego IgE w surowicy (IU/ml) u pacjentów z AZS.
35. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR COSM529080.
36. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genomowego DNA enzymem BfaI.
37. Przykładowy wykres fluorescencji.
38. Względny poziom ekspresji genu *LELP1*.
39. Względny poziom białka LELP1 w skórze osób z AZS i w grupie kontrolnej.
40. Wykres rozrzutu względnego poziomu mRNA *LELP1/TBP* i poziomu białka LELP1 w biopsjach skórnych.

11. Bibliografia

1. Bieber T. *Atopic dermatitis*. N Engl J Med. 2008 Apr 3;358(14):1483-94.
2. Leung DY, Bieber T. *Atopic dermatitis*. Lancet. 2003 Jan 11;361(9352):151-60.
3. Williams H, Flohr C. *How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol. 2006 Jul;118(1):209-13.
4. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. *The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma*. Allergy Asthma Immunol Res. 2011 Apr;3(2):67-73.
5. Deckers IA, McLean S, Linssen S, Mommers M, van Schayck CP, Sheikh A. *Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies*. PLoS One. 2012 7(7): e39803.
6. Sybilski AJ, Raciborski F, Lipiec A, Tomaszewska A, Lusawa A, Samel-Kowalik P, Walkiewicz A, Krzych E, Komorowski J, Samoliński B. *Atopic dermatitis is a serious health problem in Poland. Epidemiology studies based on the ECAP study*. Postepy Dermatol Alergol. 2015 Feb; 32(1): 1–10.
7. Williams HC. *Clinical practice. Atopic dermatitis*. N Engl J Med. 2005 Jun 2;352(22):2314-24.
8. Kanitakis J. *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. Eur J Dermatol. 2002 Jul-Aug;12(4):390-9; quiz 400-1.
9. Tortora GJ. and Grabowski SR. *Principles of Anatomy and Physiology*. HarperCollins College Publishers., 1993 ISBN 978-0673993540
10. Adamski Z, Kaszuba A. *Dermatologia dla kosmetologów*. Elsevier Urban Partner, Wrocław 2010 ISBN 978-83-7609-147-1
11. Bochenek A., Reicher M., *Anatomia człowieka*. Tom V, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1998 ISBN 978-83-200-4323-5
12. Pikuła M, Trzonkowski P. *Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie*. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2009 Oct 15;63:449-56.
13. Freinkel R, Woodley D. *The biology of the skin*. The Parthenon Publishing Group,2001 ISBN 1-85070-006-0
14. Joshi R, *Learning from eponyms: George F. Odland and Odland bodies*. Indian Dermatol Online J. 2014 Jul;5(3):334-8.
15. Roop D.R. *Defects in the barrier.* Science. 1995 Jan 27;267(5197):474-5.
16. Hachem JP, Man MQ, Crumrine D, Uchida Y, Brown BE, Rogiers V, Roseeuw D, Feingold KR, Elias PM. *Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity*. J Invest Dermatol. 2005 Sep;125(3):510-20.

17. Rice R H, Green H. *The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked proteins*. Cell. 1977 11:417–22.
18. Kypriotou M, Huber M, Hohl D. *The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family.* Exp Dermatol. 2012 Sep;21(9):643-9.
19. Pendaries V, Le Lamer M, Cau L, Hansmann B, Malaisse J, Kezic S, Serre G, Simon M. *In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification.* Cell Death Dis. 2015 Feb; 6(2): e1656.
20. Bragulla HH, Homberger DG., *Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia,* J Anat. 2009 Apr;214(4):516-59.
21. Kalinin A, Marekov L, Steinert P. *Assembly of the epidermal cornified cell envelope.* J Cell Sci. 2001 Sep;114(Pt 17):3069-70.
22. Proksch E, Fölster-Holst R, Jensen J.M. *Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema.* J Dermatol Sci. 2006 Sep;43(3):159-69.
23. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Høgh JK, Hellgren LI, Jemec GB, Agner T, Weidinger S. *Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema*. Allergy. 2010 Jul;65(7):911-8.
24. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH. *Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis*. Nat Genet. 2006 Apr;38(4):441-6.
25. Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, Weidinger S. *Meta-analysis proffilaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease*. J Allergy Clin Immunol. 2009 Jun;123(6):1361-70.e7.
26. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N. *Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations.* J Allergy Clin Immunol. 2006 Jul;118(1):214-9.
27. Morar N, Cookson W, Harper, Moffatt MF. *Filaggrin mutations in children with severe atopic dermatitis.* J Invest Dermatol 2007 127: 1667–1672.
28. Brandt EB, Sivaprasad U. *Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis*. J Clin Cell Immunol. 2011 Aug 10; 2(3): 110.

29. Thyssen JP, Kezic S. *Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol. 2014 Oct;134(4):792-9.
30. Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Chiricozzi A, Nograles KE, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Lin P, Bergman R, Bowcock AM, Krueger JG. *Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis*. J Allergy Clin Immunol. 2009 Dec;124(6):1235-1244.e58.
31. Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, Kikuchi K, Kimura T. *Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope*. Br J Dermatol. 2005 Jan;152(1):146-9.
32. Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM. *Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins.* J Biol Chem. 1991 Apr 5;266(10):6626-36.
33. Gedicke MM, Traupe H, Fischer B, Tinschert S, Hennies HC. *Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-offunction mutation in loricrin: analysis of a family and review of the literature*. Br J Dermatol. 2006 Jan;154(1):167-71.
34. Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD. *Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6*. Clin Immunol. 2008 Mar;126(3):332-7.
35. Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC, Roop DR. *Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein.* J Cell Biol. 2000 Oct 16;151(2):389-400.
36. Henry J, Hsu CY, Haftek M, Nachat R, de Koning HD, Gardinal-Galera I, Hitomi K, Balica S, Jean-Decoster C, Schmitt AM, Paul C, Serre G, Simon M. *Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes.* FASEB J. 2011 May;25(5):1567-76.
37. Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh NH. *Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. Journal of biological chemistry*. J Biol Chem. 2001 Dec 14;276(50):47445-52.
38. Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, Rohde K, Marenholz I, Schulz F, Kerscher T, Hubner N, Wahn U, Schreiber S, Franke A, Vogler R, Heath S, Baurecht H, Novak N, Rodriguez E, Illig T, Lee-Kirsch MA, Ciechanowicz A, Kurek M, Piskackova T, Macek M, Lee YA, Ruether A. *A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis.* Nat Genet. 2009 May;41(5):596-601.

39. Greisenegger EK, Zimprich F, Zimprich A, Gleiss A, Kopp T. *Association of the chromosome 11q13.5 variant with atopic dermatitis in Austrian patients*. Eur J Dermatol. 2013 Apr 1;23(2):142-5.
40. Wu Z, Meyer-Hoffert U, Reithmayer K, Paus R, Hansmann B, He Y, Bartels J, Gläser R, Harder J, Schröder JM. *Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin.* J Invest Dermatol. 2009 Jun;129(6):1446-58.
41. Contzler R, Favre B, Huber M, Hohl D. *Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation*. J Invest Dermatol. 2005 May;124(5):990-7.
42. Chen K, Li Y, Dai Y, Li J, Qin Y, Zhu Y, Zeng T, Ban X, Fu L, Guan XY. *Characterization of Tumor Suppressive Function of cornulin in Esophageal Squamous Cell Carcinoma* PLoS One. 2013; 8(7): e68838.
43. Liedén A, Ekelund E, Kuo IC, Kockum I, Huang CH, Mallbris L, Lee SP, Seng LK, Chin GY, Wahlgren CF, Palmer CN, Björkstén B, Ståhle M, Nordenskjöld M, Bradley M, Chua KY, D'Amato M. *Cornulin, a marker of late epidermal differentiation, is down-regulated in eczema*. Allergy. 2009 Feb;64(2):304-11
44. Huber M, Siegenthaler G, Mirancea N, Marenholz I, Nizetic D, Breitkreutz D, Mischke D, Hohl D. *Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex*. J Invest Dermatol. 2005 May;124(5):998-1007.
45. Rasika M., Boorgula M., Chavan S. i wsp., *Filaggrin associated risk for atopic dermatitis is offset by protective missense variants in rptn and LCE1B genes in the epidermal differentiation complex*. J Allergy Clin Immunol. 2016 137(2), Supplement, AB182
46. Cabral A., Voskamp P., Cleton-Jansen A., South A., Nizetic D, Backendorf C. *Structural organization and regulation of the small prolinerich family of cornified envelope precursors suggest a role in adaptive barrier function*. J Biol Chem. 2001 Jun 1;276(22):19231-7.
47. Kartasova T, van de Putte P. *Isolation, characterization, and UV-stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes.* Mol Cell Biol. 1988 May;8(5):2195-203.
48. Marshall D, Hardman MJ, Byrne C. *SPRR1 gene induction and barrier formation occur as coordinated moving fronts in terminally differentiating epithelia*. J Invest Dermatol. 2000 May;114(5):967-75.
49. De Heller-Milev M, Huber M, Panizzon R, Hohl D. *Expression of small proline rich proteins in neoplastic and inflammatory skin diseases*. Br J Dermatol. 2000 Oct;143(4):733-40.
50. Nomura I., Gao B., Boguniewicz M., Darst M.A., Travers J.B, Leung D.Y. *Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic*

dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. J Allergy Clin Immunol. 2003 Dec;112(6):1195-202.

51. Jarzab J., Filipowska B., Zebracka J., Kowalska M., Bozek A., Rachowska R., Gubala E., Grzanka A., Hadas E, Jarzab B. *Locus 1q21 Gene expression changes in atopic dermatitis skin lesions: deregulation of small proline-rich region 1A*. Int Arch Allergy Immunol. 2010 151(1):28-37.
52. Marenholz I., Rivera, V.A. Esparza-Gordillo J., Bauerfeind A., Lee-Kirsch M.A., Ciechanowicz A., Kurek M., Piskackova T., Macek M, Lee Y.A. *Association screening in the Epidermal Differentiation Complex (EDC) identifies an SPRR3 repeat number variant as a risk factor for eczema*. J Invest Dermatol. 2011 Aug;131(8):1644-9.
53. Niehues H, van Vlijmen-Willems IM, Bergboer JG, Kersten FF, Narita M, Hendriks WJ, van den Bogaard EH, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. *Late cornified envelope (LCE) proteins: distinct expression patterns of LCE2 and LCE3 members suggest nonredundant roles in human epidermis and other epithelia.* Br J Dermatol. 2016 Apr;174(4):795-802.
54. Bergboer JG, Tjabringa GS, Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, Jansen PA, Thuret JY, Narita M, Ishida-Yamamoto A, Zeeuwen PL, Schalkwijk J. *Psoriasis Risk Genes of the Late Cornified Envelope-3 Group Are Distinctly Expressed Compared with Genes of Other LCE Groups.* Am J Pathol. 2011 Apr;178(4):1470-7.
55. Riveira-Munoz E, He SM, Escaramís G, Stuart PE, Hüffmeier U, Lee C, Kirby B, Oka A, Giardina E, Liao W, Bergboer J, Kainu K, de Cid R, Munkhbat B, Zeeuwen PL, Armour JA, Poon A, Mabuchi T, Ozawa A, Zawirska A, Burden AD, Barker JN, Capon F, Traupe H, Sun LD, Cui Y, Yin XY, Chen G, Lim HW, Nair RP, Voorhees JJ, Tejasvi T, Pujol R, Munkhtuvshin N, Fischer J, Kere J, Schalkwijk J, Bowcock A, Kwok PY, Novelli G, Inoko H, Ryan AW, Trembath RC, Reis A, Zhang XJ, Elder JT, Estivill X. *Meta-analysis confirms the LCE3C_LCE3B deletion as a risk factor for psoriasis in several ethnic groups and finds interaction with HLA-Cw6*. J Invest Dermatol. 2011 May; 131(5): 1105–1109.
56. Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, Weidinger S. *Meta-analysis proffilaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease*. J Allergy Clin Immunol. 2009 Jun;123(6):1361-70.e7.
57. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB. *Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations*. J Allergy Clin Immunol. 1997 May;99(5):699-706.
58. Herberth G, Heinrich J, Röder S, Figl A, Weiss M, Diez U, Borte M, Herbarth O, Lehmann I; LISA study group. *Reduced IFN-gamma- and enhanced IL-4-producing CD4+ cord blood T cells are associated with a higher risk for*

atopic dermatitis during the first 2 yr of life. Pediatr Allergy Immunol. 2010 Feb; 21(1 Pt 1):5-13.
59. Tazawa T, Sugiura H, Sugiura Y, Uehara M. *Relative importance of IL-4 and IL-13 in lesional skin of atopic dermatitis*. Arch Dermatol Res. 2004 Apr; 295(11):459-64.
60. Busse WW, Lemanske RF Jr. *Asthma*. N Engl J Med. 2001 Feb 1;344(5):350-62.
61. Rhodes HL, Thomas P, Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. *A birth cohort study of subjects at risk of atopy: twenty-two-year follow-up of wheeze and atopic status.* Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jan 15;165(2):176-80.
62. Sybilski AJ, Zalewska M, Furmańczyk K, Lipiec A, Krzych-Fałta E, Samoliński B. *The prevalence of sensitization to inhalant allergens in children with atopic dermatitis.* Allergy Asthma Proc. 2015 Sep-Oct;36(5):e81-5.
63. Gustafsson D, Sjöberg O, Foucard T. *Development of allergies and asthma in infants and young children with atopic dermatitis--a prospective follow-up to 7 years of age.* Allergy. 2000 Mar;55(3):240-5.
64. Bantz SK, Zhu Z, Zheng T. *The Atopic March*: *Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma*. J Clin Cell Immunol. 2014 Apr;5(2). pii: 202.
65. Schneider L, Hanifin J, Boguniewicz M, Eichenfield LF, Spergel JM, Dakovic R, Paller AS. *Study of the Atopic March: Development of Atopic Comorbidities*. Pediatr Dermatol. 2016 Jul;33(4):388-98.
66. Sharma M, Mehla K, Batra J, Ghosh B, *Association of a chromosome 1q21 locus in close proximity to a late cornified envelope-like proline-rich 1 (LELP1) gene with total serum IgE levels.* J Hum Genet. 2007 52(4):378-83.
67. Morar N, Cookson W, Harper, Moffatt MF. *Filaggrin mutations in children with severe atopic dermatitis*. J Invest Dermatol. 2007 Jul;127(7):1667-72.
68. McLean WH, Palmer CN, Henderson J, Kabesch M, Weidinger S, Irvine AD. *Filaggrin variants confer susceptibility to asthma.* J Allergy Clin Immunol. 2008 May;121(5):1294-5;
69. Rogers AJ, Celedón JC, Lasky-Su JA, Weiss ST, Raby BA. *Filaggrin mutations confer susceptibility to atopic dermatitis but not to asthma.* J Allergy Clin Immunol. 2007 Dec;120(6):1332-7.
70. Ponińska J, Samoliński B, Tomaszewska A, Raciborski F, Samel-Kowalik P, Walkiewicz A, Lipiec A, Piekarska B, Komorowski J, Krzych-Fałta E, Namysłowski A, Borowicz J, Kostrzewa G, Majewski S, Płoski R. *Filaggrin gene defects are independent risk factors for atopic asthma in a Polish population: a study in ECAP cohort*. PLoS One. 2011 Feb 18;6(2):e16933.
71. Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, Ruether A, Klopp N, Vogelberg C, Weiland SK, McLean WH, von Mutius E, Irvine AD, Kabesch M. *Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children.* J Allergy Clin Immunol. 2008 May;121(5):1203-1209.e1.

72. Stenert P, Candi E, Katasova T, Marekov L. *Small proline-rich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous ephiteli*. J Struct Biol. 1998 122(1-2):76-85.
73. Vos JB, Datson NA, van Kampen AH, Luyf AC, Verhoosel RM, Zeeuwen PL, Olthuis D, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS.. *A molecular signature of ephitelial host defense: comparative gene expression analysis of cultured bronchial epithelial cells and keratinocytes.* BMC Genomics. 2006 Jan 18;7:9.
74. Zimmermann N, Doepker MP, Witte DP, Stringer KF, Fulkerson PC, Pope SM, Brandt EB, Mishra A, King NE, Nikolaidis NM, Wills-Karp M, Finkelman FD, Rothenberg ME.. *Expression and regulation of small proline-rich protein 2 in allergic inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2005 May;32(5):428-35.
75. An G, Huang TH, Tesfaigzi J, Garcia-Heras J, Ledbetter DH, Carlson DM, Wu R.. *An unusual expression of a squamous cell marker, small proline-rich protein gene, in tracheobronchial ephitelium:differential regulation and gene mapping.* Am J Respir Cell Mol Biol. 1992 Jul;7(1):104-11.
76. Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. *Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene*. Nature. 1996 Apr 18;380(6575):630-3.
77. Balczarek K., Chun L., Kumar S. *Evolution and functional diversification of the paired box DNA-binding domains* 1997 Mol Biol Evol. 1997 Aug;14(8):829-42.
78. Xu HE, Rould MA, Xu W, Epstein JA, Maas RL, Pabo CO. *Crystal structure of the human Pax6 paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding.* Genes Dev. 1999 May 15;13(10):1263-75.
79. Perez-Borrajero C., Okon M., Mcintosh L. *Structural and Dynamics Studies of Pax5 Reveal Asymmetry in Stability and DNA Binding by the Paired Domain*. J Mol Biol. 2016 Jun 5;428(11):2372-91.
80. Czerny T, Schaffner G, Busslinger M. *DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site*. Genes Dev. 1993 Oct;7(10):2048-61.
81. He T, Hong SY, Huang L, Xue W, Yu Z, Kwon H, Kirk M, Ding SJ, Su K, Zhang Z. ,*Histone acetyltransferase p300 acetylates Pax5 and strongly enhances Pax5-mediated transcriptional activity*. J Biol Chem. 2011 Apr 22;286(16):14137-45.
82. Garvie CW, Hagman J, Wolberger C. *Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA*. Mol Cell. 2001 Dec;8(6):1267-76.
83. Visser MJ, Landeck L, Campbell LE, McLean WH, Weidinger S, Calkoen F, John SM, Kezic S. *Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations*

in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis Br J Dermatol. 2013 Feb;168(2):326-32.

84. Sabolić Pipinić I, Varnai VM, Turk R, Breljak D, Kezić S, Macan J. *Low frequency of filaggrin null mutations in Croatia and their relation with allergic diseases* Int J Immunogenet. 2013 Jun;40(3):192-8.
85. Gao PS, Rafaels NM, Hand T, Murray T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider L, Hanifin JM, Gallo RL, Gao L, Beaty TH, Beck LA, Barnes KC, Leung DY. *Filaggrin mutations that confer risk of atopic dermatitis confer greater risk for eczema herpeticum*. J Allergy Clin Immunol. 2009 Sep;124(3):507-13,
86. Seldin MF, Shigeta R, Villoslada P, Selmi C, Tuomilehto J, Silva G, Belmont JW, Klareskog L, Gregersen PK. *European population substructure: clustering of northern and southern populations.* PLoS Genet. 2006 Sep 15;2(9):e143.
87. Global Atlas of Allergy, 2015, opublikowane przez *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*
88. Brown SJ, Sandilands A, Zhao Y, Liao H, Relton CL, Meggitt SJ, Trembath RC, Barker JN, Reynolds NJ, Cordell HJ, McLean WH. *Prevalent and low-frequency null mutations in the filaggrin gene are associated with early-onset and persistent atopic eczema.* J Invest Dermatol. 2008 Jun;128(6):1591-4.
89. Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Epplen JT, Hoffjan S., *Two common loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose for early onset of atopic dermatitis.* J Invest Dermatol. 2007 Mar;127(3):722-4.
90. Visser MJ, Landeck L, Campbell LE, McLean WH, Weidinger S, Calkoen F, John SM, Kezic S. *Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis*. Br J Dermatol. 2013 Feb;168(2):326-32.
91. Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM *Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema.* Nat Genet. 2007 May;39(5):650-4.
92. Cortez M, Matos A, Wesserling M, Pawelczyk T, Trzeciak M, Bicho M. *Lelp-1, its role in atopic dermatitis and asthma: Poland and Portugal.* J Allergy Ther 2016 7:1-X
93. Deroo BJ, Archer TK. *Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin.* Mol Biol Cell. 2001 Nov;12(11):3365-74.
94. Sevilla LM, Latorre V, Sanchis A, Pérez P. *Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation.* J Invest Dermatol. 2013 Feb;133(2):361-70.
95. Bayo P, Sanchis A, Bravo A, Cascallana JL, Buder K, Tuckermann J, Schütz G, Pérez P. *Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence*. Endocrinology. 2008 Mar;149(3):1377-88.
96. Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. *Novel genomic effects of glucocorticoids in*

epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. J Biol Chem. 2007 Feb 9;282(6):4021-34.

97. Pinto P, Rosado C, Parreirão C, Rodrigues LM. *Is there any barrier impairment in sensitive skin?: a quantitative analysis of sensitive skin by mathematical modeling of transepidermal water loss desorption curves.* Skin Res Technol. 2011 May;17(2):181-5.
98. Lee CH, Chuang HY, Shih CC, Jong SB, Chang CH, Yu HS. *Transepidermal water loss, serum IgE and beta-endorphin as important and independent biological markers for development of itch intensity in atopic dermatitis.* Br J Dermatol. 2006 Jun;154(6):1100-7.
99. Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin MC, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt AM, Serre G, Paul C, Simon M. *Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin.* J Allergy Clin Immunol. 2013 Apr;131(4):1094-102.
100. Candi E, Schmidt R, Melino G. *The cornified envelope: a model of cell death in the skin.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Apr;6(4):328-40.
101. Jensen JM, Fölster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schütze S, Proksch E. *Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis.* J Invest Dermatol. 2004 Jun;122(6):1423-31.
102. Ishitsuka Y, Huebner AJ, Rice RH, Koch PJ, Speransky VV, Steven AC, Roop DR. *Lce1 Family Members Are Nrf2-Target Genes that Are Induced to Compensate for the Loss of Loricrin*. J Invest Dermatol. 2016 Aug;136(8):1656-63.
103. Hudson LG, Gale JM, Padilla RS, Pickett G, Alexander BE, Wang J, Kusewitt DF. *Microarray analysis of cutaneous squamous cell carcinomas reveals enhanced expression of epidermal differentiation complex genes.* Mol Carcinog. 2010 Jul;49(7):619-29.
104. Tyszkiewicz T, Jarzab M, Szymczyk C, Kowal M, Krajewska J, Jaworska M, Fraczek M, Krajewska A, Hadas E, Swierniak M, Markowski J, Lange D, Poltorak S, Wiench M, Krecicki T, Jarzab J, Maciejewski A. *Epidermal differentiation complex (locus 1q21) gene expression in head and neck cancer and normal mucosa*. Folia Histochem Cytobiol. 2014 52(2):79-89.
105. Cheng J, Zens MS, Duell E, Perry AE, Chapman MS, Karagas MR. *History of allergy and atopic dermatitis in relation to squamous cell and Basal cell carcinoma of the skin*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2015 Apr;24(4):749-54.
106. Kezic S, O'Regan GM, Yau N, Sandilands A, Chen H, Campbell LE, Kroboth K, Watson R, Rowland M, McLean WH, Irvine AD. *Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity.* Allergy. 2011 Jul;66(7):934-40.

107. Broccardo CJ, Mahaffey S, Schwarz J, Wruck L, David G, Schlievert PM, Reisdorph NA, Leung DY. *Comparative proteomic profiling of patients with atopic dermatitis based on history of eczema herpeticum infection and Staphylococcus aureus colonization.* J Allergy Clin Immunol. 2011 Jan;127(1):186-93.
108. Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Chiricozzi A, Nograles KE, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Lin P, Bergman R, Bowcock AM, Krueger JG. *Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis.* J Allergy Clin Immunol. 2009 Dec;124(6):1235-1244.e58.
109. Trzeciak M, Sakowicz-Burkiewicz M, Wesserling M, Dobaczewska D, Gleń J, Nowicki R, Pawelczyk T. *Expression of Cornified Envelope Proteins in Skin and Its Relationship with Atopic Dermatitis Phenotype*. Acta Derm Venereol. 2016 Jun 15. doi: 10.2340/00015555-2482.
110. Suárez-Fariñas M, Tintle SJ, Shemer A, Chiricozzi A, Nograles K, Cardinale I, Duan S, Bowcock AM, Krueger JG, Guttman-Yassky E. *Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities.* J Allergy Clin Immunol. 2011 Apr;127(4):954-64.e1-4.
111. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY. *Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis*. J Clin Invest. 1994 Aug;94(2):870-6.
112. Szegedi K, Lutter R, Res PC, Bos JD, Luiten RM, Kezic S, Middelkamp-Hup MA. *Cytokine profiles in interstitial fluid from chronic atopic dermatitis skin*. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Nov;29(11):2136-44.
113. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DY. *Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression.* J Allergy Clin Immunol. 2009 Sep;124(3 Suppl 2):R7-R12.
114. Cornelissen C, Marquardt Y, Czaja K, Wenzel J, Frank J, Lüscher-Firzlaff J, Lüscher B, Baron JM. *IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models*. J Allergy Clin Immunol. 2012 Feb;129(2):426-33, 433.e1-8.
115. Gutowska-Owsiak D[1], Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, Ogg GS. *IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion*. Exp Dermatol. 2012 Feb;21(2):104-10.
116. Leung DY. *Our evolving understanding of the functional role of filaggrin in atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol. 2009 Sep;124(3):494-5.
117. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, Irvine AD. *Filaggrin in atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol. 2008 Oct;122(4):689-93.

118. Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM. *Tight junctions form a barrier in human epidermis.* Eur J Cell Biol. 2010 Nov;89(11):839-42.
119. Brandner JM, Schulzke JD. *Hereditary barrier-related diseases involving the tight junction: lessons from skin and intestine*. Cell Tissue Res. 2015 Jun;360(3):723-48.
120. Brandner JM, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, Moll I, Beck LA, De Benedetto A. *Epidermal tight junctions in health and disease.* Tissue Barriers. 2015 Apr 3;3(1-2):e974451.
121. Anderson JM, Van Itallie CM. *Physiology and function of the tight junction.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009 Aug;1(2):a002584.
122. Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, Kojima T, Hisatsune J, Sugai M, Furuse M. *Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice.* J Dermatol Sci. 2013 Apr;70(1):12-8.
123. Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner JM. *Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes.* J Invest Dermatol. 2013 May;133(5):1161-9.
124. Nakai K, Yoneda K, Hosokawa Y, Moriue T, Presland RB, Fallon PG, Kabashima K, Kosaka H, Kubota Y. *Reduced expression of epidermal growth factor receptor, E-cadherin, and occludin in the skin of flaky tail mice is due to filaggrin and loricrin deficiencies.* Am J Pathol. 2012 Sep;181(3):969-77.
125. Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K, Furuse M, Amagai M[7]. *Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum*. J Dermatol Sci. 2015 Jan;77(1):28-36.
126. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. *Tight junction defects in patients with atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol. 2011 Mar;127(3):773-86.e1-7.