

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk



Wanda Niepiekło-Miniewska

***Badanie związku genów KIR i HLA oraz maszynarii  
prezentującej antygen z podatnością i przebiegiem  
atopowego zapalenia skóry***

***(Association of KIR, HLA and antigen-presenting machinery genes  
with susceptibility to and outcome of atopic dermatitis)***

*praca doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk

Promotor pomocniczy: Dr hab. Monika Jasek

Praca wykonana w Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej

Wrocław 2020

*„Przeważnie część wysiłku uczonego żyje jako bezimienny dorobek.”*

*Ludwik Hirsfeld*

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi **Panu Profesorowi Piotrowi Kuśnierczykowi** za umożliwienie mi realizacji pracy naukowej, za życzliwość i wszystkie cenne rady w czasie realizacji badań*

*Dziękuję **Pani dr hab. Monice Jasek** Promotorowi Pomocniczemu za wszelką pomoc, wsparcie oraz cenne wskazówki i motywację*

*Dziękuję **Panu dr Efstratiosowi Stratikosowi** i **Pani dr Anastasi Mpakali** z Protein Chemistry Group, Biodiagnostic Division, National Centre for Scientific Research „Demokritos” w Atenach za udział w badaniach funkcjonalnych aminopeptydazy ERAP1*

*Dziękuję również **Koleżankom i Kolegom** z Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej, Laboratorium Genetyki i Epigenetyki Chorób Człowieka oraz Laboratorium Immunologii Tkankowej CM IITD za okazaną pomoc i życzliwość*

*Serdecznie dziękuję **Wszystkim** osobom, bez których pomocy, wsparcia i zaangażowania praca ta nie mogłaby powstać, przede wszystkim dziękuję lekarzom z Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, którzy brali udział w doborze pacjentów oraz statystykowi za wykonanie części analiz statystycznych*

*Szczególne podziękowania składam **Moim Najbliższym** za wiarę w moje możliwości i ogromnie wsparcie*

**Część wyników przedstawionych w pracy została opublikowana w artykułach:**

1. **Niepiekło-Miniewska W**, Mpakali A, Stratikos E, Matusiak Ł, Narbutt J, Lesiak A, Kuna P, Wilczyńska K, Nowak I, Wiśniewski A, Zwolińska K, Ponińska J, Płoski R, Szepietowski JC, Kuśnierczyk P. *Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism Ile276Met is associated with atopic dermatitis and affects the generation of an HLA-C associated antigenic epitope in vitro*. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019 May; 33(5):906-911. doi: 10.1111/jdv.15449. (IF=5.113)
2. **Niepiekło-Miniewska W**, Majorczyk E, Matusiak L, Gendzekhadze K, Nowak I, Narbutt J, Lesiak A, Kuna P, Ponińska J, Pietkiewicz-Sworowska A, Samoliński B, Płoski R, Szepietowski JC, Senitzer D, Kuśnierczyk P. *Protective effect of the KIR2DS1 gene in atopic dermatitis*. Gene. 2013 Sep; 25:527(2):594-600. d10.1016/j.gene.2013.06.015. (IF=2.351)

**SPIS TREŚCI**

STRESZCZENIE .....	8
SUMMARY .....	11
WYKAZ SKRÓTÓW .....	14
1. WSTĘP .....	16
1.1. Wprowadzenie .....	16
1.2. Epidemiologia i obraz kliniczny atopowego zapalenia skóry .....	17
1.3. Etiopatogeneza atopowego zapalenia skóry .....	20
1.3.1. Rola czynników środowiskowych .....	20
1.3.2. Czynniki genetyczne .....	21
1.3.3 Mechanizmy immunologiczne .....	26
1.4. Komórki NK .....	31
1.4.1 KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) – struktura i organizacja .....	32
1.4.2. Ligandy KIR .....	37
1.5. Antygeny HLA locus C (HLA-C) .....	39
1.5.1. Budowa cząsteczki HLA locus C .....	39
1.5.2. Organizacja genów <i>MHC</i> .....	40
1.6. Maszyneria prezentacji antygeny-APM ( <i>antigen-presenting machinery</i> ) .....	41
1.6.1. Wybrane cząsteczki maszynerii prezentacji antygeny (AMP) .....	42
1.7. Aminopeptydazy ERAP i peptydomy cząsteczek HLA klasy I związane z chorobami .....	48
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....	51
3. MATERIAŁY I METODY .....	53
3.1. Materiał do badań .....	53
3.2. Ocena kliniczna chorych .....	54
3.3. Odczynniki .....	55
3.4. Metody molekularne .....	56
3.4.1. Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej .....	56
3.4.2. Pomiar stężenia DNA .....	56
3.4.3. Oznaczenie genów <i>KIR</i> .....	56
3.4.3.1. Oznaczenie genów <i>KIR</i> metodą PCR-SSP .....	56
3.4.3.2. Oznaczanie genów <i>KIR</i> metodą multipleks PCR-SSP .....	58
3.4.4. Oznaczenie ligandów receptorów <i>KIR</i> .....	61
3.4.5. Oznaczenie polimorfizmu <i>HLA</i> locus C .....	64

3.4.5.1. Oznaczenie polimorfizmu <i>HLA-C</i> metodą PCR-SSP.....	64
3.4.5.2. Oznaczenie polimorfizmu <i>HLA-C</i> metodą PCR-SSO .....	67
3.4.6. Oznaczenie wybranych polimorfizmów genów maszyny prezentacji antygeny (APM) metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym.....	69
3.4.7. Badanie aktywności enzymatycznej wariantów ERAP1 w miejscu polimorficznym <i>rs26618</i> (Ile276Met) wobec N-końcowo wydłużonego prekursora LIVDRPVTLV liganda HLA-05:01.....	71
3.5. Metody statystyczne .....	72
4. WYNIKI.....	74
4.1. Badanie związku genów <i>KIR</i> z podatnością na atopowe zapalenie skóry.....	74
4.1.2. Częstość występowania genów <i>KIR</i> w grupie chorych i w kontroli .....	74
4.1.3. Niezrównoważenie sprzężeń ( <i>ang. linkage disequilibrium, LD</i> ) między genami <i>KIR</i> .....	74
4.1.4. Symulacja Monte Carlo.....	77
4.1.5. Analiza częstości haplotypów genów <i>KIR</i> .....	78
4.1.6. Analiza zależności pomiędzy występowaniem genów <i>KIR</i> a danymi klinicznymi.....	79
4.2 Ligandy receptorów <i>KIR</i> .....	81
4.2.1. Rozkład częstości epitopów <i>HLA-C</i> (C1 i C2) w kontroli i u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry .....	81
4.2.2. Rozkład częstości epitopów <i>HLA-B Bw4</i> i <i>HLA-A Bw4</i> w kontroli i u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry .....	82
4.2.3. Analiza zależności pomiędzy występowaniem ligandów genów <i>KIR</i> a danymi klinicznymi .....	83
4.3. Częstość występowania alleli <i>HLA-C</i> u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej .....	85
4.3.1. Częstość alleli <i>HLA-C</i> w zależności od obecności genu <i>KIR2DS1</i> w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej .....	86
4.3.2. Analiza zależności pomiędzy częstościami alleli <i>HLA</i> locus <i>C</i> a danymi klinicznymi.....	87
4.4. Badanie związku polimorfizmów wybranych genów maszyny prezentującej antygen z podatnością na atopowe zapalenie skóry.....	89
4.4.1. Badanie związku polimorfizmów w genach <i>LMP2</i> i <i>LMP7</i> z podatnością na atopowe zapalenie skóry.....	89
4.4.1.1. Ocena zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach <i>LMP2</i> i <i>LMP7</i> z rozkładem Hardy'ego - Weinberga .....	90
4.4.1.2. Rozkład częstości genotypów i alleli w genach <i>LMP2</i> i <i>LMP7</i> w grupie pacjentów i w kontroli .....	90
4.4.1.3. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach <i>LMP</i> (2 i 7) a danymi klinicznymi .....	91

4.4.2. Badanie związku polimorfizmów w genach <i>TAP1</i> i <i>TAP2</i> z podatnością na atopowe zapalenie skóry.....	94
4.4.2.1. Ocena zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach <i>TAP1</i> i <i>TAP2</i> z rozkładem Hardy’ego - Weinberga .....	95
4.4.2.2. Rozkład częstości genotypów i alleli w genach <i>TAP1</i> i <i>TAP2</i> w grupie pacjentów i w kontroli .....	96
4.4.2.3. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach <i>TAP</i> (1 i 2) a danymi klinicznymi .....	97
4.4.3. Badanie związku polimorfizmów <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> z podatnością na atopowe zapalenie skóry.....	100
4.4.3.1. Ocena zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> z rozkładem Hardy’ego – Weinberga .....	101
4.4.3.2. Rozkład częstości genotypów i alleli w genach <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> w grupie pacjentów i w kontroli .....	102
4.4.3.3. Rozkład genotypów w miejscu polimorficznym <i>rs26618</i> wśród pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i w grupie osób kontrolnych w zależności od obecności genu <i>KIR2DS1</i> .....	104
4.4.3.4. Badanie aktywności enzymatycznej wariantów <i>ERAP1</i> w miejscu polimorficznym <i>rs26618</i> (Ile276Met) wobec prekursora epitopu HLA-C*05:01 .....	105
4.4.3.5. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genie <i>ERAP2</i> ( <i>rs2248374</i> ) i <i>ERAP1</i> ( <i>rs26618</i> ) .....	106
4.4.3.6. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach <i>ERAP</i> (1 i 2) a danymi klinicznymi .....	108
5. DYSKUSJA.....	112
6. WNIOSKI.....	127
7. BIBLIOGRAFIA.....	128
8. SPIS TABEL.....	148
9. SPIS RYCIN.....	151
10. DOROBEK NAUKOWY.....	153

**STRESZCZENIE**

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest jedną z najczęstszych dermatoz. Na AZS cierpi około jedna piąta całej ludzkości, ale częstość występowania tej choroby jest odmienna w różnych rejonach świata. Patogeneza tej jednostki chorobowej nadal pozostaje niejasna, chociaż wyniki ostatnich badań podkreślają znaczenie predyspozycji genetycznych w rozwoju AZS. Wzrost liczby zachorowań na atopowe zapalenie skóry w krajach rozwiniętych, który zbiegł się ze wzrostem uprzemysłowienia, sugeruje udział czynników środowiskowych w rozwoju AZS. Pomimo dość dokładnie poznanych mechanizmów immunologicznych AZS, rola komórek NK w rozwoju tej choroby jest słabo poznana. Najważniejszymi receptorami hamującymi lub pobudzającymi aktywność tych komórek są cząsteczki KIR, których ligandami są cząsteczki HLA klasy I. Cząsteczki KIR występują też na powierzchni niektórych limfocytów T, regulując ich działanie. Obecność cząsteczek HLA klasy I na powierzchni komórki i skuteczna prezentacja antygenów w postaci peptydów związanych przez HLA klasy I zależy od działania białek wchodzących w skład tzw. maszynerii prezentacji antygeny (APM). Polimorfizm genów APM: *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1* i *ERAP2* wpływa na aktywność kodowanych przez nie cząsteczek i w ten sposób może wpływać na skuteczność prezentacji antygenów.

Celem mojej pracy było zbadanie związku genów *KIR* i ich ligandów HLA oraz polimorficznych wariantów genów wchodzących w skład APM z podatnością na atopowe zapalenie skóry i przebiegiem klinicznym tej choroby.

Geny receptorów KIR są głównym czynnikiem wpływającym na zmienność fenotypu i funkcję komórek NK. Analiza związku aktywujących i hamujących receptorów KIR i ich ligandów z ryzykiem zachorowania na AZS wykazała ochronne działanie tylko dla genu *KIR2DS1*. W przypadku pozostałych genów *KIR* oraz epitopów HLA-C (C1 i C2) i epitopów HLA-B Bw4 i HLA-A Bw4 będących ligandami receptorów KIR nie wykazano związku z AZS. Ponadto zaobserwowano, że ochronny efekt genu *KIR2DS1* w AZS nie zależy od obecności czy też braku epitopu C2, który jest ligandem dla produktu tego genu. Większość znanych ligandów dla receptorów KIR, to cząsteczki HLA-C. Analiza ich polimorfizmów wykazała, że osoby nieposiadające allelu *HLA-C\*05* mają ponad dwukrotnie większe ryzyko zachorowania na AZS niż osoby posiadające ten allel.

Repertuar peptydów wiązanych przez daną cząsteczkę HLA klasy I zależy nie tylko od preferencji wiązania peptydów przez daną cząsteczkę, ale także od aktywności APM.



Przeanalizowano trzynaście polimorfizmów wybranych genów kodujących białka maszyny prezentującej antygen: *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1*, *ERAP2*. Wykazano, że spośród badanych polimorfizmów tylko *rs26618* w genie *ERAP1* był związany z ryzykiem zachorowania na AZS. Osoby będące nosicielami allelu *C* (*C/C* i *C/T*) w porównaniu z homozygotami *T/T* miały wyższe ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry. Dodatkowo wykazano, że w grupie osób nieposiadających genu *KIR2DS1*, heterozygoty *C/T* miały 1,5 razy większe ryzyko zachorowania niż osoby posiadające genotyp homozygotyczny *T/T*. Natomiast u osób z genotypem homozygotycznym *C/C* ryzyko zachorowania było ponad 2-krotnie wyższe. Związek polimorfizmu *rs26618* z ryzykiem zachorowania na AZS i dodatkowo z ujemnym wynikiem dla *KIR2DS1* wykazany w badanej populacji jest trudny do wyjaśnienia, ponieważ funkcjonalne znaczenie tego polimorfizmu nie było dotąd opisane, mimo iż powoduje zamianę izoleucyny na metioninę w pozycji 276 białka *ERAP1*. W celu zbadania wpływu *rs26618* na biologiczną aktywność aminopeptydazy *ERAP1* przetestowano aktywność enzymatyczną dwóch wariantów aminopeptydazy różniących się tylko w pozycji 276 (Ile lub Met) wobec prekursora epitopu HLA-C\*05:01. Oba warianty *ERAP1* były w stanie skutecznie wygenerować epitop IVDRPVTLV z prekursorowego peptydu LIVDRPVTLV. Jednak allotyp z izoleucyną w pozycji 276 był w stanie wygenerować ten epitop około 50% szybciej. Oba warianty były mniej skuteczne w przycinaniu dojrzałego epitopu do mniejszych peptydów. Kinytyka ich była 100-krotnie wolniejsza w porównaniu do generowania epitopu, ale z bardzo podobną wydajnością przycinania dla obu wariantów. Dla wszystkich pozostałych badanych wariantów polimorficznych genów kodujących białka wchodzące w skład AMP nie wykazano związku z podatnością na AZS. Natomiast analiza wpływu polimorfizmu *rs2248374 ERAP2*, dla którego wykazano związek z ekspresją białka *ERAP2* na polimorfizm *rs26618 ERAP1* związany z ryzykiem zachorowania na AZS, wykazała synergistyczny efekt jedynie dla genotypu *ERAP2 rs2248374\*A/A - ERAP1 rs26618\*C/C*. Osoby z tym genotypem miały ponad trzykrotnie większe ryzyko zachorowania na AZS niż osoby z pozostałymi genotypami.

Przeanalizowano również związek badanych genów z wybranymi cechami klinicznymi pacjentów. Zaobserwowano wpływ niektórych wariantów polimorficznych w genach *KIR*, *HLA*, *LMP2*, *TAP1*, *ERAP1* na wiek diagnozy, stopień zaawansowania choroby mierzony współczynnikiem SCORAD oraz związek z chorobami współistniejącymi takimi jak astma czy alergiczny nieżyt nosa.

## STRESZCZENIE

---

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują na związek badanych wariantów genetycznych - z ryzykiem wystąpienia oraz przebiegiem atopowego zapalenia skóry. Badania te mają charakter nowatorski i stanowią pierwsze doniesienie na temat udziału genów *KIR* i *HLA-C* oraz wariantów polimorficznych w regionie genów *ERAP* (1 i 2) z ryzykiem wystąpienia i przebiegiem AZS. Wyniki te należy jednak potwierdzić na większych grupach badanych, zarówno w populacji europejskiej jak i innych populacjach. W zróżnicowanych etnicznie populacjach pochodzących z różnych regionów geograficznych mogą bowiem istnieć dodatkowe czynniki sprzyjające rozwojowi AZS. Omówione wyniki stanowią również pierwszy dowód na biologiczne znaczenie polimorfizmu *rs26618*\*C>T (Ile276Met).

## SUMMARY

Atopic dermatitis (AD) is one of the most common dermatoses. About one fifth of the world's population suffer from AD, but the prevalence of the disease varies in different parts of the world. The pathogenesis of this disease is still unclear, although recent studies emphasize the importance of genetic predisposition in the development of AD. The increase in the incidence rate of atopic dermatitis in developed countries, which coincided with the increase in industrialization, suggests the involvement of environmental factors in the development of atopic dermatitis. Despite the quite well-known immune mechanisms of AD, the role of NK cells in the development of this disease is poorly understood. The most important receptors that inhibit or stimulate the activity of these cells are KIR molecules, the ligands of which are HLA class I molecules. KIR molecules are also present on the surface of a subpopulation of T lymphocytes and regulate their activity. The presence of HLA class I molecules on the cell surface and the effective presentation of antigens in the form of HLA class I peptides depends on the activity of proteins belonging to antigen presenting machinery (APM). The polymorphisms of APM genes: *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1* and *ERAP2* may have impact on the activity of their protein products and in this way they may affect the effectiveness of antigen presentation.

The aim of my thesis was to investigate the association between *KIR* genes and their HLA ligands and polymorphic variants of APM genes: *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1* and *ERAP2* with susceptibility to atopic dermatitis and the clinical course of the disease.

*KIR* genes are the major factor influencing phenotype variability and NK cells function. The analysis of the association between activatory and inhibitory KIR receptors and their ligands with the risk of developing AD showed a protective effect only for the *KIR2DS1* gene. There was no difference in the frequency of HLA-C epitopes (C1 and C2) and HLA-B Bw4 and HLA-A Bw4 epitopes between the examined groups. Moreover, the association of the *KIR2DS1* gene with lower risk of AD was independent of the presence or absence of C2 epitope which is a ligand for the product of this gene. Most of the known ligands for KIR receptors are HLA-C molecules. The analysis of their polymorphisms showed that people who do not have the *HLA-C\*05* allele have more than two times higher risk of developing AD than people who have this allele.

The repertoire of peptides bound by a given HLA class I molecule depends not only on the peptide binding preferences of a given molecule but also on the APM activity.

## SUMMARY

---

Thirteen polymorphisms of selected genes coding for proteins in the antigen presenting machinery were analyzed: *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1*, *ERAP2*. It has been shown that among the studied polymorphisms, only *rs26618* in the *ERAP1* gene was associated with the risk of developing AD. Individuals who were carriers of the *C* allele (*C/C* and *C/T*) compared to *T/T* homozygotes had a higher risk of developing atopic dermatitis. In addition, it has been shown that subjects without the *KIR2DS1* gene and being the *C/T* heterozygotes had 1.5 times higher risk of developing the disease than individuals possessing homozygous *T/T* genotype. Moreover, individuals with the *C/C* homozygous genotype, had over 2 times higher risk of developing the disease. The association of SNP *rs26618* with the risk of developing AD only in *KIR2DS1*-negative subject is difficult to explain, because its biological function has not been described, although it encodes an isoleucine to methionine change in position 276 of the *ERAP1* protein. In an effort to understand the functional relevance of the *ERAP1* aminopeptidase *rs26618* (Ile276Met) polymorphism, we tested the activity of two variants of aminopeptidase (with Ile267 or Met267) against a N-terminally extended precursor LIVDRPVTLV of the HLA-C\*05:01 epitope IVDRPVTLV. Both *ERAP1* variants were able to efficiently generate the epitope, although the isoleucine allotype at position 276 was able to generate this about 50% faster. Both variants were quite inefficient in further trimming of the mature epitope to shorter peptides. Their kinetics were up to 100- fold slower compared to epitope generation, but with very similar performance rates for both variants. No association between other tested polymorphic variants of genes encoding proteins belonging to AMP and susceptibility to AD was demonstrated. On the other hand, the analysis of the influence of the *rs2248374* *ERAP2* polymorphism which affects the expression of the *ERAP2* protein on the *rs26618* *ERAP1* polymorphism associated with the risk of AD, showed a synergistic effect only for the *rs2248374*\*A/A - *ERAP1* *rs26618*\*C/C genotype. Individuals with this genotype had over three times higher risk of developing AD than those with the other genotypes.

The associations between the studied genes and selected clinical data of patients were also analyzed. The influence of some polymorphic variants in the *KIR*, *HLA*, *LMP2*, *TAP1*, *ERAP1* genes on the age of diagnosis, the severity of the disease measured by the SCORAD coefficient and the association with comorbidities such as asthma or allergic rhinitis was observed.

The obtained results showed that genetic variants of genes investigated here may be considered as potential risk factors of atopic dermatitis. The studies are innovative since

## SUMMARY

---

it is the first report on the contribution of the *KIR* and *HLA-C* genes and variants of *ERAP(1 and 2)* genes to the risk of AD. However, these results should be confirmed on larger European and other populations. In fact, in ethnically diverse populations from different geographic regions, the additional factors favoring the development of AD may exist. In addition, my result is the first evidence of biological function of *rs26618\*C>T* (Ile276Met) polymorphism.

## WYKAZ SKRÓTÓW

**APM** (*antigen-presenting machinery*) - maszyna prezentacji antygenów

**AZS** (*atopic dermatitis*) - atopowe zapalenie skóry

**BLS** (*bare lymphocyte syndrome*) - zespół nagich limfocytów

**$\beta$ 2M** ( *$\beta$ 2 microglobulin*) - beta 2-mikroglobulina

**DDC** (*dermal dendritic cells*) - skórne komórki dendrytyczne

**EDC** (*epidermal differentiation complex*) - kompleks różnicowania naskórka

**ERAP1 i ERAP2** (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 and 2*) - aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej 1 i 2

**Fc $\epsilon$ R1** (*high-affinity Immunoglobulin E receptor*) - receptor o wysokim powinowactwie do IgE

**FLG** (*filaggrin*) - filagryna

**GWAS** (*genom-wide association study*) - badania asocjacyjne całego genomu

**HLA** (*human leukocyte antigen*) - antygeny głównego układu zgodności tkankowej

**HSC** (*hematopoietic stem cell*) - krwiotwórcze komórki macierzyste

**IDEC** (*inflammatory dendritic epidermal cells*) - zapalne komórki dendrytyczne naskórka

**IRF** (*interferon regulatory factors*) - interferonowy czynnik regulatorowy

**ITIM** (*immunoreceptor tyrosine-based Inhibitory motif*) - immunoreceptorowy motyw hamujący oparty o tyrozinę

**ITAM** (*immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*) - immunoreceptorowy motyw aktywujący oparty o tyrozinę

**IL-6R $\alpha$**  (*interleukin 6 receptor  $\alpha$* ) - podjednostka  $\alpha$  receptora dla interleukiny 6

**IL-1RII** (*type 2 interleukin 1 receptor receptor*) - receptor typu 2 dla interleukiny 1

**IL-1 $\beta$ R1** (*interleukin-1 receptor type1*) - podjednostka  $\beta$  dla receptora interleukiny 1

**KIR** (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) - immunoglobulinopodobne receptory naturalnych komórek cytotoksycznych

**LILR** (*leukocyte immunoglobulin-like receptors*) - immunoglobulinopodobne receptory leukocytów

## WYKAZ SKRÓTÓW

---

- LMP2 i LMP7** (*low molecular protein 2 and 7*) - białka o małej masie cząsteczkowej (2 i 7)
- LRC** (*leukocyte receptor complex*) - kompleks receptorów leukocytarnych
- MHC** (*major histocompatibility complex*) - główny układ zgodności tkankowej
- TNF-R1** (*type 1 tumor necrosis factor receptor*) - receptor typu 1 dla TNF
- OR** (*odds ratio*) - iloraz szans
- PDC** (*plasmacytoid dendritic cells*) - plazmocytoidalne komórki dendrytyczne
- PCR** (*polymerase chain reaction*) - łańcuchowa reakcja polimerazy
- PCR-SSP** (*sequence-specific primers*) - metoda PCR z wykorzystaniem specyficznych sekwencji starterów
- PCR-SSO** (*sequence specific oligonucleotides*) - metoda PCR z wykorzystaniem specyficznych sond oligonukleotydowych
- RR** (*relative risk*) - ryzyko względne
- SCORAD** (*severity scoring of atopic dermatitis*) - skala oceny stopnia zaawansowania AZS
- SNP** (*single nucleotide polymorphism*) - polimorfizm pojedynczego nukleotydu
- TAP1 i TAP2** (*transporter associated with antigen processing 1 and 2*) - białka transportowe TAP (1 i 2)
- qPCR** (*real time-PCR*) - metoda łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym

### 1. WSTĘP

#### 1.1. Wprowadzenie

Atopowe zapalenie skóry, AZS (*ang. atopic dermatitis, łac. Dermatitis atopica*) jest przewlekłą i nawrotową dermatozą zapalną. Charakteryzuje się typową lokalizacją i morfologią zmian zapalnych skóry oraz uporczywym świądem. Na atopowe zapalenie skóry cierpi około jedna piąta całej ludzkości, ale częstość występowania tej choroby jest odmienna w różnych rejonach świata. W ciągu ostatnich trzech dekad zapadalność na AZS wzrosła 2- do 3- krotnie, szczególnie w krajach uprzemysłowionych, jednakże ostatnio obserwuje się również zwiększoną zachorowalność w krajach rozwijających się. Pierwsze objawy atopowego zapalenia skóry pojawiają się zazwyczaj we wczesnym dzieciństwie i poprzedzają inne choroby o podłożu alergicznym, takie jak astma czy alergiczny nieżyt nosa (Bieber i in., 2010; Nutten 2015; Kapur i in., 2018). U podłoża atopowego zapalenia skóry niewątpliwie leżą liczne oddziaływania pomiędzy różnymi genami, jak również pomiędzy genami a środowiskiem. AZS jest chorobą wieloczynnikową o złożonej patogenezie i etiologii, która mimo intensywnych badań nie została do końca poznana.



## 1.2. Epidemiologia i obraz kliniczny atopowego zapalenia skóry

Atopowe zapalenie skóry jest powszechnie występującą chorobą zapalną skóry o przewlekłym i nawrotowym charakterze, która dotyka głównie małe dzieci. Atopia jest definiowana jako wrodzona skłonność do produkowania immunoglobulin klasy E (IgE) w odpowiedzi na niewielkie ilości białek powszechnie występujących w środowisku takich jak: pyłki, roztocza kurzu domowego i alergeny pokarmowe (Thomsen 2014). Termin atopia został wprowadzony w 1923 roku przez Coca i Cooke jako ogólny termin określający choroby takie jak astma czy alergiczne zapalenie spojówek (Turner i in., 2006). W kolejnych latach Sulzberg zaliczył świerzbiączkę do chorób atopowych i od tego czasu choroba ta nazywana jest atopowym zapaleniem skóry (Polańska i in., 2008). AZS należy do najczęściej występujących chorób zapalnych skóry na świecie, dotyczy około 10-20% dzieci i 1-3% dorosłych (Bieber i in., 2010; Avena-Woods i in., 2017). Na podstawie przeprowadzonych badań ECAP (Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce) szacuje się, że w Polsce na AZS choruje 3-9% populacji (Samoliński i in., 2014; Raciborski i in., 2018; Kowalska-Olędzka i in., 2019). U około 50% chorych z AZS pierwsze objawy choroby pojawiają się w pierwszym roku życia, natomiast u 85-95% wystąpią do piątego roku. Prawie u ponad 70% chorych, u których choroba wystąpiła w dzieciństwie obserwuje się spontaniczną remisję przed okresem dojrzewania. U pozostałych chorych obserwuje się występowanie objawów do wieku dorosłego lub po okresie bezobjawowym następuje nawrót choroby (Thomsen 2015; Kapur i in., 2018). Szacuje się, że 50-75% dzieci, które we wczesnym dzieciństwie zachorowały na atopowe zapalenie skóry jest uczulonych na jeden lub więcej alergenów takich jak: alergeny pokarmowe, roztocza kurzu domowego i alergeny zwierząt domowych (Thomsen 2015). Również ryzyko wystąpienia innych chorób atopowych głównie astmy i alergicznego nieżytu nosa jest znacznie wyższe u dzieci z atopowym zapaleniem skóry. Dzieci ze średnim i ciężkim przebiegiem AZS mają 50% szans na rozwój astmy podczas gdy ryzyko wystąpienia u nich alergicznego nieżytu nosa to aż 75% (Thomsen 2015).

W przebiegu AZS wyróżnia się trzy fazy biorąc pod uwagę wiek pacjenta oraz lokalizację i charakter zmian skórnych: **faza niemowlęca** (od urodzenia do 2 roku życia), **faza dziecięca** (od 2 do 12 roku życia) i **faza młodzieńcza i wieku dorosłego** (młodzież po 12 roku życia i dorośli). Dla fazy niemowlęcej charakterystyczne są zmiany zwykle pojawiające się około 3 miesiąca życia. Mają charakter ostrego lub podostrego stanu

zapalnego skóry, zlokalizowane są głównie na policzkach i owłosionej skórze głowy, w ciężkich postaciach klinicznych mogą występować na pośladkach, wyprostnych częściach kończyn i tułowi. Występują w postaci grudkowo-pęcherzykowatych zmian o podłożu rumieniowym, przekształcają się w nadżerki i strupy. W fazie dziecięcej atopowe zapalenie skóry ustępuje albo przechodzi w postać przewlekłą zajmując zgięcia łokciowe, kolanowe, nadgarstki, skórę karku, grzbiety dłoni i stóp. Powstające wykwity mają charakter ognisk rumieniowatych z drobnymi grudkami, nadżerkami, przeczosami, zmianom tym towarzyszy lichenizacja i silny świąd. Faza młodzieńcza i wieku dorosłego charakteryzuje się symetrycznymi zmianami występującymi na skórze twarzy, szyi, obręczy barkowej, na grzbietach dłoni i stóp. Skóra w miejscach zmienionych chorobowo staje się ciemniejsza i grubsza (ulega lichenizacji) mogą również pojawić się nadżerki, przeczosy i wysięk surowiczy jako wynik nadkażeń *Staphylococcus aureus*, towarzyszy temu intensywny świąd (Turner i in., 2006; Kamińska i in., 2009; Kapur i in., 2018)

Dużym wyzwaniem w przeszłości było ustanowienie wiarygodnych kryteriów klinicznych rozpoznawania atopowego zapalenia skóry aż do opublikowania w 1980 roku przez Hanifina i Rajkę najczęściej stosowanych w ostatnich latach kryteriów diagnostycznych AZS (Tabela1). Rozpoznanie atopowego zapalenia skóry opiera się na stwierdzeniu u chorego trzech spośród czterech głównych objawów oraz trzech lub więcej objawów dodatkowych (Turner i in., 2006; Waszczykowska i in., 2004; Avena-Woods i in., 2017).

## WSTĘP

Tabela 1. Kryteria rozpoznania atopowego zapalenia skóry (wg. Hanifina i Rajki, 1983)

<b>Kryteria duże (główne)</b>	<b>Kryteria małe (dodatkowe)</b>
uporczywy świąd	suchość skóry
typowa morfologia, lokalizacja zmian skórnych	rybia łuska
przewlekłość i nawrotowość	rogowacenie przymieszkowe
osobniczy i/lub rodzinny wywiad dotyczący chorób atopowych	zapalenie czerwieni wargowej
	biały dermografizm
	nawrotowe infekcje skóry
	zapalenie brodawek sutkowych
	dodatkowy fałd na dolnej powiece
	Dennie-Morgana
	pogłębiony fałd szyjny
	świąd podczas pocenia
	wczesny początek
	rumień na twarzy
	nawrotowe zapalenie spojówek
	zaćma
	stożek rogówki
	podwyższony poziom IgE
	nietolerancja pokarmowa i/lub wełny
	wpływ stresu i czynników środowiskowych na zaostrzenia
	łupież biały
	inne cechy

### **1.3. Etiopatogeneza atopowego zapalenia skóry**

Patogeneza atopowego zapalenia skóry jest złożona ze względu na istotną rolę oddziaływań pomiędzy czynnikami środowiskowymi, czynnikami genetycznymi związanymi z dysfunkcją bariery skórnej oraz ze względu na zaburzenia dotyczące odpowiedzi immunologicznej zarówno wrodzonej jak i nabytej (Dokmeci i in., 2008; Novak i in., 2011; Kim i in., 2016)

#### **1.3.1. Rola czynników środowiskowych**

Wzrost liczby zachorowań na atopowe zapalenie skóry w krajach rozwiniętych, który zbiegł się ze wzrostem uprzemysłowienia, sugeruje udział czynników środowiskowych w rozwoju AZS (Liang i in., 2016; Egawa i in., 2015). Różnice w występowaniu AZS związane z industrializacją mogą dotyczyć nie tylko różnych populacji ale nawet jednej nacji. Przykładem są badania przeprowadzone po zjednoczeniu Niemiec, które wykazały wzrost liczby chorych na AZS we Wschodnich Niemczech z 16% w roku 1991 do 23,4% w roku 1997 (Bonamonte i in., 2019). Za udziałem czynników środowiskowych w etiopatogenezie atopowego zapalenia skóry przemawiają również znaczne różnice w występowaniu choroby w różnych regionach geograficznych świata (Egawa i in., 2015; Kaufman i in., 2018). Badania przeprowadzone na prawie 2 milionach dzieci ze 100 krajów wykazały, że w grupie wiekowej 6-7 lat częstość występowania AZS w Indiach wynosiła 0,9%, a w Ekwadorze 22,5% (Nutten 2015).

Na występowanie i przebieg kliniczny atopowego zapalenia skóry niewątpliwie wpływ ma współczesny styl życia (tj. hipoteza higieny, zachodnia dieta) oraz wiele czynników środowiskowych jak zanieczyszczenie powietrza, dym tytoniowy, (Kim i in., 2016; Liang i in., 2016; Sabounchi i in., 2015) czy też czynniki klimatyczne, emocjonalne (stres), metaboliczne oraz infekcyjne (Bonamonte i in., 2019). Istnieje coraz więcej dowodów na to, że czynniki środowiskowe powodują zmiany epigenetyczne, które przyczyniają się do patogenezy AZS (Kim i in., 2016). Reasumując, w patogenezę atopowego zapalenia skóry zaangażowanych jest wiele czynników środowiskowych, które powiązane są z czynnikami genetycznymi oraz immunologicznymi w sieć wzajemnych zależności (Bonamonte i in., 2019).

### 1.3.2. Czynniki genetyczne

Predyspozycje genetyczne zostały uznane za ważny czynnik ryzyka wystąpienia chorób alergicznych już na początku XX wieku. Późniejsze, bardziej zaawansowane badania epidemiologiczne dostarczyły dowodów potwierdzających genetyczne predyspozycje do atopowego zapalenia skóry (Turner i in., 2006). Badania epidemiologiczne wykazały, że ryzyko wystąpienia atopii u dziecka wynosi 50% gdy u obojga rodziców występuje atopia, w przypadku gdy jedno z rodziców choruje, ryzyko to wynosi 25% (Thomsen 2014). Rolę czynników genetycznych w atopowym zapaleniu skóry potwierdzają obserwacje bliźniąt wykazujące znamienne wyższe ryzyko wystąpienia choroby u bliźniąt monozygotycznych 72-86% w porównaniu do bliźniąt dwuzygotycznych 21-23% (Bieber i in., 2010; Portelli i in., 2015; Thomsen 2014). Obserwacje te wskazują na znaczny udział komponenty genetycznej w rozwoju atopowego zapalenia skóry. Współczesne narzędzia, takie jak genomika, analiza sprzężeń i badania powiązań, w znacznej mierze przyczyniają się do zrozumienia genetycznych podstaw AZS. Do niedawna w poszukiwaniach podłoża genetycznego brano pod uwagę głównie geny związane z układem immunologicznym, jednakże wyniki ostatnich badań podkreślają rolę genów zlokalizowanych na chromosomie 1q21. Region ten zawiera kompleks różnicowania naskórka (*ang. epidermal differentiation complex, EDC*), gdzie kodowane są białka odpowiedzialne za terminalne różnicowanie keratynocytów. Badania nad rolą genetycznie uwarunkowanych nieprawidłowości bariery naskórkowej w patogenezie atopowego zapalenia skóry doprowadziły do odkrycia mutacji w genie filagryny. Gen kodujący filagrynę (*FLG*) zlokalizowany jest na chromosomie 1 w kompleksie EDC, zbudowany jest z 3 eksonów, przy czym trzeci ekson koduje prawie całe białko profilagrynę. Filagryna jest to białko strukturalne występujące w warstwie rogowej naskórka, którego funkcją jest spajanie włókien keratyny w procesie terminalnego różnicowania keratynocytów. Znanych jest 49 mutacji w genie *FLG*, a częstość występowania tych mutacji różni się znacznie między odmiennymi grupami etnicznymi i populacjami (Liang i in., 2016). Dwie najczęściej występujące mutacje w populacji europejskiej (substytucja R501X i delecja 2282del4) zostały po raz pierwszy opisane przez Palmera i wsp. w 2006 roku. Mutacja R501X, to mutacja nonsensowna zmieniająca kodon argininy w pozycji 501 na kodon stop. Druga mutacja to delecja sekwencji 4 par zasad w pozycji 2282 powodująca przesunięcie ramki odczytu. Obie mutacje powodują utratę funkcji genu poprzez zatrzymanie translacji genu *FLG*, a tym samym również zahamowanie syntezy białka profilagryny w naskórku

(Smith i in., 2006; Lesiak i in., 2010; Liang 2016). Silny związek mutacji w genie *FLG* z atopowym zapaleniem skóry początkowo wykazano w populacji irlandzkiej oraz w populacji szkockich dzieci chorych na AZS i astmę. Badania te zostały powtórzone w ponad 30 niezależnych badaniach. Przeprowadzone metaanalizy na kilku tysiącach pacjentów potwierdziły zwiększone ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry wśród osób z mutacją w genie *FLG* (OR= 3,12 do 4,78) (Liang i in., 2016). Badania przeprowadzone na populacji polskiej przez Lesiak i wsp. wykazały istotną statystycznie różnicę w występowaniu mutacji 2282del4 w genie *FLG* u chorych na atopowe zapalenie skóry w porównaniu z kontrolą, obecność mutacji 2282del4 zwiększa prawie 6-krotnie (OR=5,76) ryzyko zachorowania na AZS. W badaniach tych nie zaobserwowano jednak istotnych różnic w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną dla mutacji R501X (Lesiak i in., 2010). Szacuje się, że w krajach europejskich mutacje te występują u 33-50% osób z atopowym zapaleniem skóry oraz u 4-10% osób zdrowych. AZS występuje u ok. 60% heterozygot i 90% homozygot będących nosicielami mutacji w genie *FGL*. Mutacje w genie filagryny odgrywają istotną rolę w patogenezie AZS, ale należy również zwrócić uwagę na mutacje w innych genach (Nowicki i in., 2015; Kim i in., 2019). Wytypowanie nowych genetycznych czynników ryzyka stało się możliwe dzięki wprowadzeniu badań asocjacyjnych całego genomu GWAS. Badania GWAS (*GWAS, ang. genom-wide association study*) stanowią najnowszy kierunek analiz genetycznych ostatnich trzech dekad, który wyłonił nowe podejście do wyjaśnienia genetycznych skłonności do chorób o podłożu wielogenowym, do których niewątpliwie należy atopowe zapalenie skóry. Technika ta umożliwia jednoczesną analizę setek tysięcy polimorfizmów umiejscowionych w całym genomie zarówno w sekwencjach kodujących, regulatorowych jak i w obszarach międzygenowych. Polimorfizmy te są jedynie markerami regionów, w których należy poszukiwać właściwych polimorfizmów funkcjonalnych, dlatego wyniki te wymagają dodatkowych badań umożliwiających odkrycie wariantu związanego z ryzykiem, a następnie potwierdzenia na niezależnych populacjach.

Stosując analizę całego genomu GWAS oraz analizę Immunochip, która koncentruje się wyłącznie na regionach genomu znanych z powiązania z chorobą, przez co wychwytuje więcej zmienności genetycznej w tych regionach, zidentyfikowano 19 loci związanych z atopowym zapaleniem skóry (Bin i in., 2016). Pierwsze badania GWAS dotyczące atopowego zapalenia skóry zostały opublikowane w 2009 roku przez Esparza-Gordillo i wsp. Badania te potwierdziły związek genu *FLG* z podatnością na AZS oraz pozwoliły na zidentyfikowanie

genu *C11orf30* zlokalizowanego na chromosomie 11q13 kodującego białko istotne dla prawidłowego funkcjonowania bariery nabłonkowej (Esparza-Gordillo i in., 2009; Bin i in., 2016; Liang i in., 2016; Portelli i in., 2015). W 2011 roku przeprowadzono analizę GWAS dla chińskiej populacji Han, w której potwierdzono związek regionu *FLG*, jak również wykazano związek dwóch nowych loci 5q22.1 i 20q13.33 z podatnością na AZS. Z regionem 5q22.1 związany jest gen *TMEM232* oraz *TLSP*, natomiast region 20q13.33 zawiera gen kodujący przedstawiciela nadrodziny receptora czynnika wzrostu nowotworu B6 -*TNFRSF6B* (Bin i in., 2016; Liang i in., 2016). W tym samym roku Paternoster i wsp. wykonali meta-analizę wyników uzyskanych z GWAS w populacji europejskiej, która pozwoliła na identyfikację trzech kolejnych loci związanych z ryzykiem zachorowania na AZS: 5q31.1, 11q13.1 oraz 19p13.2 (Paternoster i in., 2011). W locus 5q31.1 zlokalizowane są geny cytokin IL-4 i IL-13 związane z odpowiedzią limfocytów Th2. W 2012 roku Hirota i wsp. przeprowadzili badanie przeszukiwania genomu dla AZS w populacji japońskiej, które pozwoliło na zidentyfikowanie ośmiu nowych regionów: 2q12, 3p21.33, 3q13.2, 6p21.3, 7p22, 10q.21.2, 11p15.4 i 20q13, w tym regionu 2q12 zawierającego geny dla receptorów dla cytokin z rodziny interleukiny 1, które odgrywają istotną rolę w odpowiedzi wrodzonej oraz regionu na chromosomie 6p21.3 z kompleksem zgodności tkankowej (MHC). Ellinghaus i wsp. w analizie ImmunoChip ujawnili kolejne cztery loci podatności na AZS: 4q27, 11p13, 16p13.13 oraz 17q21.32. W regionach tych zlokalizowane są geny dla *IL-2* i *IL-21*, geny dla czynnika 6 związanego z TNF oraz geny *RAG1* i *RAG2*, *SOCS1* i *NGFR* (Bin i in., 2016; Liang i in., 2016). W 2015 roku Schaarschmidt i wsp. opublikowali wyniki analizy GWAS, w których zweryfikowali 19 regionów wcześniej wytypowanych jako obszary związane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania oraz zidentyfikowali dwa nowe regiony 2q24.3 i 9p21.3 (Schaarschmidt i in., 2015). W tym samym roku badanie GWAS przeprowadzone przez Paternoster i wsp. potwierdziło 16 loci związanych z podatnością na AZS zidentyfikowanych w poprzednich badaniach oraz pozwoliło wytypować 11 nowych loci obejmujących geny (*PPP2R3C*, *IL-7R*, *STAT3* i *ZBTB10*) kodujące białka regulujące funkcje limfocytów T i wrodzoną odpowiedź immunologiczną (Paternoster i in., 2015). Geny kandydaci zidentyfikowani z wykorzystaniem badań przeszukiwania genomu sugerują udział wielu genów w patogenezie atopowego zapalenia skóry, między innymi genów związanych z funkcją bariery skórnej, wrodzoną i nabytą odpowiedzią immunologiczną, cytokinami, limfocytami T regulatorowymi, metabolizmem witaminy D i czynnikiem wzrostu nerwów (Bin i in., 2016). Podsumowanie badań przeszukiwania genomu w atopowym zapaleniu skóry przedstawiono w tabeli nr.2

Tabela 2. Podsumowanie badań przeszukiwania genomu w atopowym zapaleniu skóry.

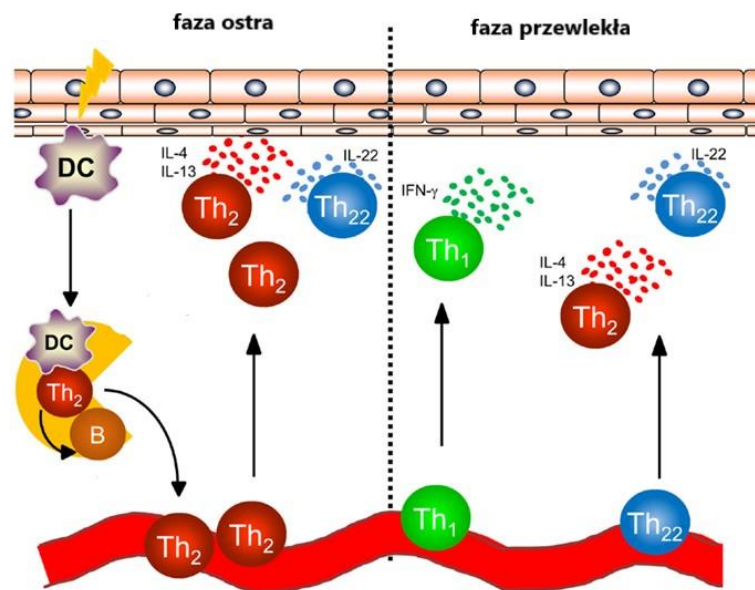
Referencje	Grupa badana	Grupa potwierdzająca	Populacja	Chromosom	Geny
<b>Esparza-Gordillo i wsp.</b> <b>Nat Genet. 2009 May; 41(5):596–601</b>	939 chorych, 957 kontroli i 270 rodzin	1363 chorych i 2739 kontroli z Niemiec; 1274 AZS i 1218 Europejczyków	Europejczycy/ Niemcy	11q13.5 1q21.3	<i>C11orf30</i> <i>LRRC32</i> <i>FLG</i>
<b>Sun i wsp.</b> <b>Nat Genet. 2011 Jun;43(7):690–4</b>	1012 chorych i 1362 kontroli	3624 chorych 12197 kontroli z chińskiej populacji Han; 1806 chorych i 3256 kontroli z Niemiec	Chińczycy	5q22.1 20q13.33	<i>TMEM232</i> <i>SLC25A46</i> <i>TNFRSF6B</i> <i>ZGPAT</i>
<b>Paternoster i wsp.</b> <b>Nat Genet. 2011 Dec; 44(2):187–92</b>	5606 chorych i 20565 kontroli z 16 populacji europejskich	5419 chorych i 19833 kontroli z 14 ośrodków	Europejczycy	11q13.1a 19p13.2a 5q31a	<i>OVOLI</i> <i>ACTL9/ADAMTS10</i> <i>KIF3A</i> <i>IL-13-RAD50</i>
<b>Hirota i wsp.</b> <b>Nat Genet. 2012 Nov; 44(11):1222–6</b>	1472 chorych i 7971 kontroli	1856 chorych i 7021 kontroli	Japończycy	2q12.1ab 6p21.32ab 11p15.4a 3p21.33 3q13.2ab 7p22.2b 10q21.2ab 20q13.2	<i>L1RL1-IL18R1-IL-18RAP</i> <i>region MHC</i> <i>OR10A3/NLRP10</i> <i>GLB1</i> <i>CCDC80</i> <i>CARD11</i> <i>ZNF365</i> <i>CYP24A1-PFDN4</i>
<b>Ellinghaus i wsp.</b> <b>Nat Genet. 2013 Jul; 45(7):808–12</b>	2425 chorych i 5449 kontroli z Niemiec	7196 chorych oraz 15480 kontroli z Irlandii, Japonii i Chin	Niemcy, Irlandczycy, Chinczycy, Japończycy	2q12.1 4q27ab 11p13ab 16p13.13ab 17q21.32	<i>SLC9A4</i> <i>IL2/IL21</i> <i>PRR5L</i> <i>CLEC16A-DEX</i> <i>ZNF652</i>



<b>Esparza-Gordillo i wsp.</b> <b>J Allergy ClinImmunol. 2013;</b> <b>132(2):371–7</b>	2895 chorych i 2448 kontroli	1 kohorta: 1429 chorych i 1737 kontroli 2 kohorta: 2806 chorych i 5068 kontrolnych	Europejczycy	1q21.3a	<i>IL6R</i>
<b>Schaarschmidt i wsp.</b> <b>J Allergy ClinImmunol. 2015;</b> <b>136(3):802–6</b>	870 chorych i 5293 kontroli	1383 chorych i 1728 kontroli	Niemcy	2q24.3 9p21.3	<i>XIRP2(CYMA3)</i> <i>DMRTA1</i>
<b>Paternoster i wsp.</b> <b>Nat Genet. 2015 Dec;</b> <b>47(12):1449–56</b>	21399 chorych i 95464 kontroli	32059 chorych i 228628 kontroli	Europejczycy, Azjaci, Afrykanie, Latynosi	14q13.2 11q24.3 1q21.2 8q21.3 10p15.1 5p13.2 2p25.1 2p16.1 17q21.2 3p21.1 2p13.3	<i>PPP2R3C</i> <i>-/EST1</i> <i>C1orf51/MRPS21</i> <i>MIR5708/ZBTB10</i> <i>IL15RA/IL2RA</i> <i>IL7R/CASPL</i> <i>LINC00299</i> <i>PUS10</i> <i>STAT3</i> <i>SFMBT1/RFT1</i> <i>CD207/VAX2</i>

### 1.3.3 Mechanizmy immunologiczne

W AZS obserwuje się liczne zaburzenia immunologiczne obejmujące zarówno odpowiedź typu humoralnego jak i komórkowego oraz defekty odpowiedzi nieswoistej: chemotaksji, fagocytozy i aktywności komórek NK. Odpowiedź wrodzona jest niespecyficznym mechanizmem obronnym wykorzystywanym przez gospodarza bezpośrednio lub w ciągu kilku godzin po ekspozycji na antygen. Odpowiedź immunologiczna nabyta jest antygenowo specyficznym mechanizmem, który rozwija się w ciągu kilku dni i eliminuje specyficzne antygeny (Dokmeci i in., 2008). Skóra stanowi pierwszą linię obrony przed infekcjami (Bieber i in., 2010). W skórze występuje wiele komórek zaangażowanych we wrodzoną odpowiedź jak: keratynocyty, naskórkowe komórki Langerhansa (KL), skórne komórki dendrytyczne (*ang. dermal dendritic cells*, DDC) i makrofagi. Kluczową rolę we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej odgrywają również szybko rekrutowane z krążenia komórki NK i NKT, monocyty i granulocyty (Leung i in., 2004; Dokmeci i in., 2008; Egawa i in., 2015) oraz plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (*ang. plasmacytoid dendritic cells*, PDC) (Niedoszytko i in., 2007; Egawa i in., 2015). W AZS obserwuje się liczne zaburzenia w odpowiedzi immunologicznej wrodzonej, które powodują zwiększoną skłonność do infekcji wirusowych, bakteryjnych czy grzybiczych. Komórki Langerhansa i komórki dendrytyczne skóry oprócz ich funkcji w odpowiedzi wrodzonej odgrywają również istotną rolę w inicjacji nabytej odpowiedzi immunologicznej (Dokmeci i in., 2008). Limfocyty T i B, komórki dendrytyczne jak również liczne cytokiny i chemokiny uruchamiają nabytą odpowiedź immunologiczną (Leung i in., 2004; Egawa i in., 2015), która odgrywa kluczową rolę w patogenezie AZS (Leung i in., 2013; Sullivan 2017). Związana z tą odpowiedzią jest aktywacja i proliferacja limfocytów T w skórze (Dokmeci i in., 2008). W ostrej fazie choroby w skórze zmienionej i niezmienionej chorobowo wykazano obecność cytokin IL-4, IL-5 i IL-13 związanych z dominacją limfocytów Th2 (Bieber i in., 2010; Egawa i in., 2015; Klonowska i in., 2018). Limfocyty Th2 odpowiadają za stymulację do produkcji przeciwciał, jak również są zaangażowane w zmiany dotyczące różnicowania keratynocytów. Wykazano także, że cytokiny wydzielane przez komórki Th2 wpływają na ekspresję filagryny (Leung i in., 2013; Kim i in., 2016; Sulliwana i in., 2017).



Rycina 1. Patogeneza atopowego zapalenia skóry. Na podstawie (Biedermann i in., 2015).

Ponadto IL-4 i IL-13 są zaangażowane w początkową fazę reakcji zapalnej, powodując zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna, natomiast IL-5 stymuluje dojrzewanie i chemotaksję eozynofiliów (Dokmeci i in., 2008; Bieber i in., 2010; Kim i in., 2016). Przewaga limfocytów Th2 odgrywa zasadniczą rolę we wczesnym okresie atopowego zapalenia skóry (Rycina 1), podczas gdy w zmianach przewlekłych istnieje przewaga limfocytów Th1 (Dokmeci i in., 2008; Tsakok i in., 2019), które wydzielają IFN- $\gamma$ , IL-12 jak również IL-5 i GM-CSF charakterystyczne dla limfocytów Th1/Th0 (Bieber i in., 2010). W przewlekłej fazie AZS są produkowane przez limfocyty Th1 cytokiny takie jak IL-12 i IL-18, jak również wiele cytokin związanych z remodelingiem na przykład IL-11 i TGF- $\beta$ 1. Komórki Th1 są odpowiedzialne za apoptozę keratynocytów poprzez wzajemne oddziaływanie z receptorem śmierci komórkowej Fas (Bieber i in., 2010; Sullivan 2017). Dwufazowy wzór aktywacji limfocytów - przesunięcie w kierunku odpowiedzi Th2 w początkowej fazie choroby i odpowiedź limfocytów Th1/Th0 w przewlekłej fazie choroby, został potwierdzony testami skórnymi. Po 24 godzinach po podaniu alergenu obserwowano wzrost ekspresji IL-4 zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka, a następnie obserwowano spadek ekspresji IL-4 do poziomu początkowego - w przeciwieństwie do INF- $\gamma$ , którego ekspresja na poziomie mRNA była po 24 godzinach niewykrywalna, natomiast po 48-72 godzinach obserwowano znaczny jego wzrost. Podwyższona ekspresja

INF- $\gamma$  na poziomie mRNA w miejscach wyprysku atopowego poprzedzona była wzrostem ekspresji IL-12 związanej z naciekiem makrofagów i eozynofilii (Bieber i in., 2010).

W ostatnim okresie dużo uwagi poświęca się limfocytom T o funkcji regulatorowej (Treg), które są kolejnym ważnym modulatorem odpowiedzi immunologicznej skóry (Egawa i in., 2015). Wykazano, że limfocyty Tregs o fenotypie CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> z mutacją czynnika transkrypcyjnego FoxP3 wpływają na zwiększenie produkcji immunoglobulin IgE u pacjentów z chorobami zapalnymi skóry i alergią pokarmową (Bieber i in., 2010). Zaobserwowano także podwyższoną liczbę limfocytów Tregs o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> we krwi obwodowej pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (Dokmeci i in., 2008; Moosbrugger-Martinz i in., 2019). Ponadto wykazano, że wzrost liczby komórek Treg we krwi i skórze pacjentów z AZS koreluje z ciężkością przebiegu choroby (Niedoszytko i in., 2017). Zaobserwowano także, że u pacjentów z AZS limfocyty Treg o fenotypie CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> tracą aktywność immunosupresyjną po stymulacji superantygenami *Staphylococcus aureus*, co powoduje nasilenie stanu zapalnego skóry (Bieber 2010, Egawa i in., 2015). Dodatkowo immunohistochemiczne wybarwienie skrawków skóry w przewlekłej fazie AZS wykazało gęsty okołonaczyniowy naciek z komórek CD25<sup>+</sup> w warstwie brodawkowej skóry, podczas gdy komórki FoxP3<sup>+</sup> były rozmieszczone okołonaczyniowo i śródmiąższowo w skórze właściwej oraz w naskórku i wzdłuż połączeń skórno-naskórkowych. W skórze zdrowej obserwowano jedynie słabe wybarwienie zarówno dla CD25 jak i FoxP3 (Dokmeci i in., 2008). Istotną rolę w patogenezie AZS odgrywa również plastyczność limfocytów Treg, które pod wpływem specyficznych cytokin i mechanizmów epigenetycznych mają zdolność różnicowania się w komórki Th1, Th17 lub Th2 (Niedoszytko i in., 2017).

Wyniki badań ostatnich lat wskazują także na udział limfocytów Th17 i Th22 w patogenezie AZS (Kim i in., 2019). Limfocyty Th17, wyodrębnione z rodziny limfocytów T pomocniczych CD4<sup>+</sup>, są źródłem interleukiny IL-17A, IL-17B i IL-22. Przypisuje się im udział w obronie organizmu przed infekcjami bakteryjnymi, a także mają one istotne znaczenie w patomechanizmie chorób autoimmunologicznych. Wykazano, że IL-17 w skórze zwiększa produkcję IL-6 i IL-8 w keratynocytach i indukuje słabą ekspresję cząsteczek ICAM-1 i HLA-DR (Dokmeci i in., 2008). Zaobserwowano także, że liczba komórek Th17 i poziom ekspresji IL-17 w skórze i surowicy koreluje z przebiegiem i ciężkością AZS. Z kolei limfocyty Th22 produkują IL-22, która odpowiada za osłabienie bariery skórnej i hiperplazję naskórka (Kim i in., 2016; Guttman-Yassky i in., 2017). Limfocyty Th22 podobnie jak limfocyty Th2 wydzielają cytokiny, które modulują ekspresję filagryny

w keratynocytach u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Jednakże liczne badania na różnych populacjach wykazały sprzeczne wyniki dotyczące udziału limfocytów Th17 i Th22 w patogenezie atopowego zapalenia skóry. Rozbieżności te wynikają w dużej mierze z różnic etnicznych badanych grup oraz charakterystyki pacjentów (Cabanilas i in., 2016; Kim i in., 2016).

W literaturze obszernie omawiany jest również udział komórek dendrytycznych w patogenezie AZS (Bieber 2010). W wypryskach atopowych skóry wykazano dwa typy komórek dendrytycznych naskórka: komórki Langerhansa (KL) oraz nacieki zapalnych komórek dendrytycznych naskórka (*ang. inflammatory dendritic epidermal cells*, IDEC). Kluczowymi i najbardziej efektywnymi komórkami dendrytycznymi są komórki Langerhansa, które mają zdolność do przetwarzania i prezentowania obcych antygenów limfocytom T. Obie populacje komórek wykazują na swojej powierzchni wysoki poziom ekspresji receptora FcεR1 o wysokim powinowactwie do IgE (*ang. high-affinity Immunoglobulin E receptor*) (Dokmeci i in., 2008; Bieber 2010; Kim i in., 2016). Poziom ekspresji receptora FcεR1 na komórkach Langerhansa w skórze zmienionej chorobowo jest znacznie wyższy niż w miejscach nie objętych chorobą. Drugą populacją komórek dendrytycznych, która znajduje się w skórze chorych na AZS są zapalne komórki dendrytyczne naskórka (IDEC) nieobecne w zdrowej skórze. Podobnie jak KL komórki IDEC wykazują ekspresję na swojej powierzchni receptora FcεR1 i odgrywają istotną rolę w prezentacji alergenów limfocytom Th1/Th2 i Treg w AZS (Liang-Shiou i in., 2005; Dokmeci i in., 2008; Bieber 2010; Egawa i in., 2015). Uważa się, że ekspresja receptora FcεR1 na komórkach Langerhansa odgrywa ważną rolę we wczesnej fazie AZS, ponieważ na skutek zaburzenia funkcji bariery skórnej u pacjentów z AZS alergeny łatwo przenikają do naskórka, gdzie są wychwytywane przez obecny na komórkach Langerhansa receptor FcεR1 o wysokim powinowactwie do IgE. W ten sposób komórki Langerhansa mogą potencjalnie odpowiadać na liczne alergeny poprzez wiązanie immunoglobuliny IgE o różnej specyficzności, co w konsekwencji prowadzi do wydajnego przetwarzania alergenów w kontekście antygenów MHC klasy II (Bieber 2010; Egawa i in., 2015). Komórki Langerhansa po kontakcie z antygenem w skórze wędrują do węzłów chłonnych i prezentują antygen naiwnym limfocytom T. Dodatkowo aktywacja komórek Langerhansa poprzez receptory FcεR1 powoduje wydzielanie chemokin (CCL17, CCL18, CCL19, CXCL9, CXCL10, MCP-1, IL-16, CCL17, CCL2) odpowiedzialnych za rekrutację innych prozapalnych komórek do skóry. W węzłach chłonnych aktywowane komórki dendrytyczne

ukierunkowują naiwne limfocyty T do różnicowania się w limfocyty Th2 produkujące IL-4 (Leung i in., 2004; Dokmeci i in., 2008; Egawa i in., 2015; Kim i in., 2016). W odróżnieniu od zapalnych komórek dendrytycznych naskórka i komórek Langerhansa, w skórze pacjentów z AZS wykazano znacznie mniejszą liczbę plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych, które charakteryzują się obniżonym poziomem ekspresji receptora FcεR1. Komórki te odpowiedzialne są za produkcję IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ . Spadek poziomu INF typu 1 w skórze chorych na AZS powoduje u tych pacjentów większą skłonność do skórnych infekcji wirusowych (Dokmeci i in., 2008; Bieber 2010; Kim i in., 2016; Rerknimit i in., 2017). W zmianach skórnych opisano komórki NK występujące w bliskim kontakcie z komórkami dendrytycznymi. Wykazano również obniżoną liczbę tych komórek w krążeniu u chorych z AZS. Zauważono, że świeżo wyizolowane z krwi pacjentów polialergicznym komórki NK spontanicznie wydzielają znacznie większe ilości IL-4, IL-5, IL-13 i IFN- $\gamma$  w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto wykazano, że komórki NK indukują dojrzewanie komórek dendrytycznych. Wzajemne oddziaływania pomiędzy komórkami dendrytycznymi a komórkami NK prowadzą do zwiększonej produkcji cytokin prozapalnych, a tym samym wpływają na odpowiedź immunologiczną. Komórki NK uczestniczą w regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez modulację funkcji komórek dendrytycznych, ale ich rola w AZS nie została do końca poznana (Dokmeci i in., 2008).

## 1.4. Komórki NK

Komórki NK (*ang. natural killer*) są kluczowymi elementami odporności nieswoistej, zapewniają pierwszą linię obrony przed czynnikami zakaźnymi, poprzez zdolność do zabijania bez wcześniejszej immunizacji komórek docelowych, między innymi komórek zakażonych wirusem oraz komórek nowotworowych. Aktywność cytotoksyczna ludzkich komórek NK jest modulowana przez oddziaływanie hamujących i aktywujących receptorów błonowych występujących na ich powierzchni z antygenami MHC klasy I obecnymi na komórkach gospodarza. Komórki NK są limfocytami pochodzącymi ze szpiku kostnego. Wywodzą się z krwiotwórczych komórek macierzystych (*ang. HSC-hematopoietic stem cell*), z których różnicują się również limfocyty T i B (Middleton i in., 2010; Gołąb i in., 2017). Komórki NK stanowią 5-15% limfocytów krwi obwodowej. Fenotypowo są zdefiniowane jako limfocyty mające na powierzchni cząsteczkę CD56 i CD16. Marker CD56 jest cząsteczką adhezji komórek nerwowych-1 (NCAM-1), natomiast cząsteczka CD16 jest receptorem dla fragmentu Fc przeciwciał klasy IgG (FcγRIII) (Caligiuri i in., 2008; Middleton i in., 2010; Deniz i in., 2013; Gołąb i in., 2017). Biorąc pod uwagę ekspresję cząsteczek CD56 i CD16 na powierzchni komórek NK można je podzielić na 2 subpopulacje:

- i) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+/-</sup> - komórki charakteryzujące się wysoką ekspresją cząsteczki CD56 na powierzchni i brakiem lub niewielką ekspresją cząsteczki CD16.
- ii) CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> - komórki charakteryzujące się umiarkowaną ekspresją cząsteczki CD56 na powierzchni i wysoką ekspresją cząsteczki CD16 (Cooper i in., 2001; Aktas i in., 2005; Deniz i in., 2013; Gołąb i in., 2017).

Większość komórek NK we krwi stanowią komórki CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (85-95%), natomiast komórki CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+/-</sup> występują w tkankach, głównie w narządach limfatycznych (Fehniger i in., 2003). Komórki NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>+/-</sup> mają większą zdolność do wytwarzania cytokin, ale słabsze właściwości cytotoksyczne podczas gdy populacje komórek CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> są bardziej cytotoksyczne, dzięki dużej liczbie ziaren litycznych w cytoplazmie. Uznaje się je za bardziej dojrzałe formy komórek NK (Cooper i in., 2001; Fauriat i in., 2010). Funkcje efektorowe komórek NK są regulowane przez hamujące lub aktywujące sygnały, pochodzące od receptorów obecnych na powierzchni tych komórek (Beziat i in., 2016). Receptory obecne na ludzkich komórkach NK należą do dwóch odrębnych rodzin:

- i) receptory lektynowe: CD94/NKG2 i NKR-P1
- ii) receptory z nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych: receptory KIR (*ang. killer cell immunoglobulin-like receptors*) oraz spokrewnione z cząsteczkami KIR receptory LILR (*ang. leucocyte Ig-like receptors*) i LAIR (*ang. leucocyte-associated inhibitory receptors*), jak również receptory naturalnej cytotoksyczności (NCR) (Middleton i in., 2010).

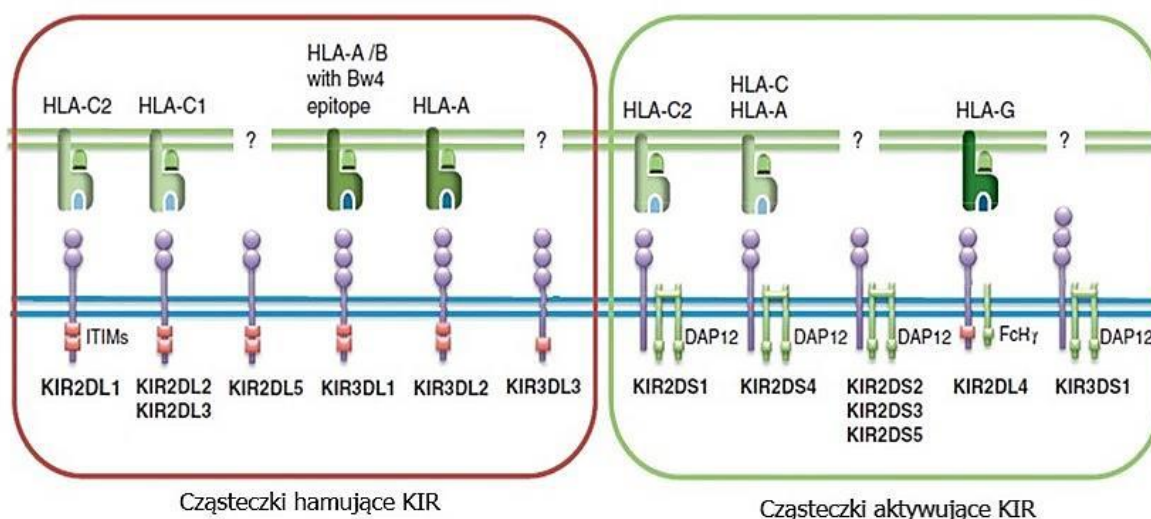
Biorąc natomiast pod uwagę ekspresję powierzchniową receptorów NKG2A i/lub KIR i innych markerów, komórki NK CD56<sup>dim</sup> można podzielić na różne subpopulacje odpowiadające różnym etapom różnicowania charakteryzującym się spadkiem zdolności proliferacyjnej i równoległe wzrostem aktywności cytotoksycznej. Za najbardziej dojrzałe i ostatecznie zróżnicowane komórki NK uważa się komórki NK KIR<sup>pos</sup> CD57<sup>pos</sup> CD16<sup>bright</sup>, które wykazują na powierzchni ekspresję specyficznego dla HLA-E receptora aktywującego NKG2C. Ostatnie doniesienia wykazują, że komórki NK u osób, które przeszły infekcję wirusem CMV mają wysoką ekspresję NKG2C oraz wykazują zdolności adaptacyjne i funkcję pamięci (Pende i in., 2019).

#### **1.4.1 KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) – struktura i organizacja**

Receptory KIR stanowią jedną z głównych nadrodzin cząsteczek immunoglobulinopodobnych. Receptory te obecne są nie tylko na komórkach NK, ale również na limfocytach T (Kuśnierz 2006; Gardiner i in., 2008). Na naiwnych limfocytach T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ekspresja tych receptorów jest praktycznie nieobecna, a najwyższy jej poziom obserwuje się na zróżnicowanych limfocytach T pamięci. To tłumaczy niższą ekspresję receptorów KIR na komórkach NK i limfocytach T krwi pępowinowej w porównaniu z ich ekspresją na limfocytach T pochodzących od zdrowych dorosłych osób. Rola ekspresji cząsteczek KIR na limfocytach T pozostaje nadal niewyjaśniona, a większość badań dotyczy głównie limfocytów T CD8, które stanowią największą subpopulację limfocytów KIR pozytywnych. Repertuar KIR na komórkach NK uważany jest za niezmienny w czasie. Natomiast częstość limfocytów T KIR pozytywnych z wiekiem rośnie z powodu akumulacji ostatecznie zróżnicowanych limfocytów T. Wykazano także, że swoiste limfocyty CD8 T dla HCMV prawie całkowicie nie wykazują ekspresji KIR, ponadto specyficzność limfocytów wykazujących ekspresję receptorów KIR nadal pozostaje

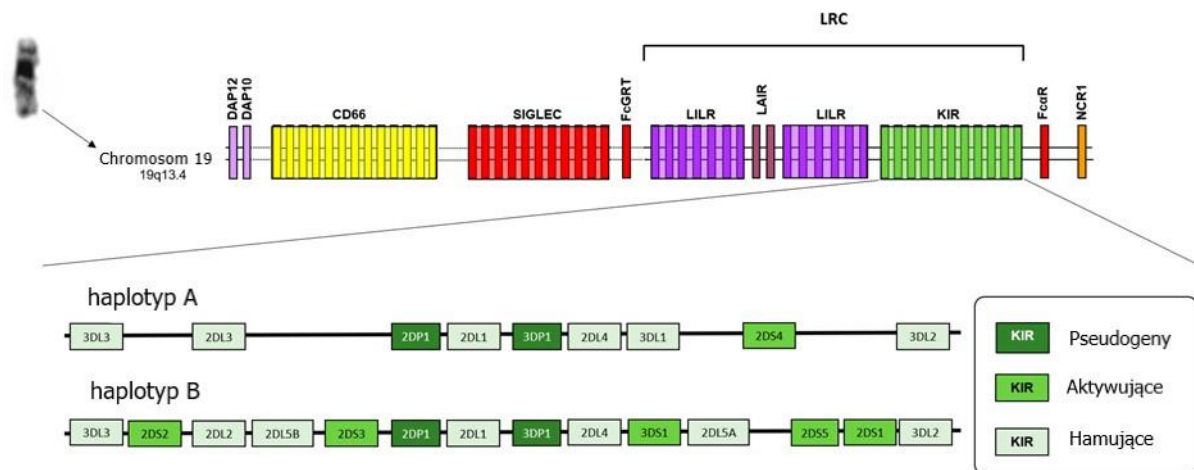


nieznana (Beziat i in., 2016). Odgrywają one istotną rolę w aktywacji i hamowaniu komórek NK (Vilches i in., 2002). Wszystkie cząsteczki KIR, zarówno aktywujące jak i hamujące, mają dwie (KIR2D) lub trzy (KIR3D) immunoglobulinowe domeny białkowe w części zewnątrzkomórkowej, region przez błonowy i długi (L-long) lub krótki (S-short) region cytoplazmatyczny (Kuśnierczyk 2006; Pende i in., 2019). Cząsteczki z długim regionem cytoplazmatycznym (KIR2DL i KIR3DL) zawierają jedną lub dwie sekwencje ITIM (*ang. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) i przekazują sygnał hamujący pobudzenie komórki NK (Long i in., 2013). Cząsteczki z krótkim regionem cytoplazmatycznym (KIR2DS i KIR3DS) nie mają w nim motywów sygnałowych. Przekazują one sygnał aktywujący komórki NK poprzez wiązanie z wewnątrzkomórkowym białkiem adaptorowym DAP12 zawierającym dwie sekwencje ITAM (*ang. immunoreceptor tyrosine-based activatory motif*) (Carrington i in., 2003; Kuśnierczyk 2006; Jamil i in., 2011; Carrillo-Bustamante i in., 2015). Na rycinie 2 przedstawiono strukturę i organizację cząsteczek KIR.



Rycina 2. Struktura i organizacja receptorów KIR. Na podstawie (Thielens i in., 2012).

Geny kodujące receptory KIR wchodzi w skład zlokalizowanego na chromosomie 19 (19.q13.4) kompleksu receptorów leukocytarnych LRC (*ang. leukocyte receptor complex*) i obejmują region 150 kilo par (kp) zasad (Jamil i in., 2011; Manianguou i in., 2017; Roe i in., 2017). Geny te charakteryzują się wysokim polimorfizmem i należą do najszybciej ewoluujących regionów ludzkiego genomu (Jiang i in., 2012; Beziat i in., 2016). Klaster genów KIR zawiera 17 różnych genów w tym dwa pseudogeny, co zostało przedstawione na rycinie 3.

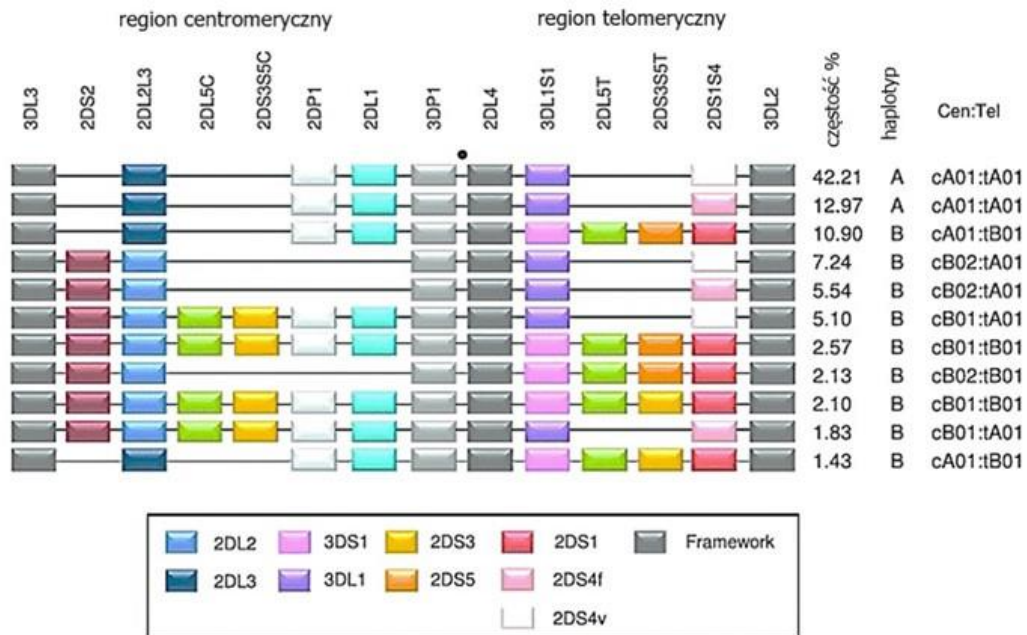


Rycina 3. Kompleks receptorów leukocytarnych LRC. Na podstawie (Diaz-Pena i in., 2020).

Geny *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* i *KIR3DL3* kodują receptory hamujące, natomiast geny *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5* i *KIR3DS1* kodują receptory aktywujące. Geny *KIR* można podzielić na dwie grupy haplotypów, haplotypy grupy A i haplotypy grupy B (Rycina 4): Haplotypy grupy A zawierają siedem genów i dwa pseudogeny. Sześć z tych genów *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2* oraz *KIR3DL3* są genami hamującymi, wyjątek stanowi *KIR2DS4*, który jest genem potencjalnie aktywującym, ale często jego funkcja jest wyłączona przez delecję. Wynikiem delecji fragmentu o długości 22 par zasad jest przesunięcie ramki odczytu powodujące utratę domeny transmembranowej. Prawdopodobnie receptor taki występuje w postaci rozpuszczalnej, wiąże ligand ale nie przekazuje sygnału (Kuśnierczyk 2006; Jiang i in., 2012; Roe i in., 2017; Colucci i in., 2017). U większości osób rasy kaukaskiej (80%) gen ten występuje w formie delecyjnej (*2DS4del*). Haplotyp A zawiera również gen *KIR2DL4*, który ma potencjał zarówno stymulujący jak i hamujący. *KIR2DL4* zawiera długi region cytoplazmatyczny z pojedynczą sekwencją ITIM oraz dodatnio naładowany aminokwas w regionie przezbłonowym, który pozwala na tworzenie kompleksu z łańcuchem FcεRI-γ zawierającym sekwencję ITAM. Wiele haplotypów A zawiera delecyjny wariant genu *KIR2DS4* oraz nieulegający ekspresji na powierzchni komórki *KIR2DL4*. Haplotyp taki nie posiada funkcjonalnych receptorów aktywujących KIR. (Boyton i in., 2007; Kulkarni i in., 2008; Kuśnierczyk 2010; Parham 2013). Różnorodność haplotypów A jest generowana głównie przez polimorfizm alleliczny. Geny *KIR* są wysoce polimorficzne, znanych jest 977 alleli, od 16 wariantów genów *2DS3* i *2DS1* do ponad 164 alleli genu *3DL3* (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/stats>). Wszystkie inne kombinacje genów *KIR* są łączone

razem w haplotypach grupy B, które różnią się zawartością genów, liczbą kopii i allelami, na przykład *KIR3DS1* koduje receptor aktywujący i jest allelem *KIR3DL1* (Colucci i in., 2017). Ponadto, haplotypy grupy B typowo zawierają różną liczbę aktywujących receptorów spośród *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* (Jiang i in., 2012). Haplotypy mieszane zawierające regiony -A i -B są zaliczane do haplotypów B. Wszystkie dotychczas zbadane populacje ludzkie mają zarówno haplotypy A jak i B, 11 haplotypów stanowi 94% wszystkich znanych haplotypów, pozostałe 6% to haplotypy występujące z częstością poniżej 1% (Trowsdale i in., 2015; Colucci i in., 2017). W przebadanych grupach etnicznych stwierdzono występowanie haplotypu A z różną częstością. Szacuje się, że w populacjach kaukaskich haplotyp A występuje z częstością około 55%, natomiast u Japończyków z częstością 75%, a u australijskich Aborygenów tylko u 15% (Carrington i in., 2003; Middleton i in., 2010; Jiang 2012). Natomiast haplotyp B w populacji kaukaskiej obserwuje się z częstością 39% (Jiang i in., 2012; Trowsdale i in., 2015).

Każdy haplotyp posiada punkt rekombinacji, który dzieli haplotyp na regiony centromeryczny (Cen) i telomeryczny (Tel), zatem haplotypy mogą składać się z różnych kombinacji regionów Cen i Tel (A-A, A-B, B-A i B-B; Rycina 4). Regiony te wyznaczają cztery geny *KIR* (framework) występujące we wszystkich haplotypach (Hsu i in., 2002; Pende i in., 2019). Odcinek centromeryczny jest flankowany na końcu 5' przez *KIR3DL3* oraz wewnątrz przez *KIR3DP1*, podczas gdy region telomeryczny jest flankowany wewnątrz przez *KIR2DL4* oraz na końcu 3' przez *KIR3DL2* (Kulkarni i in., 2008; Robinson i in., 2013). Centromeryczne geny *2DL2* i *2DL3* są allelami wykluczającymi się wzajemnie w obrębie pojedynczego haplotypu *KIR*, podobnie jak telomeryczne geny *3DL1* i *3DS1*. Allele genu *KIR2DL5* są podzielone na dwie grupy 5A (telomeryczne) i 5B (centromeryczne), oba (lub żaden z nich) mogą występować w obrębie jednego haplotypu. Geny *KIR2DS3* i *2DS5* mogą być zakodowane zarówno w obrębie regionów centromerycznych jak i telomerycznych, ale wzajemnie wykluczają się w każdym z tych regionów (Vierra-Green i in., 2012).



Rycina 4. Częstość haplotypów genów *KIR*. Na podstawie (Jiang i in., 2012).

Różnorodność genów *KIR* przejawia się na wielu poziomach. Występują różnice w zmienności liczby kopii pomiędzy osobami i związana z tym duża różnorodność haplotypów. Stochastyczna ekspresja receptorów *KIR* na poszczególnych komórkach przyczynia się do zróżnicowanego ich repertuaru na komórce. Różne receptory *KIR* rozpoznają różne epitopy HLA o dużej zmienności genetycznej. Wszystko to powoduje ogromną różnorodność w odpowiedzi komórek NK pomiędzy osobnikami, jak również ma ważne znaczenie w chorobach (Trowsdale i in., 2015).

## 1.4.2. Ligandy KIR

Geny KIR są głównym czynnikiem wpływającym na zmienność fenotypu i funkcję komórek NK. Oprócz heterogeniczności alleli tych genów zmienność wynika również z różnorodności ligandów KIR. Ligandy zostały określone dla większości receptorów hamujących KIR, natomiast dla wielu aktywujących receptorów KIR nadal pozostają nieznane. Zestawienie znanych ligandów KIR przedstawiono w Tabeli 3 (Trowsdale i in., 2015; Guethlein i in., 2015).

Tabela 3. Receptory KIR i ich ligandy (wg. Trowsdale i in., 2015; Guethlein i in., 2015; Saunders i in., 2016; Błachowicz i in., 2016).

Receptor KIR	Ligandy HLA	Sekwencje sygnałowe
<b>2DL1</b>	Grupa C2 ( C*02, C*04, C*05, C*06)	2ITIM
<b>2DL2</b>	Grupa C1 (C*01, C*03, C*07, C*08); niektóre C2 (C*05:01, C*02:02, C*04:01); niektóre B (B*46:01, B*73:01)	2ITIM
<b>2DL3</b>	Grupa C1 (C*01, C*03, C*07, C*08); niektóre C2 (C*05:01, C*02:02); niektóre B (B*46:01, B*73:01)	2ITIM
<b>2DL4</b>	HLA-G	1 ITIM (+FcεRI-γ)
<b>2DL5 (A i B)</b>	nieznany	2 ITIM
<b>2DS1</b>	Grupa C2 ( C*02, C*04, C*05, C*06)	DAP12 (2 ITAM)
<b>2DS2</b>	nieznany	DAP12 (2 ITAM)
<b>2DS3</b>	nieznany	DAP12 (2 ITAM)
<b>2DS4</b>	niektóre A (A*11:02); niektóre C (C*05:01, C*16:01, C*02:02)	DAP12 (2 ITAM)
<b>2DS5</b>	nieznany	DAP12 (2 ITAM)
<b>3DL1</b>	niektóre B Bw4 (B*15, B*27, B*57, B*58); niektóre A Bw4 (A: A*24, A*23, A*32)	2 ITIM
<b>3DL2</b>	niektóre A (A*03, A*11)	2 ITIM
<b>3DL3</b>	nieznany	1 ITIM
<b>3DS1</b>	nieznany	DAP12 (2 ITAM)

Ligandami dla receptorów KIR są antygeny głównego układu zgodności tkankowej (HLA) klasy I (HLA-A, B i C), które są skrajnie polimorficzne. Allele locus HLA-C można podzielić na podstawie dimorfizmu w pozycji 80 w helisie α1 łańcucha ciężkiego na dwie grupy. Grupa 1 (HLA-C1) ma obecny aminokwas asparaginę w pozycji 80, podczas gdy grupa 2 (HLA-C2) zawiera w tej pozycji lizynę (Kulkarni i in., 2008; Middleton i in., 2010; Jamil i in., 2011). HLA-C grupa 1 jest ligandem dla hamujących cząsteczek KIR2DL2

i KIR2DL3, natomiast hamująca cząsteczka KIR2DL1 jest wiązana przez grupę HLA-C2. Ostatnie badania wykazują, że cząsteczka KIR2DL1 oddziałuje tylko z grupą HLA-C2, natomiast cząsteczki KIR2DL2 i KIR2DL3 mogą słabiej wiązać się z niektórymi allelami z grupy HLA-C2 (Trowsdale i in., 2015; Guethlein i in., 2015). Słabsza siła oddziaływania KIR2DL2 lub KIR2DL3 z C1 niż KIR2DL1 z C2, związana jest z ilością tworzących się wiązań wodorowych. W pierwszym przypadku tworzy się tylko jedno wiązanie wodorowe, natomiast w drugim trzy wiązania (Kuśnierczyk 2006). Ligandem dla KIR3DL1 są cząsteczki HLA-B oraz niektóre HLA-A zawierające motyw Bw4 (Kulkarni i in., 2008; Middleton i in., 2010). Dymorfizm w pozycji 80 epitopu Bw4 wpływa na oddziaływanie z podtypami KIR3DL1. Allele HLA-B Bw4 zawierające izoleucynę w pozycji 80 (Bw4-80I) ogólnie wykazują silniejsze hamowanie komórek NK przez KIR3DL1, podczas gdy epitopy Bw4 z treoniną w pozycji 80 (Bw4-80T) są lepszymi ligandami dla pewnych podtypów KIR3DL1 (Kulkarni i in., 2008). Allele HLA-A3 i HLA-A11 są ligandami dla receptora KIR3DL2. Ligandem dla receptora KIR2DL4 jest nieklasyczna cząsteczka HLA-G, której ekspresję wykazano jedynie na komórkach trofoblastu (Kuśnierczyk 2010; Pende i in., 2019), grasiczych komórkach śródbłonna i rogówce (Kulkarni i in., 2008). Co prawda badacze australijscy (Le Page i in., 2014) zakwestionowali wiązanie HLA-G przez KIR2DL4, lecz ogromna większość uczonych pozostaje przy HLA-G jako ligandzie dla tego receptora. Aktywujące receptory KIR2DS1, KIR2DS2 i KIR3DS1 w swoich domenach zewnątrzkomórkowych wykazują wysoką homologię do ich odpowiedników wśród receptorów hamujących (KIR2DL1, 2DL2/2DL3 i 3DL1), ale mają znacznie niższe powinowactwo lub w ogóle nie wykazują powinowactwa do tych samych ligandów. Oddziaływanie HLA-C2 z KIR2DS1 jest o wiele słabsze niż z KIR2DL1, jednakże ma ono znaczenie funkcjonalne w przeciwieństwie do oddziaływania KIR2DS2 z HLA-C1, które nie zostało jeszcze jednoznacznie określone (Kulkarni i in., 2008; Stewart i in., 2005). Ponad 95% podobieństwo zewnątrzkomórkowych domen KIR3DS1 i KIR3DL1 wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na możliwość oddziaływania z tym samym ligandem. Jednakże pomimo licznych badań genetycznych i funkcjonalnych nie ma bezpośrednich dowodów potwierdzających oddziaływanie KIR3DS1 z ligandami HLA-Bw4. Uważa się również, że KIR2DS4 prawdopodobnie oddziałuje z allelami HLA-Cw4 i z ligandem nie-HLA występującym na komórkach czerniaka (Kulkarni i in., 2008). Dla pozostałych receptorów KIR2DL5, KIR2DS5, KIR2DS3 ligandy nie zostały jeszcze poznane.

## 1.5. Antygeny HLA locus C (HLA-C)

### 1.5.1. Budowa cząsteczki HLA locus C

Antygeny HLA locus C zidentyfikowano w 1975 roku. HLA-C jest trzecią klasyczną cząsteczką MHC klasy I, pozostałe dwie klasyczne cząsteczki klasy I to HLA-A i -B; istnieją też nieklasyczne cząsteczki: HLA-E, -F i -G (Trowsdale i in., 2013). Główny układ zgodności tkankowej (MHC-*major histocompatibility complex*) po raz pierwszy opisał George Snell podczas badań prowadzonych nad odrzucaniem przeszczepów tkanek u myszy (Vandiedonck i in., 2009). Dopasowywanie cząsteczek HLA między dawcą a biorcą jest obecnie powszechną praktyką dla powodzenia przeszczepów u ludzi. Jednak biologiczna rola cząsteczek HLA wykracza daleko poza transplantację. Cząsteczki te odgrywają istotną rolę w wiązaniu peptydów i ich prezentacji na powierzchni komórki w celu rozpoznania przez odpowiednie komórki układu immunologicznego i tym samym w aktywacji odpowiedzi immunologicznej (Bertaina i in., 2018). Cząsteczki HLA klasy I występują na powierzchni komórek jądrzastych. Wszystkie cząsteczki HLA klasy I mają podobną strukturę - są glikoproteinami składającymi się z dwóch łańcuchów: lekkiego i ciężkiego. Trójdomenowy ( $\alpha$ 1-3) łańcuch ciężki tworzy heterodimer z niezmienną cząsteczką beta2-mikroglobuliny ( $\beta$ 2M), czyli łańcuchem lekkim. Domena  $\alpha$ 3 łańcucha ciężkiego jest również niezmienna. Przypomina ona budowę domeny części stałych łańcuchów ciężkich immunoglobulin i znajduje się najbliżej błony komórkowej (Gołąb i in., 2017). Każda domena  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 zawiera helisę  $\alpha$  i cztery pasma  $\beta$ . Dwie helisy  $\alpha$  wraz z pasmami  $\beta$  tworzą rowek wiążący peptydy (antygeny) prezentowane limfocytom T (Augusto i in., 2015). W rowku znajdują się kieszonki, w które wchodzi łańcuchy boczne aminokwasów prezentowanego przez cząsteczkę HLA peptydu (Bertaina i in., 2018; Gołąb i in., 2017). Kieszenie mogą wykazywać różnice w rozmiarze, kształcie i funkcji. Niektóre z nich mają powinowactwo do grupy łańcuchów bocznych, podczas gdy inne mają powinowactwo tylko do jednego łańcucha bocznego. Zatem allele HLA różnią się od siebie substytucjami w resztach aminokwasowych, co przekłada się na specyficzną strukturę kieszeni wiążących peptyd, a w konsekwencji na różnicę w odpowiedzi immunologicznej u poszczególnych osób (Bertaina i in., 2018). Struktura krystalograficzna cząsteczek HLA-C jest o wiele słabiej zbadana w porównaniu do cząsteczek HLA-A i -B. Ekspresja cząsteczek HLA-C jest dziesięciokrotnie mniejsza niż pozostałych cząsteczek HLA (Gołąb i in., 2017).

### 1.5.2. Organizacja genów *MHC*

Kompleks *MHC* to grupa ponad 260 genów układu HLA zlokalizowana na chromosomie 6p.21.3 i zawierająca około 4 miliony par zasad (Bertaina i in., 2018; Trowsdale i in., 2013). Wyjątkiem jest  $\beta$ 2-mikroglobulina kodowana przez pojedynczy gen na chromosomie 15 i nie jest zaliczana do *MHC* mimo tworzenia kompleksu z łańcuchem ciężkim HLA klasy I (Kuśnierczyk 1992; Gołąb i in., 2017). Region klasy I zawiera geny kodujące klasyczne cząsteczki klasy I (HLA-A, -B i -C) jak i nieklasyczne cząsteczki klasy I (HLA-E, -F, -G). Obszar ten o długości 1,8 miliona par zasad znajduje się na telomerycznym końcu kompleksu *MHC* (Shiina i in., 1999). Klasyczne geny HLA stanowią najbardziej polimorficzny obszar ludzkiego genomu, opisano tysiące alleli w każdym locus. Dane dotyczące liczby alleli w poszczególnych loci HLA klasy I przedstawiono w tabeli 4 (Robinson i in., 2015).

Tabela 4. Zmienność antygenów HLA klasy I.

Geny	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-E	HLA-F	HLA-G
Allele	6,082	7,255	<b>5,842</b>	191	44	78
Białko	3,794	4,648	<b>3,503</b>	73	6	21
Allele nie podlegające ekspresji	311	250	<b>255</b>	5	0	4

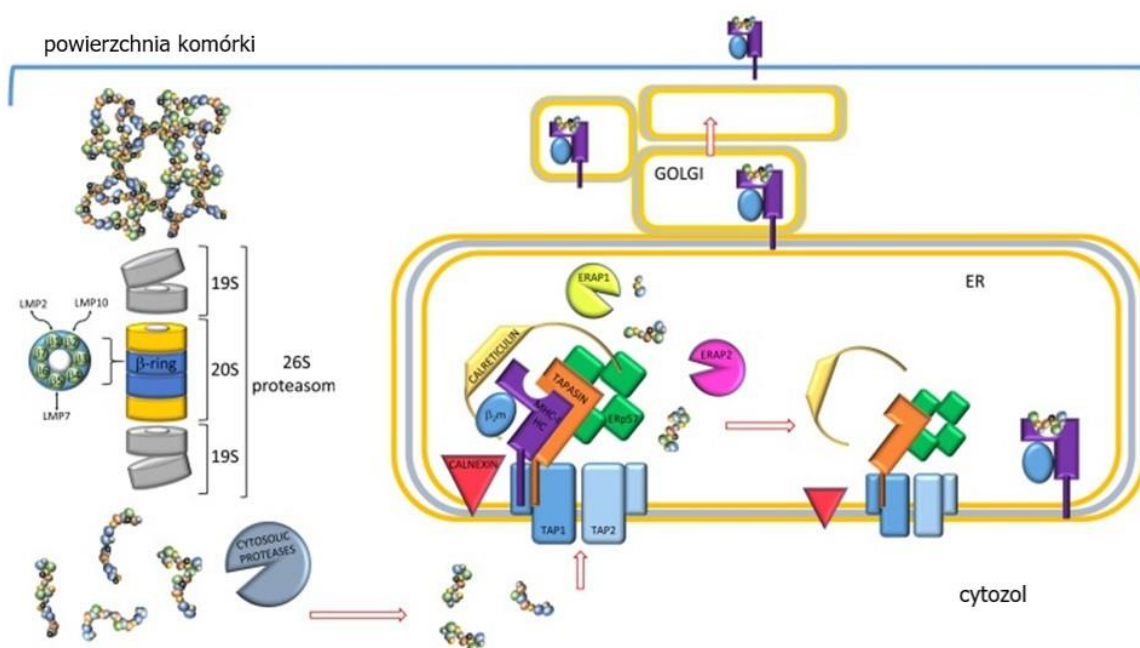
Dane z bazy danych IPD-IMGT/HLA na dzień 20 maja 2020 r. (Robinson i in., 2015, 2016)

Z układem zgodności tkankowej związane jest zjawisko niezrównoważenia sprzężeń (LD, *linkage disequilibrium*) polegające na częstszym występowaniu różnych loci razem, w blokach zwanych haplotypami, niż wynikałoby to z przypadkowego i niezależnego ich dziedziczenia. Takie kombinacje alleli umiejscowione na jednym chromosomie i dziedziczone *en bloc* różnią się pomiędzy grupami etnicznymi (Bertaina i in., 2018).

Obecność cząsteczek HLA klasy I na powierzchni komórki i skuteczna prezentacja antygenów w postaci peptydów związanych przez HLA klasy I zależy od działania białek wchodzących w skład tzw. maszyny prezentacji antygeny (APM).



## 1.6. Maszyna prezentacji antygenów-APM (*antigen-presenting machinery*)



Rycina 5. Schemat prezentacji antygenów przez cząsteczki MHC klasy I.  
Na podstawie (D'Alicandro i in., 2019).

Prezentacja antygenów przez cząsteczki MHC klasy I polega na związaniu peptydów i przetransportowaniu ich na powierzchnię błony komórkowej, gdzie są rozpoznawane przez limfocyty T CD8<sup>+</sup>. Peptydy wiązane przez HLA klasy I są wytwarzane przez maszynę prezentacji antygenów (APM) złożoną z wielu elementów (Rycina 5), jednym z nich jest proteasom. Proteasom jest multimerycznym kompleksem enzymatycznym występującym zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym, którego rolą jest degradacja białek do peptydów. W czasie odpowiedzi immunologicznej pod wpływem cytokin IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  powstają nowe podjednostki o zwiększonej aktywności LMP2, LMP7 i LMP10 (*LMP-low molecular protein*), które zastępują odpowiadające im klasyczne składniki proteasomu. Taki proteasom nazywany jest immunoproteasomem (Leone i in., 2013). Peptydy wytworzone w proteasomie są transportowane z cytoplazmy do siateczki śródplazmatycznej przez transporter zbudowany z białek transportowych TAP (*Transporter associated with Antigen Processing 1 and 2*; TAP1;TAP2). Cząsteczki TAP1 i TAP2 zawierają hydrofobową domenę transmembranową i cytozolową domenę wiążącą nukleotydy (dostarczające energię potrzebną do transportu peptydów) i tworzą kanał w błonie siateczki śródplazmatycznej. Białka TAP transportują najskuteczniej peptydy o określonej długości (8 do 10 aminokwasów) optymalnej dla wiązania się z cząsteczkami MHC klasy I. Dłuższe peptydy trafiają do siateczki śródplazmatycznej, gdzie są przycinane na N-końcu

przez aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP (*ang. endoplasmatic reticulum aminipeptidase 1 and 2*; ERAP1, ERAP2) lub z powrotem transportowane do cytoplazmy, gdzie ulegają degradacji. Aminopeptydazy ERAP1 i ERAP2 przycinają peptydy do długości 8-10 aminokwasów, które są wiązane z wyższym powinowactwem przez cząsteczki MHC klasy I (Ritz i in., 2001; Leone i in., 2013; Herman i in., 2015; Reeves i in., 2018). Skuteczność prezentacji antygenów na powierzchni komórki jest wynikiem działania białek wchodzących w skład APM, natomiast ich aktywność uzależniona jest od polimorfizmu genów kodujących te białka.

### **1.6.1. Wybrane cząsteczki maszynarii prezentacji antygeny (AMP):**

#### **LMP2 i LMP7**

Cząsteczki LMP 2 i LMP7 (*low molecular protein 2 i 7*; LMP2 i LMP7), to białka o małej masie cząsteczkowej, które są komponentami immunoproteasomu. Wszystkie komórki zawierają standardowe proteasomy, czyli złożone kompleksy enzymatyczne zależne od ATP, zawierające kilka różnych proteaz zaangażowanych w degradację uszkodzonych lub wadliwie pofałdowanych białek cytozolowych, a także odgrywających główną rolę w homeostazie białek komórkowych oraz w regulacji procesów komórkowych (Brooks i in., 2000; Mandal i in., 2017). Konstytutywne składniki proteasomu w trakcie odpowiedzi immunologicznej pod wpływem indukcji cytokinami zostają zastąpione przez katalityczne białka proteasomu (LMP2, LMP7 i LMP10), które tną białka na peptydy wiązane z większym powinowactwem przez cząsteczki MHC klasy I (Yewdell i in., 1999; Ebstein i in., 2012; Basler i in., 2013; Kimura i in., 2015).

Geny *LMP2* i *LMP7* zostały odkryte w latach 80-tych przez Monaco and McDevitta. Geny te umiejscowione są na chromosomie 6p21.32 w obszarze MHC klasy II pomiędzy genami *TAP1* i *TAP2*. Gen *LMP2* zajmuje obszar 2300 par zasad i zawiera sześć eksonów o identycznej długości oraz dwukierunkowy region promotorowy wspólny z genem *TAP1*. Oba geny są rozbieżnie transkrybowane z centralnego regionu promotorowego o długości 539 zasad. Promotor ten nie zawiera kasety TATA, ale kilka kaset GC, które są prawdopodobnymi miejscami startu transkrypcji. Region promotora zawiera również miejsca wiązania dla wielu czynników transkrypcyjnych, w tym interferonową sekwencję konsensusową-2 i sekwencję aktywowaną przez IFN- $\gamma$ , które wiążą się z przekaźnikami sygnału i aktywatorami transkrypcji-1 (STAT-1) oraz z interferonowym czynnikiem

regulacyjnym 1 (IRF-1). Dimery Stat-1/IRF-1 są głównymi czynnikami transkrypcyjnymi uczestniczącymi w transdukcji sygnałów IFN- $\gamma$ . Natomiast gen *LMP7* składa się z siedmiu eksonów. Ekson pierwszy zawiera dwa kodony stop, ich obecność skutkuje wytwarzaniem dwóch różnych izoform produktu tego genu. Region promotorowy genu *LMP7* zawiera kasetę TATA, dwa regiony bogate w pary GC oraz miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych podobnych jak w przypadku genu *LMP2*. Ekspresja genu *LMP2* jak i genu *LMP7* jest silnie stymulowana przez IFN- $\gamma$  (Kenneth i in., 1995; Ferrington i in., 2012; Saida i in., 2014). Polimorfizmy w genach *LMP2* i *LMP7* oddziałują na proteosomalną aktywność, przez co wpływają na wytwarzanie oraz na prezentację różnych epitopów limfocytom T, a tym samym na odpowiedź immunologiczną. Liczne badania wykazały, że polimorfizm w genie *LMP2* (LMP2-60), zamiana argininy na cysteinę w pozycji 60 oraz polimorfizm w genie *LMP7* (LMP7-145), czyli zamiana glicyny na lizynę w pozycji 145 są odpowiedzialne za zmianę funkcjonalną, która powoduje mniejszą zdolność tych cząsteczek do przetwarzania antygeny. Warianty genetyczne genów *LMP2* i *LMP7* są związane z występowaniem, rozwojem oraz przebiegiem wielu chorób wirusowych, chorób autoimmunologicznych, jak i nowotworów złośliwych (Yang i in., 2017; Mandal i in., 2017).

## TAP1 i TAP2

Białko transportowe TAP, strukturalnie jest heterodimerem złożonym z podjednostek TAP1 i TAP2 (*Transporter associated with Antigen Processing 1 and 2*; TAP1, TAP2). Cząsteczki TAP1 i TAP2 odgrywają istotną rolę w dostarczaniu peptydów odpowiednich dla cząsteczek HLA klasy I. Wykazują wysokie powinowactwo do niektórych sekwencji aminokwasowych i transportują najbardziej wydajnie peptydy o długości 8-16 aminokwasów (Ritz i in., 2001; Lankat-Buttgereit i in., 2002). Ocenia się, że tylko około 20%, ze wszystkich peptydów powstających w komórce w wyniku degradacji białek, ma zdolność łączenia się z białkiem transportowym TAP (Wiktorowicz i in., 2018). Wykazano także, że osoby z defektem genów *TAP* jak również komórki nowotworowe i zainfekowane z zablokowanym transportem przez cząsteczki TAP, mają zdolność prezentowania peptydów poprzez niezależne od transportera TAP drogi przetwarzania antygeny (Lorente i in., 2011; 2012; Geng i in., 2018).

Geny *TAP1* i *TAP2* zlokalizowane są w regionie MHC klasy II, na krótkim ramieniu chromosomu 6 w pozycji 6p21.32. Każdy z tych genów zajmuje obszar 8-12 tysięcy par zasad

i zawiera 11 eksonów, z czego osiem eksonów ma taką samą długość (Ritz i in., 2001; Lankat-Buttgereit i in., 2002; Naderi i in., 2016; Herman i in., 2015) oraz pozostałe trzy eksony (ekson 1, 9 i 11) różniące się długością odpowiednio 100, 3 i 78 par zasad (Lankat-Buttgereit i in., 2002). Częsteczki TAP są w około 35% homologiczne na poziomie białka (Ritz 2001, Lankat-Buttgereit 2002). Homologia ta jest skoncentrowana w regionach kodowanych przez eksony 8 i 10, które kodują domeny wiążące ATP (Elliott 1997). Geny *TAP1* i *TAP2* kodują białka należące do nadrodziny transporterów błonowych ABC, czyli białek zawierających kasetę ATP i od 6 do 8 domen transbłonowych, które wykorzystują energię powstałą z hydrolizy ATP do transportu substratów przez błonę komórkową (Hermann i in., 2015; Eggenesperger i in., 2015). Region promotorowy genów *TAP* nie zawiera kasyety TATA oraz CAAT, ale zawiera elementy bogate w GC, które są miejscami wiązania Sp1 (128 nukleotydów powyżej kodonu startu translacji dla *TAP1* i 79 nukleotydów powyżej w przypadku *TAP2*). Gen *TAP1* zawiera wspólny z genem *LMP2* dwukierunkowy region promotorowy o długości 593 par zasad (Lankat-Buttgereit i in., 1999; 2002; Ritz i in., 2001). Promotor *TAP1/LMP2* zawiera pojedyncze miejsce wiązania czynnika NFκB dla transkrypcji indukowanej TNFα przez NFκB (Ritz i in., 2001; Lankat-Buttgereit i in., 2002) oraz czynników transkrypcyjnych z rodziny interferonowych czynników regulatorowych IRF (*interferon regulatory factors*): IRF1 i IRF2 oraz białka wiążące sekwencje konsensusowe IFN (Arons i in., 2001; Brucet i in., 2004). W odróżnieniu od promotora genu *TAP1*, promotor genu *TAP2* nie został jeszcze szczegółowo scharakteryzowany (Ritz i in., 2001). Delecje i mutacje w genach *TAP* w znaczny sposób wpływają na transport peptydów do siateczki śródplazmatycznej. Każdy defekt upośledzający transport peptydów powoduje zmniejszenie ekspresji MHC na powierzchni komórek i osłabia zdolność komórek do prezentacji antygenów cytotoksycznym limfocytom T (Gadola i in., 2000). Mutacje w genach *TAP* są to najczęściej mutacje zmieniające ramkę odczytu, na przykład delecja w genie *TAP2* w pozycji 326 wprowadza przedwczesny kodon stop, natomiast mutacja punktowa w pozycji 658 skutkuje zmianą kodonu argininy (CGA) na kodon stop TGA (Armandola i in., 1996; Matamoros i in., 2001; Herman i in., 2015). Zaburzenia w ekspresji cząsteczek HLA klasy I i II określa się nazwą zespołu nagich limfocytów (BLS - *bare lymphocyte syndrome*) (Kelly i in., 2019). Gen *TAP1* jest wysoce konserwatywny, charakteryzuje się niewielką zmiennością genetyczną (Lankat-Buttgereit i in., 1999; 2002). Po raz pierwszy odkryto polimorfizm genu *TAP1* we wczesnych latach 90. Warianty genetyczne genu *TAP* (1 i 2) mogą modyfikować strukturę molekularną,

przez co wpływają na proces selekcji i transportu peptydu antygenowego (Lankat-Buttgereit i in., 1999; 2002; Naderi i in., 2016; Praest i in., 2018). Liczne doniesienia pozwoliły na określenie dwóch głównych miejsc polimorficznych w genie *TAP1*: zamiana izoleucyny na walinę w pozycji 333 oraz zamiana kwasu asparaginowego w glicynę w pozycji 637. Polimorfizm w pozycji 637 znajduje się w domenie ATP-azy, glicyna w tej pozycji może wywoływać dużą zmianę konformacyjną powodującą zaburzenie funkcji ATP-azy w cząsteczce TAP1 (Vambutas i in., 2004). Najczęściej badane warianty polimorficzne w genie *TAP2* to zamiana waliny na izoleucynę w pozycji 379, zamiana alaniny na treoninę w pozycji 565 i argininy na cysteinę w pozycji 651 oraz treoniny na alaninę w pozycji 665 (Kim i in., 2007; Praest i in., 2018). Warianty te mają bardzo słaby albo nie mają żadnego wpływu na aktywność transportu kompleksu TAP. Wykazano związek między niektórymi wariantami genetycznymi (V379I, R651C) a podwyższonym poziomem ekspresji TAP, prawdopodobnie wpływają one na stabilność cząsteczki TAP. Nie wykazano jednak, aby wyższy lub niższy poziom ekspresji bezpośrednio wpływał na aktywność transportu. Ponadto zmienność ekspresji białek TAP (1 i 2) nie koreluje z aktywnością cząsteczki TAP *in vitro* (Praest i in., 2018).

## **ERAP1 i ERAP2**

Aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej ERAP1 i ERAP2 są to dwie homologiczne zależne od cynku metaloproteazy należące do podrodziny oksytocynaz M1 (Cifaldi i in., 2012; Stratikos i in., 2013; Agrawal i in., 2014; Lopez de Castro i in., 2016; Saule i in., 2020). Enzymy ERAP odgrywają istotną rolę w wielu procesach biologicznych, ale główną ich funkcją jest przycinanie N-końcowych fragmentów peptydów prezentowanych w kontekście MHC klasy I limfocytom CD8<sup>+</sup>. ERAP1 zaangażowany jest ponadto w modulację odpowiedzi immunologicznej poprzez odcinanie receptorów cytokinowych na powierzchni komórki, takich jak receptor typu 1 dla TNF (*ang. type 1 tumor necrosis factor receptor*, TNF-R1), podjednostka  $\alpha$  receptora dla interleukiny 6 (*ang. interleukin 6 receptor  $\alpha$ , IL-6Ra*), receptor typu 2 dla interleukiny 1 (*ang. type 2 interleukin 1 receptor receptor IL-1RII*) oraz podjednostka  $\beta$  dla receptora interleukiny 1 (*ang. interleukin-1 receptor type1, IL-1  $\beta$  R1*). Makrofagi stymulowane IFN- $\gamma$  i lipopolisacharydem również wydzielają ERAP1, co powoduje zwiększenie aktywności fagocytowej makrofagów. Wykazano także, że cząsteczki ERAP1 i ERAP2 wpływają na układ renina-angiotensyna,

przez co odgrywają ważną rolę w regulacji ciśnienia krwi (Cifaldi i in., 2012; Compagnone i in., 2019). Ponadto ERAP1 kontroluje neoangiogenezę poprzez regulację proliferacji i migracji komórek endotelialnych (Stratikos i in., 2013; Goto i in., 2018; Reeves i in., 2018; Saulle i in., 2020; Tsujimoto i in., 2020). ERAP1 występuje w dwóch konformacjach: zamkniętej - aktywnej enzymatycznie oraz otwartej - z mniejszą aktywnością, za to zdolnej do przyłączenia substratu. ERAP2 wykazuje znaczące różnice w specyficzności jak i w wiązaniu substratu w stosunku do ERAP1. ERAP1 przycina wszystkie peptydy z wyjątkiem tych zawierających prolinę, aczkolwiek wykazano większą wydajność i preferencje tego enzymu do N - końcowych reszt hydrofobowych. Natomiast aminopeptydaza ERAP2 ma preferencję względem dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych, szczególnie argininy (Kochan i in., 2011; Stratikos i in., 2013; Lopez de Castro i in., 2016).

Geny *ERAP1* i *ERAP2* zlokalizowane są na długim ramieniu chromosomu 5q15 i kodują w około 50% identyczną sekwencję aminokwasową oraz prawdopodobnie mają wspólne czynniki regulatorowe (Cifaldi i in., 2012; Stratikos i in., 2013; Paladini i in., 2018; Compagnone i in., 2019). Region promotorowy genów *ERAP1* i *ERAP2* nie zawiera kasety TATA oraz CAAT, natomiast posiada potencjalne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych takich jak: MZF1, IRF1/2, C/EBP $\alpha/\beta$ , NF $\kappa$ B, IRF-E, ETS; sugeruje to złożoną regulację aktywności transkrypcyjnej (Hattori i in., 2001; Tanioka i in., 2005). Transkrypcja obu genów *ERAP* jest regulowana przez IFN- $\gamma$ . Wykazano, że ekspresja genu *ERAP2* jest regulowana przez interferonowy czynnik regulacyjny 1 (IRF-1) jak również przez czynnik transkrypcyjny PU.1 należący do rodziny białek ETS (Hattori i in., 2013). Czynniki IRF-1 i IRF-2 wiążąc się z regionem promotorowym genu *ERAP1* indukują ekspresję poprzez regulację konstytutywną i wywołaną przez IFN (Compagnone i in., 2019). Gen *ERAP1* obejmuje obszar ponad 47 tysięcy par zasad i składa się z 20 eksonów, natomiast gen *ERAP2* obejmuje region ponad 41 tysięcy par zasad i zbudowany jest z 19 eksonów (Hattori i in., 2013; Saulle i in., 2020). ERAP1 występuje w dwóch formach (ERAP1-19E i ERAP1-20E) z różnymi C-końcowymi sekwencjami aminokwasowymi (białka 941 i 948 aminokwasów), które powstają w wyniku alternatywnego składowania. Ekson 19 zawiera sekwencję kodującą dla ostatnich 51 aminokwasów (ERAP1-19E) oraz kodon stop i co najmniej dwa konsensusowe sygnały poliadenylacji. Natomiast ekson 20 zawiera sekwencję kodującą dla ostatnich dziewięciu aminokwasów (ERAP1-20E), kodon stop i co najmniej dwa konsensusowe sygnały poliadenylacji. Nie wykazano różnic funkcjonalnych między formami

ERAP1-19E i ERAP1-20E (Tsujimoto i in., 2020; Saulle i in., 2020a). Podobnie transkrypty genu *ERAP2* kodują dwa białka składające się z 960 lub 532 aminokwasów. Alternatywny splicing w eksonie 10 tego genu powoduje wstawienie kodonu stop i powstanie krótszej, niekatalitycznej formy tego białka (Hattori i in., 2013). Gen *ERAP1* jest niezwykle polimorficzny. Różne niesynonimiczne polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNPs) powodują zmiany w sekwencji powstałego białka wpływając w ten sposób na aktywność enzymu i wiązanie substratu. Zamiana lizyny na argininę w pozycji 528 drastycznie zmniejsza aktywność aminopeptydazy ERAP1. Natomiast zmiana w pozycji 575 z asparagianu na asparaginę zwiększa aktywność, w przeciwieństwie do zamiany argininy na glicynę w pozycji 725. Dodatkowo oprócz bezpośredniego wpływu na aktywność enzymu ERAP1, zastąpienie lizyny arginina w pozycji 528 wpływa na różnice w poziomie ekspresji *ERAP1*. Obecność lizyny w pozycji 528 jest związana zarówno ze zwiększoną transkrypcją *ERAP1*, jak i ekspresją białka (Lopez de Castro i in., 2016). W przeciwieństwie do polimorfizmu genu *ERAP1*, polimorfizm genu *ERAP2* jest znacznie ograniczony. Z dwóch alleli kodujących zamianę lizyny na asparaginę w pozycji 392, która wpływa na aktywność tej aminopeptydazy, wariant z asparaginą w pozycji 392 nie ulega ekspresji. Spowodowane jest to występowaniem silnego sprzężenia pomiędzy tym wariantem a innymi polimorfizmami, które upośledzają ekspresję białka. Wysoka częstość występowania tego allelu i istnienie innych polimorfizmów upośledzających ekspresję *ERAP2* powoduje, że tylko około 75% osób posiada wariant z lizyną w pozycji 392 związany z ekspresją funkcjonalnej cząsteczki ERAP2 (Lopez de Castro i in., 2016; 2018; Evnouchidou i in., 2019; Kuśnierczyk i in., 2019; Tsujimoto i in., 2020).

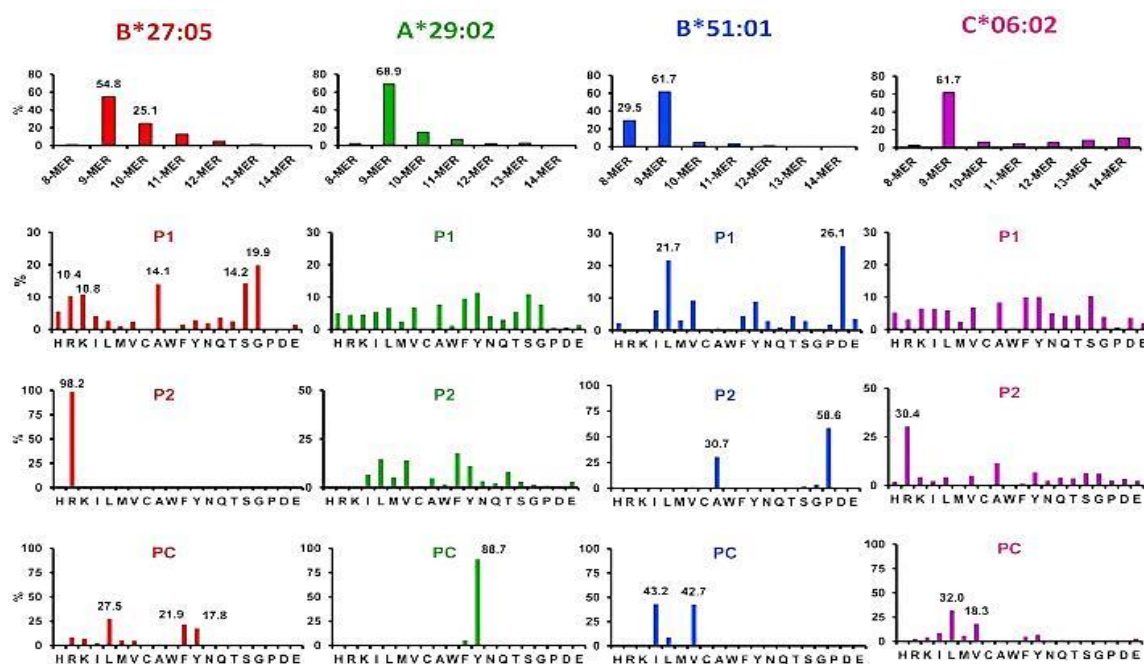
## 1.7. Aminopeptydazy ERAP i peptydomy cząsteczek HLA klasy I związane z chorobami

Związki chorób z cząsteczkami zgodności tkankowej klasy I (MHC-I) opisywane są w literaturze od kilkudziesięciu lat. Do najsilniejszych można zaliczyć związek z chorioretinopatią ptasią (HLA-A\*29:02), z zeszytniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (HLA-B\*27:05), chorobą Behçeta (HLA-B\*51:01) i łuszczycą (HLA-C\*06:02). Aminopeptydazy retikulum endoplazmatycznego (ERAP) 1 i 2 są również czynnikami ryzyka tych chorób. Enzymy te są zaangażowane w końcowe etapy przetwarzania ligandów MHC-I, dlatego też uzasadnione wydaje się założenie, że peptydy związane z MHC-I odgrywają istotną rolę w patogenezie tych chorób (Lopez de Castro i in., 2016; 2018; Hanson i in., 2019). Peptydomy cząsteczek HLA klasy I mają wiele podstawowych cech, z których najważniejsze, to:

- i) Ligandy cząsteczek MHC klasy I wykazują ograniczenia dotyczące długości z optymalną liczbą dziewięciu reszt aminokwasowych.
- ii) Peptydy wiążą się z cząsteczkami HLA klasy I w specjalnych kieszonkach zwanych miejscami wiązania peptydu (nazwane od A do F). W interakcje zaangażowane są głównie aminowe i karboksylowe końce peptydów w kieszeniach A i F, a także kilka głównych reszt kotwiczących, które znajdują się w pozycji (P)2 i na C-końcu (PC) i wiążą się odpowiednio w kieszeniach B i F.
- iii) Ponadto w interakcje zaangażowane są główne łańcuchy peptydowe i szereg dodatkowych aminokwasów łańcuchów bocznych drugorzędowych reszt kotwiczących, które są na ogół w pozycji P1, P3 i PC-2 (Lopez de Castro i in., 2018; Admon i in., 2019).

Allele HLA-A, -B i -C różnią się głównymi resztami kotwiczącymi, które zapewniają optymalne wiązanie dla poszczególnych allotypów. Polimorfizm cząsteczek MHC-I może radykalnie zmienić zarówno rozmiar, kształt, jak i polaryzację kieszeni wiążących łańcuch boczny, a w wyniku tego aminokwasowy skład peptydów wiązanych przez te cząsteczki (Lopez de Castro i in., 2016; 2018).





Rycina 6. Główne cechy peptydomów ( długość i częstość w pozycjach P1, P2 i PC) cząsteczek HLA klasy I związanych z chorobami. Na podstawie (Lopez de Castro i in., 2018).

Do najlepiej przebadanych pod względem struktury i peptydomu cząsteczek MHC należy cząsteczka HLA-B27, a szczególnie podtyp B\*27:05 związany w większości populacji z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa (ZZSK). Zbadano również peptydomy HLA-A\*29:02, HLA-B\*51:01 i HLA-C\*06:02. Na rycinie 6 pokazano, że te allele HLA różnią się długością peptydów, jakie wiążą (rzęd górny), oraz rodzajem aminokwasów preferencyjnie wiązanych w pozycji pierwszej od końca N (P1, rząd drugi od góry), pozycji drugiej (P2, rząd trzeci od góry) i pozycji C-końcowej (rzęd dolny). Jak widać, HLA-A\*29:02 i HLA-C\*06:02 wiążą głównie peptydy 9-aminokwasowe, HLA-B\*51:01 może też wiązać (choć rzadziej) peptydy 8-aminokwasowe, natomiast HLA-B\*27:05 może wiązać, obok 9-aminokwasowych, również peptydy nieco dłuższe. Istnieje duża dowolność względem rodzaju wiązanego peptydu w odniesieniu do aminokwasów N-końcowych (P1). Znacznie większa wybiórczość natomiast występuje w preferencji aminokwasu w pozycji drugiej (P2): wiązanie przez HLA-B\*27:05 wyłącznie peptydów z arginina w tej pozycji, dla HLA-B\*51:01 są to prolina i alanina, dla HLA-C\*06:02 głównie arginina, ale dopuszczalne są niektóre inne aminokwasy, wreszcie istnieje duża dowolność i brak dominującego aminokwasu dla HLA-A\*29:02. Za to HLA-A\*29:02 wiąże tylko peptydy zawierające w ostatniej, C-końcowej pozycji tyrozynę, podczas gdy pozostałe pokazane tu allele HLA wykazują nieco mniej ścisłe wymagania dla aminokwasu w tej pozycji (Rycina 6). W ostatnich latach zespół Lopez de Castro zbadał wpływ polimorfizmu ERAP1 na repertuar

peptydów wiązanych przez cząsteczki HLA-B\*27:05, HLA-A\*29:02 i HLA-B\*51:01 (nie wykonano jeszcze takich badań dla HLA-C\*06:02). Stwierdzono, że warianty ERAP1 o wysokiej aktywności powodują większą akumulację peptydów 9-aminokwasowych lub krótszych związanych przez cząsteczki HLA-B\*27:05 i HLA-A\*29:02, podczas gdy warianty ERAP1 o niższej aktywności - przeciwnie - nie nadążają z produkcją krótkich ligandów, co skutkuje większą reprezentacją peptydów 10-aminokwasowych i dłuższych. W przypadku HLA-B\*51:01 warianty ERAP1 wysoce aktywne sprzyjały wiązaniu peptydów 8-aminokwasowych z resztą proliny w pozycji 2, podczas gdy przy wariacie mniej aktywnym wiązane były raczej 9-aminokwasowe peptydy z resztą alaniny w pozycji 2. Tak więc repertuar peptydów prezentowanych przez cząsteczkę HLA klasy I limfocytom T CD8<sup>+</sup> zależy zarówno od allelu HLA, jak i od haplotypu ERAP1. Ponadto ci sami autorzy opisali też wpływ obecności lub braku ERAP2 na repertuar peptydów wiązanych przez HLA-B\*27:05 i HLA-A\*29:02 (Lopez de Castro i in., 2018; Sanz-Bravo i in., 2018).

## 2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest jedną z najczęstszych dermatoz. Patogeneza tej jednostki chorobowej nadal pozostaje niejasna, chociaż wyniki ostatnich badań podkreślają znaczenie predyspozycji genetycznych w rozwoju AZS. Niemniej jednak, poza predyspozycjami genetycznymi istotną rolę w rozwoju AZS odgrywa osobniczo uwarunkowane nieprawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego, związane z nadmierną reakcją organizmu na czynniki środowiskowe. Pomimo dość dokładnie poznanych mechanizmów immunologicznych AZS, rola komórek NK w rozwoju tej choroby jest słabo poznana. Najważniejszymi receptorami hamującymi lub pobudzającymi aktywność tych komórek są cząsteczki KIR, których ligandami są cząsteczki HLA klasy I. Obecność cząsteczek HLA klasy I na powierzchni komórki oraz skuteczna prezentacja antygenów w postaci peptydów związanych przez HLA klasy I zależy od działania białek wchodzących w skład tzw. maszyny prezentacji antygenów (APM). Polimorfizm genów APM: *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1* i *ERAP2* wpływa na aktywność kodowanych przez nie cząsteczek i w ten sposób może wpływać na skuteczność prezentacji antygenów. Polimorfizm wyżej wymienionych genów nie był szeroko badany w AZS. Nie ma również wielu doniesień na temat roli oddziaływań między genami kodującymi składniki APM w podatności na AZS oraz na temat ich wpływu na przebieg choroby. Wyniki przeprowadzonych przeszukiwań genomu (GWAS) wytypowały również cząsteczki HLA klasy I jako czynnik ryzyka wystąpienia AZS.

Powyższe przesłanki skłoniły mnie do podjęcia następujących badań:

- Porównanie częstości występowania genów *KIR* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.
- Porównanie rozkładu częstości epitopów HLA-C (C1 i C2) oraz epitopów HLA-B i HLA-A Bw4 Bw4 (ligandów dla, odpowiednio, dwu- i trójdomenowych cząsteczek KIR) w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.
- Porównanie częstości występowania alleli *HLA* locus C u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.

- Porównanie częstości występowania polimorficznych wariantów genów maszyny prezentacji antygen (AMP): *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1* i *ERAP2* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry oraz w grupie kontrolnej.
- Analiza oddziaływań pomiędzy wariantami polimorficznymi genów maszyny prezentującej antygen.
- Analiza związku genów *KIR*, *HLA*, *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1* i *ERAP2* z przebiegiem AZS i wybranymi danymi klinicznymi.
- Analiza oddziaływań pomiędzy allelami genów *KIR*, ich ligandami *HLA-C* (grupa C1 i C2) oraz allelami genów *HLA-C* i wariantami polimorficznymi genów maszyny prezentującej antygen.
- Badanie funkcji biologicznej polimorfizmów pojedynczego nukleotydu związanych z podatnością na atopowe zapalenie skóry.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Materiał do badań

Do badań molekularnych zostało użyte genomowe DNA wyizolowane z krwi obwodowej 441 pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Analizie genów *KIR* i ich ligandów poddano dwie grupy pacjentów. W pierwszej grupie przebadano 240 chorych w tym 142 kobiety i 98 mężczyzn w wieku od 2 do 62 lat, średnia wieku chorych wynosiła  $17,7 \pm 12,6$ . Grupę chorych na AZS stanowiło 87 pacjentów z Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, 81 chorych z Kliniki Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz 72 pacjentów z Oddziału Dermatologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi. Drugą badaną grupę potwierdzającą stanowiło 201 pacjentów z Zakładu Profilaktyki Zagrożeń Środowiskowych i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w tym 91 mężczyzn i 110 kobiet w wieku od 2 do 62 lat. Natomiast do genotypowania alleli *HLA-C* wykorzystano 293 próbki genomowego DNA pacjentów z AZS a badanie polimorfizmów genów maszyny prezentacji antygeny (APM) przeprowadzono dla 318 pacjentów. Charakterystykę pacjentów przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka pacjentów z atopowym zapaleniem skóry.

Parametr	Podgrupy	Grupa pierwsza		Grupa druga	
		N=240		N=201	
		N	%	N	%
Płeć	mężczyźni	98	40,8	91	45,2
	kobiety	142	59,2	110	54,8
Grupy wiekowe	2-12 lat	104	43,3	70	34,7
	13-62 lat	136	56,7	131	65,3
Choroby współistniejące	astma	72	30,0	15	7,5
	alergiczny nieżyt nosa	94	39,2	55	27,1
	zapalenie spojówek	50	20,8	bd	bd

bd - danych

Grupę kontrolną stanowiło 570 niespokrewnionych osób zdrowych, w tym 332 kobiety i 238 mężczyzn, w wieku od 19 do 83 lat, średnia wieku  $39,3 \pm 14,7$ . Osoby do grupy kontrolnej zostały zrekrutowane przez Wrocławski Uniwersytet Medyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie oraz 4 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką we Wrocławiu. Oznaczenie genów *KIR* i ich ligandów wykonano u 570 osób z grupy kontrolnej, a genotypowanie alleli *HLA-C* przeprowadzono dla 549 osób z tej grupy. Do przetestowania polimorfizmów genów maszyny prezentacji antygeny (APM) wykorzystano 335 próbek kontrolnych.

### 3.2. Ocena kliniczna chorych

Do oceny nasilenia zmian skórnych stosowano skalę **SCORAD** (ang. *Severity Scoring of Atopic Dermatitis*), która została stworzona w 1993 roku przez europejską grupę ekspertów (ang. *European Task Force on Atopic Dermatitis - ETFAD*). Oceny stanu zaawansowania choroby dokonuje się w oparciu o kryteria takie jak: nasilenie choroby, rozległość zmian skórnych oraz nasilenie objawów subiektywnych. Określenie nasilenia zmian skórnych polega na ocenie sześciu objawów: rumień, obrzęk, sączenie lub strupy, przeczosy, lichenizacja i suchość skóry, w skali 4-stopniowej - od 0 (brak zmian) do 3 (najbardziej nasilone zmiany). Subiektywne odczucia chorego takie jak: stopień nasilenia świądu i zaburzeń snu pacjent określa na skali 10-stopniowej jako średnią wartość z ostatnich 3 dni i 3 nocy. Ze względu na uzyskany wynik atopowe zapalenie skóry klasyfikuje się jako łagodne (< 25 punktów), umiarkowane (25-50 punktów) i ciężkie (> 50 punktów) (Bożek i in., 2016).

W badanej grupie średnia wartość SCORAD wynosiła  $39,7 \pm 17,9$  punktów, w zakresie od 14 do 93 punktów. Biorąc pod uwagę wskaźnik SCORAD łagodny przebieg atopowego zapalenia skóry zaobserwowano u 32,5% chorych, postać umiarkowaną u 48,8%, a ciężki przebieg AZS stwierdzono u 18,7% pacjentów. 53,75% pacjentów zachorowało w pierwszym roku życia, 32,1% pomiędzy 1 a 5 rokiem życia a 14,2% powyżej 5 roku. U większości chorych występowały choroby współistniejące takie jak astma, alergiczny nieżyt nosa czy zapalenie spojówek.

### 3.3. Odczynniki

#### Przygotowane bufony i roztwory:

- Bufor TBE (5 x stężony): 54 g TRIS, 27,5 g kwas borowy, 20 ml 0,5M EDTA o pH=8, woda miliQ do 1000 ml TBE
- Bufor obciążający stosowany do obciążania próbek w czasie elektroforezy: 40% glicerol, 0,09% oranż metylowy
- Żel agarozowy 2,5%: 2,5 g agarozy, 100 ml 1x stężony bufor TBE
- Żel agarozowy 3,5 %: 3,5 g agarozy, 100 ml 1x stężony bufor TBE

#### Zestawy i odczynniki wykorzystane w pracy:

- Zestaw Invisorb Spin Blood Midi (Strattec Molecular, Niemcy)
- Zestaw Olerup SSP® KIR HLA Ligand (Olerup SSP AB, Szwecja)
- Zestaw HLA-C Olerup PCR-SSP™ (Olerup SSP AB, Szwecja)
- Zestaw LABType® SSO klasy I C Locus (One Lambda, Inc., USA)
- Taq Man SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA)
- Taq Man Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, USA)
- Zestaw do reakcji PCR - Polimeraza AmpliTaq Gold DNA, bufor do polimerazy, 25mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, USA)
- Zestaw do reakcji PCR - Polimeraza Taq DNA, bufor do polimerazy, 50mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, USA)
- Oligonukleotydy (Genomed, Polska)
- Deoksynukleotydy (dNTP) - dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Thermo Scientific, USA)
- Marker masy – Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- Agaroz (EURx, Polska)
- Bromek etydy (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Alkohol etylowy (P.O.Ch. Gliwice, Polska)

### 3.4. Metody molekularne

#### 3.4.1. Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej

Genomowe DNA wyizolowano z krwi obwodowej metodą kolumnkową za pomocą komercyjnego zestawu Invisorb Spin Blood Midi (Strattec Molecular, Berlin, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta.

#### 3.4.2. Pomiar stężenia DNA

Stężenie i czystość wyizolowanego genomowego DNA mierzono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem aparatu Nano-Drop ND-1000 (NanoDrop Thermo Scientific). Pomiar ilości DNA odczytano przy długości fali 260 nm i wyrażono w jednostkach ng/ $\mu$ l. Dodatkowo określono jakość otrzymanego DNA poprzez pomiar stosunku absorbancji przy długości fali 260 nm/280 nm, określając stopień czystości DNA.

#### 3.4.3. Oznaczenie genów *KIR*

##### 3.4.3.1. Oznaczenie genów *KIR* metodą PCR-SSP

(*ang. sequence specific primers*)

Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem specyficznych starterów zaprojektowanych i opisanych przez Vilchesa i wsp. Sekwencje starterów dla genów *KIR* przedstawiono w tabeli 6 (Vilches i in., 2007).

Tabela 6. Startery stosowane w reakcji PCR-SSP do oznaczania genów *KIR*.

Gen <i>KIR</i>	Starter sensowny (5'-3')	Starter antysensowny (5'-3')	Wielkość produktu (pz)
<i>KIR-2DL1</i>	gttggtcagatgcatgtttgaa	cctgccaggtcttgcg	142
<i>KIR-2DL2</i>	aaaccttctctcagccca	gcctgcagagaacctaca	142
<i>KIR-2DL3</i>	agacctcaggagggtga	caggagacaacttggatca	156
<i>KIR-2DL5</i>	atctatccaggaggaggag	catagggtgagtcatggag	131
<i>KIR-2DS1</i>	tctccatcagtcgcatgag tctccatcagtcgcatgaa	ggcactgggagctgac	96
<i>KIR-2DS2</i>	tgcacagagagggaagta	ccctgcaaggtcttgca	110
<i>KIR-2DS3</i>	cttgctctgcagctct	gcatctgtaggtctct	158



## MATERIAŁY I METODY

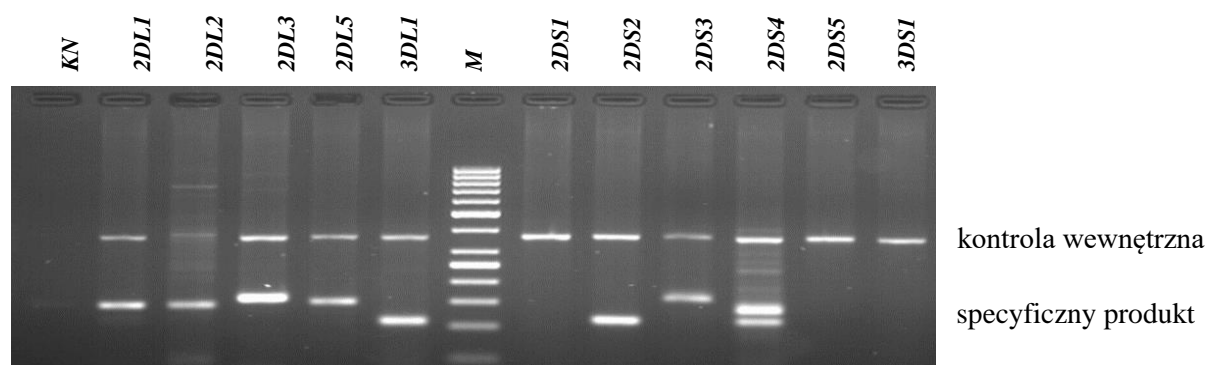
<i>KIR-2DS4</i>	ggttcaggcaggagagaat	ctggaatgttccgkgtgatg	133/111
<i>KIR-2DS5</i>	agagaggggacgtttaacc	ctgatagggggagtgagt	147
<i>KIR-3DL1</i>	ccatyggcccatgatgct tccatcgggcccatgatgtt	ccacgatgtccagggga	108
<i>KIR-3DS1</i>	catcggttccatgatgcg catcagttccatgatgcg	ccacgatgtccagggga	107
<b>Egzon 2, ludzkiej <math>\alpha</math>-1 antytrypsyny</b>	cccaccttccccctctctcc aggcaaatggg	gggcctcagtcccaacatgg ctaagaggtg	336

Amplifikacje przeprowadzono w 10  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej składającej się ze 100 ng badanego DNA, 0,4 U polimerazy Taq, standardowego buforu dostarczonego w zestawie z polimerazą, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP (Invitrogen), oraz 1  $\mu$ M starterów specyficznych dla poszczególnych genów z wyjątkiem genów *KIR2DL5* i *KIR2DS3*, w przypadku których dodano 1,5  $\mu$ M starterów oraz genu *KIR2DL1* dla którego użyto 0,5  $\mu$ M stężenie oligonukleotydów. Do wszystkich reakcji dodano również startery kontroli wewnętrznej (egzon 2 ludzkiej  $\alpha$ -1-antytrypsyny) o stężeniu 0,02  $\mu$ M. Kontrolę negatywną stanowiła mieszanina reakcyjna bez matrycy DNA. Amplifikacje przeprowadzono przy użyciu termocyklera PTC-200 (MJ Research, Wielka Brytania). Profil temperaturowy reakcji podano poniżej.

Tabela 7. Warunki amplifikacji dla genów *KIR* metoda PCR-SSP.

95°C	2 minuty	1 cykl
94°C	20 sekund	
65°C	10 sekund	10 cykli
72°C	30 sekund	
94°C	20 sekund	
61°C	10 sekund	20 cykli
72°C	30 sekund	
72°C	7 minut	1 cykl

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR przeprowadzono w 2,5 % żelu agarozowym w buforze 1 x TBE. Do wizualizacji żelu zastosowano bromek etydy, tak aby stężenie końcowe wynosiło 0,5  $\mu$ g/ml. Elektroforezę przeprowadzono przy stałym natężeniu prądu 50 mA przez 25 minut. W celu określenia długości produktów PCR, zastosowano wzorec długości DNA Ladder 50 bp (Thermo Scientific, USA). Do archiwizacji żeli wykorzystano aparat Vilber Lourmat.



Rycina.7 Wynik typowania genów *KIR* z zastosowaniem techniki PCR-SSP.

W tej próbce wykryto obecność wszystkich badanych genów z wyjątkiem *2DS1*, *2DS5* i *3DS1*.

KN - kontrola negatywna

M - marker masy

### 3.4.3.2. Oznaczanie genów *KIR* metodą multipleks PCR-SSP

Amplifikacje przeprowadzono w 10  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej składającej się z 1,5  $\mu$ l DNA o stężeniu 15 ng/ $\mu$ l, 0,15  $\mu$ l polimerazy AmpliTaq Gold oraz 1  $\mu$ l standardowego buforu dostarczonego w zestawie z polimerazą, 0,9  $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l 2,5mM dNTP, 1,45  $\mu$ l wody destylowanej i 4  $\mu$ l mieszaniny starterów. Dla każdej próbki badanego DNA przeprowadzono 4 multipleksowe reakcje PCR, w każdej z tych reakcji oznaczano 3-4 geny *KIR*. Startery otrzymano dzięki uprzejmości dr Davida Senitzera z City of Hope National Medical Center, Duarte w USA. Szczegółowy opis starterów w tabeli poniżej.

Tabela 8. Startery stosowane do oznaczenia genów *KIR* w reakcji multipleks PCR-SSP.

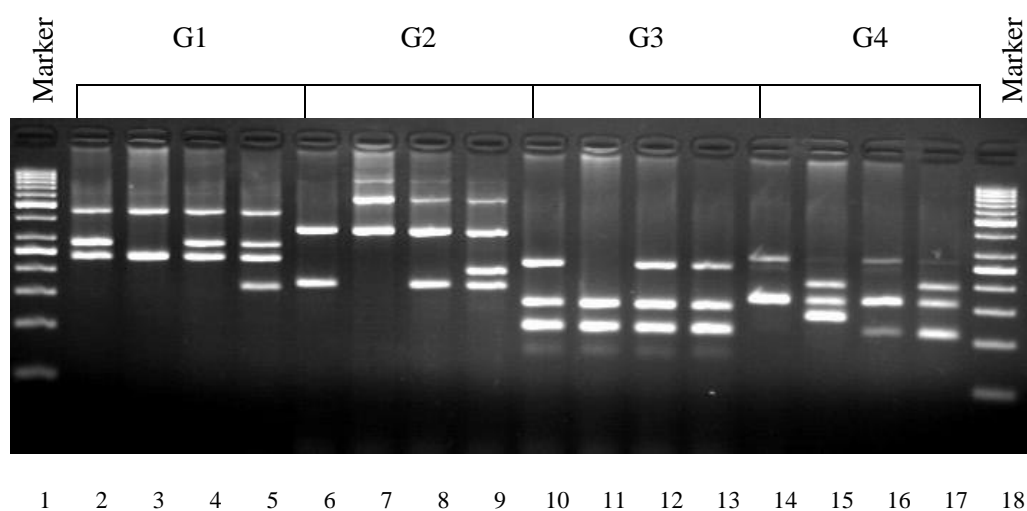
Grupa Multipleks	Geny <i>KIR</i>	Długość produktu (pz)
<b>G1</b>	<i>2DL1</i>	437
	<i>2DS3</i>	279
	<i>2DL4</i>	232
	<i>2DL2</i>	164
<b>G2</b>	<i>3DL1</i>	565
	<i>2DL3</i>	334
	<i>2DS2</i>	204
	<i>3DS1</i>	171
<b>G3</b>	<i>2DS1</i>	231
	<i>3DL2</i>	142
	<i>2DL5</i>	113
<b>G4</b>	<i>2DS5</i>	194
	<i>3DL3</i>	155
	<i>2DS4n</i>	130
	<i>2DS4d</i>	108

Amplifikacje przeprowadzono przy użyciu termocyklera PTC-200 (MJ Research, Wielka Brytania) stosując następujące warunki temperaturowe.

Tabela 9. Warunki amplifikacji dla reakcji multipleks-PCR-SSP.

95°C	10 minut	1 cykl
95°C	20 sekund	
68°C	60 sekund	3 cykle
95°C	20 sekund	
65°C	40 sekund	30 cykli
72°C	20 sekund	
72°C	5 minut	1 cykl

Do wizualizacji żelu zastosowano 3% żel agarozowy z bromkiem etydyny. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR przeprowadzono w buforze 1 x TBE przy stałym natężeniu prądu 50 mA przez 25 minut. W celu określenia długości produktów PCR, zastosowano wzorec długości DNA Ladder 50 bp (Thermo Scientific, USA). Do archiwizacji żeli wykorzystano aparat Vilber Lourmat.



Rycina 8. Wynik typowania genów KIR z zastosowaniem techniki multipleks PCR-SSP.

ścieżka 1, 18 - marker masy

ścieżka 2-5- grupa 1

ścieżka 6-9- grupa 2

ścieżka 10-13- grupa 3

ścieżka 14-17- grupa 4

## MATERIAŁY I METODY

Opis ryciny 8 . przedstawiono w tabeli poniżej:

próbka #101- ścieżka 2,6,10,14

próbka #102 - ścieżka 3, 7, 11,15

próbka #103 - ścieżka 4, 8, 12,16

próbka #104 - ścieżka 5, 9, 13,17

Tabela 10. Interpretacja wyników typowania genów KIR z zastosowaniem techniki multipleks PCR-SSP.

Grupa Multipleks	Geny <i>KIR</i>	Długość produktu (pz)	101	102	103	104
<b>1</b>	<i>2DL1</i>	437	+	+	+	+
	<i>2DL2</i>	164	-	-	-	+
	<i>2DL4</i>	232	+	+	+	+
	<i>2DS3</i>	279	+	-	+	+
<b>2</b>	<i>2DL3</i>	334	+	+	+	+
	<i>2DS2</i>	204	-	-	-	+
	<i>3DL1</i>	565	-	+	+	+
<b>3</b>	<i>3DS1</i>	171	+	-	+	+
	<i>2DL5</i>	113	+	+	+	+
	<i>2DS1</i>	231	+	-	+	+
<b>4</b>	<i>3DL2</i>	142	+	+	+	+
	<i>2DS4n</i>	130	-	+	-	-
	<i>2DS4d</i>	108	-	-	+	+
	<i>2DS5</i>	194	-	+	-	+
	<i>3DL3</i>	155	+	+	+	+

*2DS4n*-pełny; *2DS4d*-delecyjny

Od 2006 do 2019 roku nasze Laboratorium uczestniczyło w standaryzacji genotypowania *KIR* w ramach programu UCLA International KIR Exchange przeprowadzanego przez University of California Los Angeles, David Geffen School of Medicine at UCLA, UCLA Immunogenetics Center (USA).

### 3.4.4. Oznaczenie ligandów receptorów *KIR*

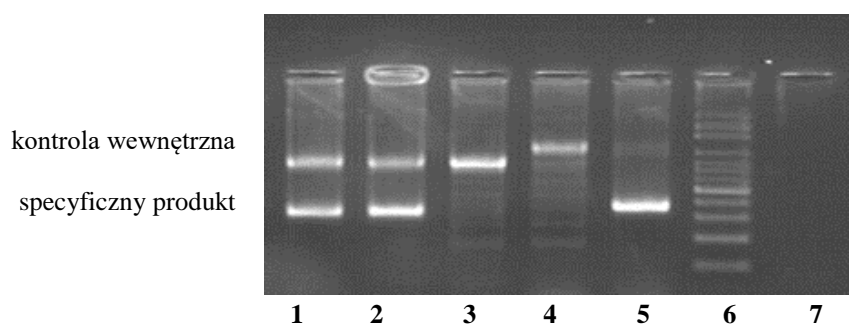
Ligandy receptorów *KIR* typowano metodą PCR-SSP przy użyciu zestawu Olerup SSP® *KIR* HLA Ligand. Każdy test zawierał liofilizowane startery ligandów receptorów *KIR* umieszczone w studzienkach:

- 1 - startery dla alleli HLA-C zawierających asparaginę w pozycji 80
- 2 - startery dla alleli HLA-C zawierających lizynę w pozycji 80
- 3 - startery dla alleli HLA-B<sup>Bw4+</sup> zawierających izoleucynę w pozycji 80
- 4 - startery dla alleli HLA-B<sup>Bw4+</sup> zawierających treoninę w pozycji 80
- 5 - startery dla alleli HLA-A<sup>Bw4+</sup>
- 6 - marker masy
- 7 - kontrola negatywna

Każda studzienka zawierała również startery kontroli wewnętrznej.

Przykład oznaczenia ligandów *KIR* przedstawiony na rycinie 9:

- obecne C1, C2 oraz HLA-A<sup>Bw4+</sup>
- nieobecne HLA-B<sup>Bw4+</sup> z izoleucyną w pozycji 80 oraz HLA-B<sup>Bw4+</sup> z treoniną w pozycji 80



Rycina 9. Wynik typowania ligandów receptorów *KIR* z zastosowaniem techniki PCR-SSP.

MATERIAŁY I METODY

Tabela 11. Specyficzność i długość produktów reakcji PCR stosowanych do oznaczania ligandów HLA receptorów KIR.

Ligandy HLA receptorów KIR	Amplifikowane allele <i>HLA-C</i>	Długość prążków specyficznych/kontrolnych
<b>1</b> <b>HLA-C<sup>Asn80</sup></b>	C*01:02:01-01:13, 01:15-01:45, 01:4701:107, 02:27:01-02:27:02, 02:65, 02:87, 03:02:01-03:06:02, 03:08-03:09, 03:11:0103:11:02, 03:13:01-03:14, 03:16-03:28, 03:30-03:44, 03:46-03:162, 03:164-03:267, 03:269-03:277N, 04:11, 04:29, 04:36, 04:55, 04:114, 04:172, 05:20, 06:11, 06:82, 06:147, 07:01:01:01-07:06, 07:08, 07:10-07:33N, 07:35-07:75, 07:77-07:294, 07:296-07:314, 07:316-07:327, 07:329N-07:405, 07:40707:409, 08:01:01-08:09, 08:11-08:63, 08:6508:115, 12:02:01-12:03:34, 12:06-12:08, 12:10:01-12:20, 12:22-12:32, 12:34-12:40, 12:42Q-12:59, 12:61-12:71, 12:73-12:134, 12:136-12:145, 12:147-12:148N, 14:02:0114:11, 14:13-14:48, 14:50-14:69, 15:07, 15:25, 15:43, 15:85, 16:01:01-16:01:19, 16:04:01, 16:04:03, 16:06-16:08, 16:1016:11, 16:13-16:18, 16:20-16:24, 16:2616:36, 16:38-16:45, 16:49-16:59, 16:6116:62, 16:64-16:68, 16:71-16:73, 16:7516:76, 16:78-16:79, 17:22	345/800 pz
<b>2</b> <b>HLA-C<sup>Lys80</sup></b>	C*01:14, 02:02:01-02:02:03, 02:02:0502:26:03, 02:28-02:40:02, 02:42-02:64, 02:66-02:86, 02:88-02:95, 03:07, 03:10, 03:15, 03:29, 03:45, 03:163, 03:268, 04:01:01:01-04:01:66, 04:03:01-04:10, 04:1204:20, 04:23-04:28, 04:30-04:35, 04:3704:54, 04:56-04:113, 04:115N-04:171, 04:173N-04:194, 05:01:01:01-05:01:31, 05:03-05:19, 05:21-05:114, 06:02:01:0106:02:01:03, 06:02:03-06:10, 06:12-06:81, 06:83-06:146, 06:148-06:149, 07:07, 07:09, 07:76:01-07:76:02, 07:315, 07:328, 07:406, 08:10, 12:04:01-12:05, 12:09, 12:21, 12:33, 12:41, 12:60, 12:72, 12:135, 12:146, 14:12, 14:49, 15:02:01:01-15:06:03, 15:08-15:13, 15:15-15:19, 15:21-15:24, 15:26-15:42, 15:44-15:84Q, 15:86-15:106, 16:02:0116:02:13, 16:09, 16:12, 16:19, 16:25, 16:37, 16:46-16:48, 16:60, 16:63, 16:69-16:70, 16:74, 16:77N, 17:01:01:01-17:21, 17:2317:28, 18:01-18:09	350/800 pz
<b>3</b> <b>HLA-B<sup>Bw4+Thr80</sup></b>	B*07:149, 08:02, 08:117, 13:01:01-13:04, 13:06-13:08, 13:10-13:12:01, 13:13-13:23, 13:25-13:38, 13:40-13:66, 13:68-13:83, 15:36, 15:89, 15:115, 15:256, 15:339, 18:09, 27:01, 37:10, 38:02:01-38:02:06, 38:0338:04, 38:08, 38:15, 38:18, 38:23, 38:29, 38:35, 38:43-38:50, 40:47, 40:96, 40:110, 40:157, 40:201, 44:02:01:01-44:02:18, 44:02:20-44:05:02, 44:05:04, 44:07-44:08, 44:10, 44:12-44:17, 44:19N-44:24, 44:2644:45, 44:47-44:49, 44:51-44:74, 44:7644:89, 44:91-44:94, 44:96-44:128, 44:130, 44:132-44:151, 44:153-44:169, 44:171N44:195N, 44:197-44:214, 47:04, 49:02, 51:54, 51:78:01-51:78:02, 52:20, 53:09, 53:11-53:13, 53:31, 53:36, 53:38, 56:07, 59:08	350/800 pz
	B*07:36, 07:38, 07:81, 07:180, 07:219, 08:03, 08:52, 08:78, 15:13:01-15:13:02, 15:16:01-15:17:03, 15:23-	350/1070 pz

<b>4</b>	<b>HLA-B<sup>Bw4+Ile80</sup></b>	15:24:02, 15:67, 15:87, 15:95, 15:157, 15:162, 15:168, 15:177, 15:196, 15:208, 15:216, 15:222, 15:230, 15:254, 15:268, 15:273, 18:67, 27:02:01-27:02:02, 27:30, 27:53, 27:57, 27:62, 27:65N, 27:75, 27:77, 27:83, 27:95, 27:102, 27:119, 27:126, 27:134, 37:34, 38:01:01-38:01:07, 38:05-38:07, 38:09-38:14, 38:16, 38:19-38:22, 38:24-38:28, 38:3038:34N, 38:36-38:42, 38:51-38:56, 40:13, 40:19, 40:109, 40:117, 40:292, 44:06, 44:18, 44:25, 44:50:01, 44:95, 48:18, 49:01:0149:01:07, 49:03-49:14, 49:16-49:35, 51:01:01:01-51:01:39, 51:01:41-51:24:05, 51:26-51:46, 51:48-51:53, 51:55-51:77, 51:79-51:185, 52:01:01:01-52:19, 52:2152:44, 53:01:01-53:02, 53:04-53:08:02, 53:10, 53:14-53:30, 53:32-53:35, 53:37, 53:39, 54:12, 56:21, 57:01:01-57:11, 57:1357:74, 58:01:01-58:02, 58:04-58:16:02, 58:18-58:29, 58:31N-58:63, 58:65-58:69, 59:01:01:01-59:07	
<b>5</b>	<b>HLA-A<sup>Bw4+</sup></b>	A*01:95, 02:81, 02:87, 02:112, 02:124, 02:129, 02:136, 03:152, 11:178, 11:190, 23:01:01-23:69, 24:02:01:01-24:03:02, 24:0524:11N, 24:13:01-24:15, 24:17-24:18, 24:2024:27, 24:29-24:43, 24:45N-24:64, 24:6624:88, 24:90N-24:99, 24:101-24:108, 24:11024:128, 24:130-24:210, 24:212-24:240N, 24:242-24:289, 24:291-24:293, 25:01:0125:30, 29:13, 31:07-31:08, 31:10, 32:01:0132:69, 68:36	370/1070 pz

Amplifikację przeprowadzono w 10 µl mieszaniny składającej się z 5 µl dejonizowanej wody 3 µl dołączonej do zestawu mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę Taq oraz 2 µl DNA o stężeniu 30 ng/ µl. Do kontroli negatywnej zamiast matrycy DNA dodano dejonizowaną wodę. Amplifikację przeprowadzono przy użyciu termocyklera PTC-200 (MJ Research, Wielka Brytania). Profil temperaturowy reakcji podano poniżej.

Tabela 12. Warunki amplifikacji dla ligandów genów *KIR*.

94°C	2 minuty	1 cykl
94°C	10 sekund	
65°C	60 sekund	10 cykli
94°C	10 sekund	
61°C	50 sekund	20 cykli
72°C	30 sekund	

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR przeprowadzono w 2 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze 0,5 x TBE. Elektroforezę przeprowadzono przy stałym napięciu prądu 10 V/cm przez 20 minut. W celu określenia długości produktów PCR,

zastosowano wzorzec długości DNA Ladder 50 bp (Thermo Scientific, USA). Żele archiwizowano przy użyciu aparatu Vilber Lourmat.

### 3.4.5. Oznaczenie polimorfizmu *HLA* locus C

#### 3.4.5.1. Oznaczenie polimorfizmu *HLA-C* metodą PCR-SSP

Genotypowanie alleli *HLA-C* przeprowadzono techniką PCR z użyciem metody specyficznej sekwencji starterów (PCR-SSP). Do tego celu wykorzystano komercyjnie dostępne zestawy Olerup SSP® *HLA-C* stosowane do typowania alleli *HLA-C* na poziomie niskiej rozdzielczości. Każdy test zawierał 24 liofilizowane startery specyficzne dla alleli *HLA-C*, które zostały zaprojektowane na podstawie danych z bazy IMGT/*HLA* oraz startery kontroli wewnętrznej. Stosowane mieszaniny starterów i długości produktów reakcji PCR przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 13. Specyficzność i długość produktów reakcji PCR stosowanych do oznaczania alleli *HLA* locus C.

Mieszanina starterów	Długość prążków specyficznych	Długość prążków kontroli	Amplifikowane allele <i>HLA-C</i>
1	155 bp	800 bp	*01:02:01-01:45, B*54:18
2	130 bp, 200 bp, 270 bp, 300 bp	800 bp	*01:10, 01:43, 02:02:01-02:02:03, 02:02:05-02:40, 02:42-02:46, 04:32, 04:77, 06:08, 07:101, 07:148, 08:31, 14:25, 15:42, 16:29, 17:01:01-01-17:06, 17:08, 18:03
3	280 bp	800 bp	*02:02:01-02:02:03, 02:02:05-02:03, 02:04 <sup>w</sup> , 02:05-02:13, 02:14 <sup>w</sup> , 02:15-02:25Q, 02:26:02-02:40, 02:42-02:46, 03:02:01-03:02:06, 03:04:01-01-03:10, 03:14-03:17, 03:19, 03:23-03:29, 03:32-03:38:02, 03:40-03:42, 03:44-03:48, 03:51, 03:54, 03:57, 03:60, 03:63-03:65, 03:70-03:74, 03:77-03:78, 03:80, 03:82, 03:84, 03:87, 03:89-03:95, 03:98, 03:100-03:101, 04:03, 04:06, 04:16, 04:80, 06:03, 07:96, 15:02:01-15:09, 15:10:02-15:11, 15:13, 15:15-15:22, 15:24-15:35, 15:37-15:45
4	170 bp, 275 bp	1070 bp	*03:02:01-03:04:06, 03:04:08-03:15, 03:17-03:40, 03:42-03:57, 03:59-03:79, 03:81-03:85, 03:87-03:93, 03:95-03:98, 03:100-03:102
5	280 bp	800 bp	*03:03:01-03:03:13, 03:11:01-03:13, 03:20N-03:22Q, 03:30-03:31, 03:43:01-03:43:02, 03:49-03:50, 03:52-03:53, 03:55-03:56, 03:58-03:59, 03:61-03:62, 03:66, 03:67 <sup>w</sup> , 03:68-03:69, 03:75-03:76, 03:79, 03:81, 03:83, 03:85-03:86, 03:88, 03:96-03:97, 03:102, 15:12
6	130 bp, 335 bp	800 bp	*02:02:01-02:02:03, 02:02:05-02:02:12, 02:02:14-02:20, 02:22-02:25Q, 02:27:01-02:38N, 02:40, 02:42-02:44, 02:46, 04:01:01-01-04:01:26, 04:03-04:15:02, 04:17-04:20, 04:23-04:41, 04:43-04:81, 05:26, 07:02:09, 07:125, 15:11, 15:36
7	390 bp	1070 bp	*05:01:01-01-05:01:15, 05:03-05:51Q, 08:10
8	130 bp, 355 bp	800 bp	*02:06, 06:02:01-01-06:02:01:02, 06:02:03-06:16N, 06:18-06:31, 06:33-06:55, 12:03:09, 12:15, 15:02:01-15:03, 15:07-15:08, 15:10:01-15:13, 15:15-15:18, 15:21, 15:26, 15:28, 15:31-15:35, 15:37-15:39, 15:41-15:45



## MATERIAŁY I METODY

<b>9</b>	245 bp, 425 bp	800 bp	*07:01:01-07:33N, 07:35-07:160
<b>10</b>	115 bp, 165 bp, 265 bp, 390 bp	800 bp	*01:43, 07:101, 07:148, 08:01:01-08:44
<b>11</b>	340 bp	1070 bp	*01:14, 02:02:01-02:02:03, 02:02:05-02:11, 02:13-02:26:02, 02:28-02:40, 02:42-02:46, 03:07, 03:15, 03:45, 04:01:01-01-04:01:26, 04:03-04:10, 04:12-04:20, 04:23-04:28, 04:30-04:35, 04:37-04:54, 04:56-04:81, 05:01:01:01-05:01:15, 05:03-05:51Q, 06:02:01:01-06:02:01:02, 06:02:03-06:10, 06:12-06:51, 06:53-06:55, 07:07, 07:09, 07:49, 07:76, 08:10, 12:04:01-12:05, 12:09, 12:21, 12:33, 12:41, 14:04, 14:12, 15:02:01-15:06:03, 15:08-15:13, 15:15-15:20, 15:22-15:24, 15:26-15:42, 15:44-15:45, 16:02:01-16:02:05, 16:09, 16:12, 16:19, 16:25, 17:01:01-01-17:08, 18:01-18:04
<b>12</b>	100 bp, 160 bp, 220 bp	800 bp	*01:04, 01:21, 05:42, 05:46, 07:101, 07:148, 08:05, 08:21, 12:02:01-12:03:01:02, 12:03:03-12:03:07, 12:03:09-12:03:14, 12:04:02-12:08, 12:10:01-12:13, 12:14:02-12:25, 12:27-12:32, 12:34-12:50, 16:15:02, 17:05
<b>13</b>	120 bp, 250 bp	800 bp	*01:21, 02:12, 04:01:01:01-04:01:26, 04:03-04:09N, 04:12-04:20, 04:23-04:35, 04:37-04:54, 04:56-04:81, 05:42, 05:46, 07:02:09, 07:125, 08:05, 08:21, 08:25, 12:02:01-12:03:03, 12:03:05-12:03:08, 12:03:10-12:03:14, 12:04:02, 12:06-12:08, 12:10:01-12:20, 12:22-12:32, 12:34-12:48, 12:50, 15:03, 15:16, 15:25, 16:01:01-16:02:05, 16:06-16:28, 16:30N-16:32, 17:01:04, B*67:02
<b>14</b>	160 bp, 220 bp	800 bp	*01:04, 01:09, 02:05, 02:17, 04:42, 06:02:01:01-06:02:01:02, 06:02:03-06:03, 06:07-06:13, 06:15-06:34, 06:36-06:39, 06:41-06:55, 07:125, 12:03:01:01-12:07, 12:11-12:13, 12:15, 12:19, 12:23, 12:25-12:26, 12:28-12:29, 12:31-12:35, 12:37-12:39N, 12:42Q-12:43, 12:45-12:48, 12:50, 14:16, 16:04:01, 16:29
<b>15</b>	130 bp, 255 bp, 555 bp	1070 bp	*02:02:01 <sup>w</sup> , 02:02:02-02:02:03, 02:02:05-02:13, 02:15-02:26:02, 02:28-02:40, 02:42-02:46, 03:07, 03:10, 03:15, 03:29, 03:45, 03:58, 03:86, 03:94, 03:99, 04:03, 04:06, 04:16, 04:37, 04:80, 05:01:01:01-05:01:15, 05:03-05:19, 05:21-05:42, 05:44-05:51Q, 06:03, 08:10, 12:04:01-12:05, 12:09, 12:21, 12:33, 12:41, 15:02:01-15:06:03, 15:08-15:13, 15:15-15:22, 15:24, 15:26-15:35, 15:37-15:42, 15:44-15:45, 16:02:01-16:02:05, 16:09, 16:12, 16:18-16:19, 16:25, 17:01:01:01-17:08
<b>16</b>	255 bp	1070 bp	*04:11, 04:29, 04:36, 04:55, 07:64, 14:02:01-14:11, 14:13-14:25
<b>17</b>	110 bp, 325 bp	1070 bp	*02:06, 03:81, 05:36, 07:123, 12:08, 12:15, 15:02:01-15:13, 15:15-15:24, 15:26-15:45, 16:20
<b>18</b>	180 bp, 210 bp, 240 bp	1070 bp	*02:13, 02:18, 02:33, 04:01:01:01-04:01:22, 04:01:24-04:01:26, 04:03-04:10, 04:12-04:20, 04:23-04:32, 04:34-04:81, 05:17, 05:25, 05:42, 06:05, 06:31, 07:02:09, 07:31, 08:01:01-08:01:03, 08:03:01-08:03:02, 08:06, 08:08-08:11, 08:14, 08:16, 08:20-08:22, 08:24, 08:26N, 08:28, 08:36N, 08:38, 08:40-08:42, 08:44, 12:14:01-12:14:02, 12:28, 14:10, 14:15, 15:12, 15:25, 16:01:01-16:02:05, 16:04:01, 16:06-16:32
<b>19</b>	225 bp, 250 bp	800 bp	*04:58, 05:23, 08:07, 12:14:01-12:14:02, 14:17, 15:25, 17:01:01:01-17:08
<b>20</b>	215 bp, 425 bp	800 bp	*01:02:01-01:03, 01:06-01:08, 01:10-01:20, 01:23-01:34, 01:37N-01:45, 03:58, 03:86, 03:94, 03:99, 04:37, 05:16, 06:05-06:06, 06:17, 06:31, 07:07, 07:09, 07:49, 07:76, 08:12, 12:09, 12:24, 14:02:01-14:05, 14:07N, 14:10-14:14, 14:17-14:25, 16:04:01, 16:29, 18:01-18:04, B*14:03
<b>21</b>	325 bp, 380 bp	1070 bp	*01:03, 01:24, 01:34, 02:22, 03:03:01-03:04:19, 03:06-03:12, 03:14, 03:18-03:24, 03:26, 03:28-03:32, 03:34, 03:37-03:59, 03:61-03:70, 03:72-03:83, 03:85, 03:87-03:88, 03:90-03:93, 03:96, 03:98, 03:100-03:102, 04:01:01:01-04:01:15, 04:01:17-04:01:26, 04:03-04:20, 04:24-04:53, 04:55-04:71, 04:73-04:81, 05:01:01:01-05:01:15, 05:03, 05:05-05:21, 05:23-05:51Q, 06:09, 06:14, 06:35, 07:10, 07:28, 07:41, 07:43, 08:01:01-08:08, 08:10, 08:12-08:44, 12:31, 12:44, 15:02:01-15:13, 15:15-15:21, 15:23-15:36, 15:38-15:45, 17:01:01:01-17:08, 18:01-18:04

## MATERIAŁY I METODY

22	135 bp	1070 bp	*03:02:01-03:17, 03:19-03:38:02, 03:40-03:66, 03:67 <sup>w</sup> , 03:68-03:98, 03:100-03:102, 04:32, 04:77, 06:03, 07:96, 14:25, 15:43, 18:03
23	160 bp, 235 bp	1070 bp	*04:42, 06:02:01:01-06:02:01:02, 06:02:03-06:02:11, 06:04-06:55, 07:01:01-07:02:07, 07:02:09-07:25, 07:27:01-07:32N, 07:35-07:38, 07:41-07:63, 07:65-07:91, 07:93-07:95, 07:97-07:138, 07:140-07:151, 07:153-07:155, 07:157-07:160, 12:16, 16:01:01-16:02:05, 16:06-16:28, 16:30N-16:32, 18:01-18:04, A*24:106, B*46:25
24	-	-	kontrola negatywna

Przygotowano mieszaninę reakcyjną składająca się ze 132,8 µl wody dejonizowanej, 54 µl buforu reakcyjnego dołączonego do zestawu oraz 2,2 µl Polimerazy Taq ( 5U/ µl, Invitrogen). 9 µl mieszaniny reakcyjnej oraz 1 µl wody dejonizowanej dodano do kontroli negatywnej. Do pozostałej mieszaniny dodano 81 µl DNA o stężeniu 30 ng/µl i rozporcjowano po 10 µl do liofilizowanych starterów. Amplifikacje przeprowadzono w objętości 10 µl mieszaniny przy użyciu termocyklera Biometra TGradient. Profil temperaturowy na poszczególnych etapach reakcji podano poniżej.

Tabela 14. Warunki amplifikacji dla alleli *HLA-C* metodą PCR-SSP.

94 <sup>0</sup> C	2 minuty	1 cykl
94 <sup>0</sup> C	10 sekund	
65 <sup>0</sup> C	60 sekund	10 cykli
94 <sup>0</sup> C	10 sekund	
61 <sup>0</sup> C	50 sekund	20 cykli
72 <sup>0</sup> C	30 sekund	

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR przeprowadzono w 2 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze 0,5 x TBE (Tris, Kwas borowy, EDTA pH 8.0). Elektroforezę przeprowadzono przy stałym napięciu prądu 8-10 V/cm przez 20 minut. Następnie oceniono prążki w świetle UV przy użyciu aparatu Vilber Lourmat. Analizę wyników przeprowadzono manualnie na podstawie dołączonej do zestawu tabeli interpretacji.

### 3.4.5.2. Oznaczenie polimorfizmu *HLA-C* metodą PCR-SSO (*ang. sequence specific oligonucleotides*)

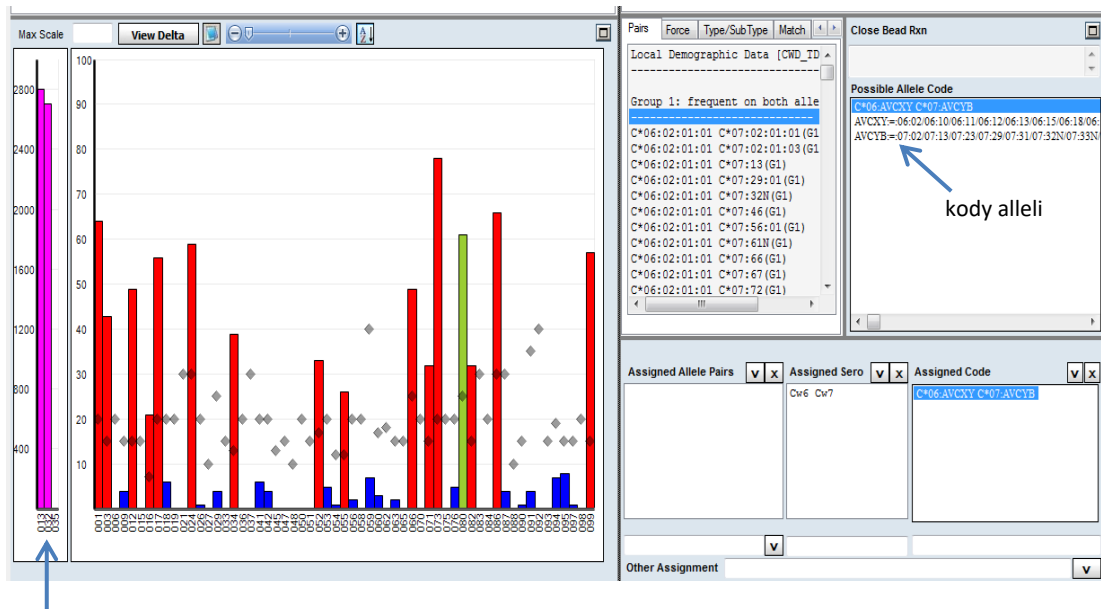
Oznaczenie alleli *HLA-C* na poziomie pośredniej rozdzielczości wykonano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z wykorzystaniem specyficznych sond oligonukleotydowych (PCR-SSO), przy użyciu zestawu LABType™ SSO klasy I C Locus (One Lambda, USA). Reakcję amplifikacji przeprowadzono w 18 µl mieszaniny reakcyjnej składającej się z dostarczonych w zestawie 4 µl biotynylowanych starterów specyficznych dla locus C oraz 13,8 µl specjalnie opracowanego buforu do amplifikacji D-mix i 0,2 µl polimerazy Taq. Standardowy profil temperaturowy amplifikacji przedstawiono w tabeli poniżej. Do amplifikacji wykorzystano aparat Applied Biosystems Veriti™.

Tabela 15. Warunki amplifikacji dla HLA locus C metodą PCR-SSO.

96°C	3 minuty	1 cykl
96°C	20 sekund	
60°C	20 sekund	5 cykli
72°C	20 sekund	
96°C	10 sekund	
60°C	15 sekund	30 cykli
72°C	20 sekund	
72°C	10 minut	1 cykl

Do 5 µl zamplifikowanej próbki DNA dodano 2,5 µl buforu do denaturacji. Po 10 minutowej denaturacji zneutralizowano próbkę dodając 5 µl buforu do neutralizacji. Zneutralizowane amplikony hybrydyzowano z 38 µl mieszaniny składającej się z 4 µl fluorescencyjnie znakowanych mikrosfer, kowalencyjnie połączonych z oligonukleotydowymi sondami specyficznymi dla alleli HLA locus C i mikrosferami kontroli ujemnej i kontroli dodatniej oraz z 34 µl buforu do hybrydyzacji w celu ułatwienia wiązania docelowego DNA z sondą. Hybrydyzację przeprowadzono w temperaturze 60°C przez 15 minut. Następnie 3-krotnie odpłukano buforem do wypłukiwania niezwiązanego DNA. W kolejnym etapie znakowano zhybrydyzowane amplikony przy użyciu streptawidyny sprzężonej z fikoerytryną (SAPE), 50 µl rozcieńczonego w buforze SAPE dodano do próbki i inkubowano w 60°C przez 5 minut. Intensywność fluorescencji odczytano przy użyciu platformy cytometrii przepływowej LABScan™ 200 i oprogramowania xPONENT wersja

3.1 (Luminex Corp.). Analizę przeprowadzono przy użyciu programu HLA Fusion wersja 3.5.6 ( One Lambda, USA).



Mikrosfery:  
 kolor różowy - kontrola dodatnia  
 kolor biały - kontrola ujemna

Rysunek 10. Przykład typowania alleli *HLA-C* metodą SSO.

**Oś X:** Mikrosfery podane w kolejności numerycznej od strony lewej do prawej.

**Oś Y:** Wartość znormalizowana (odsetek dodatnich)

**Punkty danych:** Słupki odpowiadają znormalizowanej wartości wszystkich mikrosfer w bieżącej próbce.

**Kolory słupków:** Reakcja dodatnia = kolor czerwony; reakcja ujemna = kolor niebieski; analizowana mikrosfera = kolor zielony

**Rombi** - na histogramie odpowiadają bieżącemu ustawieniu wartości odcięcia dla poszczególnych mikrosfer

W celu zweryfikowania poprawności typowania antygenów *HLA-C* zastosowanymi w badaniach technikami PCR-SSP i PCR-SSO, wykonano oznaczenie 10 próbek dwiema metodami i porównano wyniki. Nie wykazano różnic w typowaniu pomiędzy badanymi próbkami.

### 3.4.6. Oznaczenie wybranych polimorfizmów genów maszyny prezentacji antygeny (APM) metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (*ang. Real time-PCR*)

Genotypowanie 13 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (*SNPs- single nucleotide polymorphisms*) dla wybranych genów maszyny prezentacji antygeny (APM) przeprowadzono metodą dyskryminacji alleli przy użyciu sond hydrolizujących TaqMan typu MGB. Badane warianty polimorficzne genów APM przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 16. Badane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) genów *APM*.

Gen	SNP	Nr identyfikacyjny
<b><i>ERAP1</i></b>	<i>rs26653</i> (G>C; Arg127Pro)	C__794818_30
	<i>rs26618</i> (T>C; Ile276Met)	C__3056894_10
	<i>rs30187</i> (C>T; Lys528Arg)	C__3056885_10
	<i>rs27044</i> (C>G; Gln730Glu)	C__3056870_10
	<i>rs2287987</i> (C>T; Met349Val),	C__3056893_20
<b><i>ERAP2</i></b>	<i>rs2549782</i> (G>T; Lys392Asn)	C__3282749_20
	<i>rs2248374</i> (A>G; Intron 10)	C__25649529_10
<b><i>TAP1</i></b>	<i>rs1057141</i> (A>G; Ile333Val)	C__549926_20
	<i>rs1135216</i> (A>G; Asp637Gly)	C__531909_20
<b><i>TAP2</i></b>	<i>rs4148876</i> (C>T; Arg651Cys)	C__30159972_10
	<i>rs16870908</i> (C>T; Leu647Phe)	C__34171660_10
<b><i>LMP2</i></b>	<i>rs1351383</i> (A>C; Intron 1)	C__8848996_10
<b><i>LMP7</i></b>	<i>rs2071543</i> (C>A; Gln49Lys)	C__15869253_10

Do amplifikacji fragmentów DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym wykorzystano komercyjne zestawy Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA). Reakcję amplifikacji przeprowadzono w objętości 10 µl mieszaniny reakcyjnej, której skład podano poniżej.

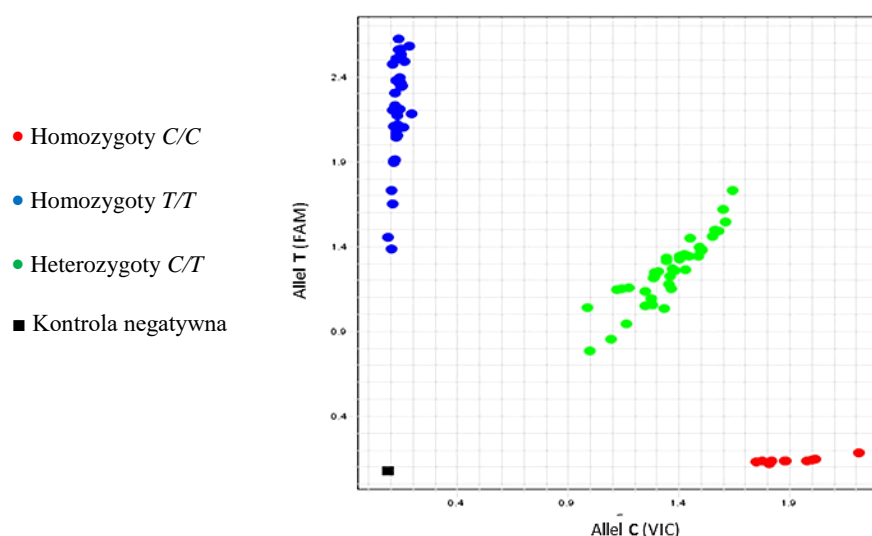
Składniki reakcji	Objętość na jedną reakcję
Mieszanina reakcyjna (Taq Man Genotyping Master Mix 2x)	5,0 $\mu$ l
Startery i sondy (Taq Man SNP Genotyping Assay 40x)	0,5 $\mu$ l
Genomowy DNA (4 ng/ $\mu$ l)	4,5 $\mu$ l
Końcowa objętość	10 $\mu$ l

Kontrolę negatywną stanowiła mieszanina reakcyjna bez matrycy DNA. Reakcję przeprowadzono w 96-dołkowych płytkach, przy użyciu aparatu ViiA7 Real Time PCR w podanych poniżej w tabeli warunkach temperaturowych.

Tabela 17. Warunki temperaturowe reakcji real-time PCR.

Aktywacja polimerazy AmpliTaq Gold,	95 <sup>0</sup> C	10 minut	1 cykl
Denaturacja	95 <sup>0</sup> C	15 sekund	40 cykli
Hybrydyzacja/Wydłużanie	60 <sup>0</sup> C	1 minuta	

Analizę dyskryminacji alleli przeprowadzono za pomocą oprogramowania ViiA7 Quan Studio™ Real Time PCR wersja 1.3 (Thermo Fisher Scientific, USA).



Rycina 11. Przykład oznaczenia polimorfizmu SNP *rs26618* z wykorzystaniem analizy dyskryminacji alleli.

### **3.4.7. Badanie aktywności enzymatycznej wariantów ERAP1 w miejscu polimorficznym *rs26618* (Ile276Met) wobec N-końcowo wydłużonego prekursora LIVDRPVTLV liganda HLA-C\*05:01**

W celu zbadania biologicznej funkcji aminopeptydazy ERAP1 w miejscu polimorficznym *rs26618* (Ile276Met) przetestowano aktywność enzymatyczną dwóch wariantów powstałych w wyniku ukierunkowanej mutagenyzy różniących się w pozycji 276 (Ile lub Met) wobec N-końcowo wydłużonego prekursora LIVDRPVTLV liganda HLA-C\*05:01, IVDRPVTLV. Badanie aktywności aminopeptydazy ERAP1 zostało wykonane we współpracy z dr Efstratiosem Stratikosem i dr Anastasią Mpakali z Protein Chemistry Group, Biodiagnostic Division, National Centre for Scientific Research „Demokritos” z siedzibą w Atenach, jest to jeden z najlepszych ośrodków badających strukturę i funkcję białek ERAP (1 i 2). Za pomocą plazmidów stosowanych do rekombinacyjnej ekspresji wariantów ERAP1 Ile276 i Met276 (Goto i in., 2006) skonstruowano rekombinowanego bakulowirusa zgodnie z instrukcją producenta zestawu ( Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, ThermoFisher Scientific). Ekspresję i oczyszczanie białka przeprowadzono z supernatantu zainfekowanych bakulowirusem owadzych komórek Hi5, stosując chromatografię powinowactwa metali chelat, co zostało szczegółowo opisane przez Mpakali i współ. (Mpakali i in., 2015a). Czystość białka oceniono za pomocą SDS-PAGE. Natomiast aktywność enzymatyczną zbadano przy użyciu fluorescencyjnego substratu L-AMC firmy Merck (Zervoudi i in., 2011). Peptydy zsyntetyzowano w firmie GeneCust (Francja) i oczyszczono metodą chromatografii faz odwróconych C18 z czystością większą niż 95%. Testy przycinania peptydów przeprowadzono w następujący sposób: 20  $\mu$ M każdego peptydu zmieszano z 0,5 nM (w eksperymentach z generowaniem epitopów) lub 100 nM (w eksperymentach z niszczeniem epitopów) rekombinowanej aminopeptydazy ERAP1 i inkubowano w 37° C przez 1 godzinę, następnie reakcję zatrzymywano kwasem trifluorooctowym i analizowano w układzie faz odwróconych HPLC z wykorzystaniem kolumny Chromolith C18 oraz systemu chromatografii cieczowej Agilent 1220 Infinity II z detekcją przy 220 nm (Mpakali i in., 2015b).

### 3.5. Metody statystyczne

Częstości genów *KIR* i *HLA* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej porównano testem statystycznym chi-kwadrat ( $\chi^2$ ). Jako miarę dopasowania modelu zastosowano kryterium informacyjne Akaikego (AIC - *ang. Akaike Information Criterion*). Stosując iloraz szans (*ang. odds ratio*, OR) i 95% przedziału ufności (*ang. confidence intervals*, 95% CI) oceniono związek badanego genu/genotypu z chorobą i siłę efektu genu/genotypu na rozwój choroby. Badanie interakcji międzygenowych zostało przeprowadzone przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 5. Wynik uznano za istotny statystycznie przy  $p < 0,05$ .

W grupach kontrolnych oraz w grupach chorych oceniono zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów z rozkładem Hardy'ego-Weinberga. Wartości obserwowane i oczekiwane częstości genotypów porównano testem  $\chi^2$ . Poziom prawdopodobieństwa  $p > 0,05$  wskazuje na brak odstępstwa od rozkładu oczekiwanego z prawa Hardy'ego-Weinberga.

Przeprowadzono analizę nierównowagi sprzężeń (*ang. linkage disequilibrium*, LD) celem oceny powiązań genów *KIR*. Miarą oszacowania nierównowagi sprzężeń pomiędzy parami alleli był współczynnik  $D'$ , który obliczono w następujący sposób: jeśli  $p_i$  i  $q_j$  są częstościami alleli populacji  $i$ -tego allelu locus A i  $j$ -tego allelu w locus B, a  $x_{ij}$  jest częstością haplotypu z allelami  $i$  i  $j$  w loci, odpowiednio, A i B, wówczas

$$D' = D_{ij} / D_{max}$$

Numeryczną metodę Monte Carlo wykorzystano do opisu zmian ilorazu szans (OR). Zastosowano dwa różne modele, w których badano związek pomiędzy częstością genów *KIR2DS1* i *KIR2DS4* a prawdopodobieństwem wystąpienia choroby. Celem symulacji było opisanie zmian ilorazu szans (OR) dla genów *KIR2DS1* i *KIR2DS4*, kiedy gen *KIR2DS4* jest związany z chorobą oraz zmian OR, kiedy gen *KIR2DS1* chroni przed zachorowaniem.

Do analizy związku genów z przebiegiem AZS i wybranymi danymi klinicznymi zastosowano pakiet IBM SPSS Statistics. Przy jego pomocy wykonano analizy podstawowych statystyk opisowych wraz z testem Kołmogorowa-Smirnowa, testy  $\chi^2$ , dokładne testy Fishera, testy  $t$  Studenta dla prób niezależnych. Za poziom istotności uznano klasyczny próg  $\alpha = 0,05$ . W pierwszym kroku policzono podstawowe statystyki opisowe badanych zmiennych ilościowych wraz z testem Kołmogorowa-Smirnowa, sprawdzającym normalność rozkładu tychże zmiennych. Wyniki istotne statystycznie wskazujące na rozkłady



odmienne od rozkładu Gaussa zweryfikowano sprawdzając poziom skośności tych zmiennych. W sytuacji gdy wartość ta mieściła się w przedziale od -2 do +2 przyjęto, że badane rozkłady nie są znacząco asymetryczne względem średniej (George i Mallory 2010). Taką właśnie sytuację odnotowano w przypadku zmiennej wieku badanych osób. Tak więc dla analiz z wiekiem wykonano testy parametryczne.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Badanie związku genów *KIR* z podatnością na atopowe zapalenie skóry

Komórki NK są kluczowymi elementami odporności nieswoistej, zapewniają pierwszą linię obrony przed czynnikami zakaźnymi, jednakże ich rola w rozwoju atopowego zapalenia skóry nie została do końca poznana. Dlatego do badań wybrano geny receptorów *KIR*, które są najważniejszymi receptorami hamującymi lub pobudzającymi aktywność tych komórek.

#### 4.1.2. Częstość występowania genów *KIR* w grupie chorych i w kontroli

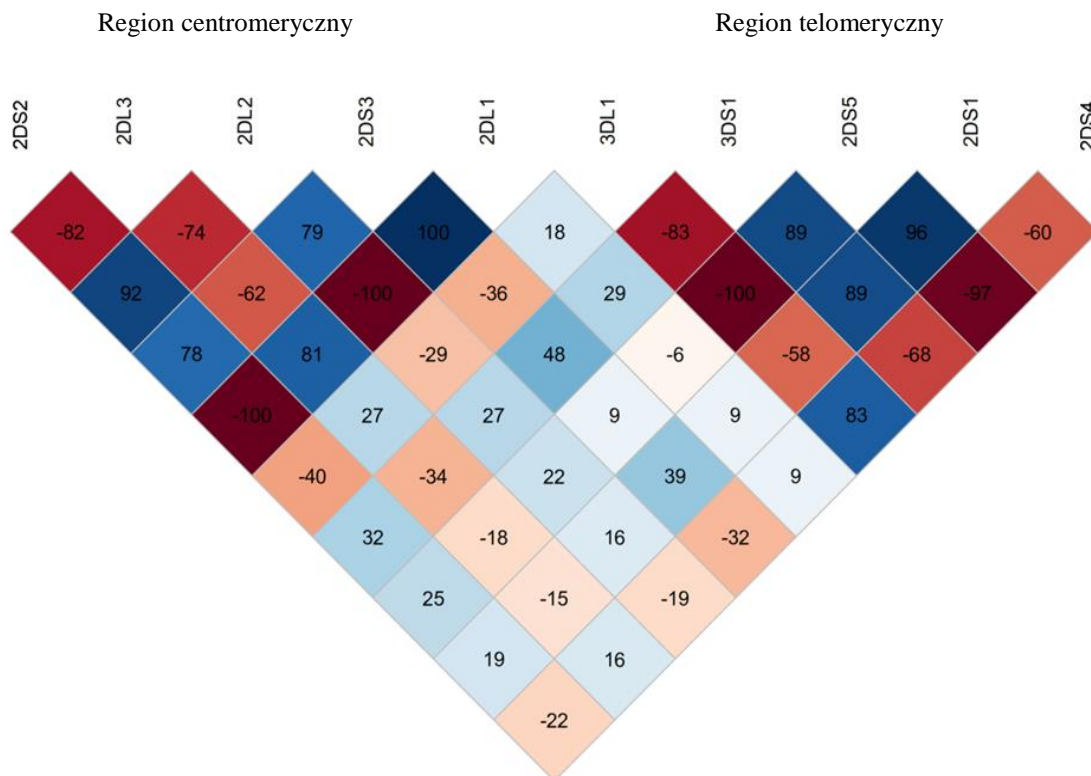
Istotną różnicę w częstości występowania genów *KIR* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną wykazano dla genu *KIR2DS1*. W pozostałych genach *KIR* nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy pacjentami z AZS i grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ). Badaniem objęto dwie grupy chorych z atopowym zapaleniem skóry. W pierwszej kohorcie przebadano 240 pacjentów i wykazano znacznie niższą częstość występowania genu *KIR2DS1* (31,12%) w porównaniu z grupą kontrolną (41,93%). Osoby posiadające gen *KIR2DS1* miały zatem prawie dwukrotnie niższe ryzyko zachorowania niż osoby, które nie miały genu *KIR2DS1* (OR = 0,629, CI95% = 0,45;0,87). Podobne wyniki uzyskano analizując drugą kohortę pacjentów liczącą 201 osób, częstość genu *KIR2DS1* w tej grupie wynosiła 33,33% (OR= 0,692, CI95% = 0,49;0,97). Analiza porównawcza połączonych grup chorych z grupą kontrolną wykazała istotną statystycznie różnicę w częstości występowania genu *KIR2DS1* u chorych: 32,19% w porównaniu do 41,93% w grupie kontrolnej (OR=0,658, CI95% =0,5;0,86). W tabeli 18 przedstawiono wszystkie dane dotyczące rozkładu częstości genów *KIR* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.

#### 4.1.3. Niezrównoważenie sprzężeń (*ang. linkage disequilibrium, LD*) między genami *KIR*

Gen *KIR2DS1* jest w silnym niezrównoważeniu sprzężeń (LD) z innymi genami *KIR* zlokalizowanymi w regionie telomerycznym kompleksu genów *KIR*. Jak opisano powyżej, częstość genu *KIR2DS1* jest niższa u chorych. Z ryciny 12 można odczytać, że gen *KIR2DS1*

## WYNIKI

pozostaje w ujemnym LD z genem *KIR2DS4*, dlatego częstość *KIR2DS4* w tej grupie powinna być wyższa. W tabeli 18 zamieszczono liczebności osób z genem *KIR2DS4* w grupie badanej i kontrolnej. W analizie uwzględniono zarówno pełną formę genu *KIR2DS4* jak i wariant z delecją 22 par zasad. Osoba posiadająca którąkolwiek z obu form genu *KIR2DS4* miała wyższe ryzyko zachorowania niż osoba nie posiadająca żadnej formy genu *KIR2DS4* (OR = 1,55, CI95% = 0.98; ∞). *KIR2DS1* jest w silnym LD z *KIR3DS1* i *KIR2DS5*, jednakże nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w częstości występowania tych genów w grupie chorych i kontroli. W analizie niezrównoważenia sprzężeń pominięto gen *KIR2DL5* z uwagi na brak możliwości rozróżnienia wersji tego genu leżących po stronie centromerycznej i telomerycznej *KIR2DL5A* i *KIR2DL5B* (Rycina 12).



Rycina 12. Niezrównoważenie sprzężeń (linkage disequilibrium (LD)) między genami KIR (Niepiekło-Miniewska i in., 2013).

Tabela 18. Rozkład częstości genów *KIR* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej (Niepiekło-Miniewska i in., 2013).

Grupa	Częstość genów <i>KIR</i> (%)											
	<i>2DS2</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL5</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DL1</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS4</i> pełny	<i>2DS4</i> delecyjny	<i>2DS4</i> ogółem
<b>Kontrola</b> (N=570)	54,39 (310)	53,86 (307)	90,53 (516)	52,91 (173)	31,58 (180)	97,02 (553)	94,39 (538)	38,25 (218)	41,93 (239)	28,07 (160)	82,63 (471)	92,81 (529)
<b>Pacjenci 1 grupa</b> (N=240)	54,58 (131)	58,33 (140)	91,25 (219)	54,16 (130)	34,02 (82)	95,85 (231)	96,66 (232)	35,00 (84)	<b>31,12<sup>a</sup></b> <b>(75)</b>	26,97 (65)	86,25 (207)	95,4 (229)
<b>Pacjenci 2 grupa</b> (N=201)	53,73 (108)	46,77 (94)	91,54 (184)	46,77 (94)	24,87 (50)	94,52 (190)	88,05 (177)	35,32 (71)	<b>32,33<sup>b</sup></b> <b>(65)</b>	34,32 (69)	82,08 (165)	95,0 (191)
<b>Pacjenci ogółem</b> (N=441)	54,19 (239)	53,06 (234)	91,38 (403)	50,79 (224)	29,93 (132)	95,46 (421)	92,75 (409)	35,14 (155)	<b>31,74<sup>c</sup></b> <b>(140)</b>	30,38 (134)	84,35 (372)	95,2 <sup>d</sup> (420)

a OR = 0,629, 95%CI (0,45;0,87),  $p_{corr} = 0,045$

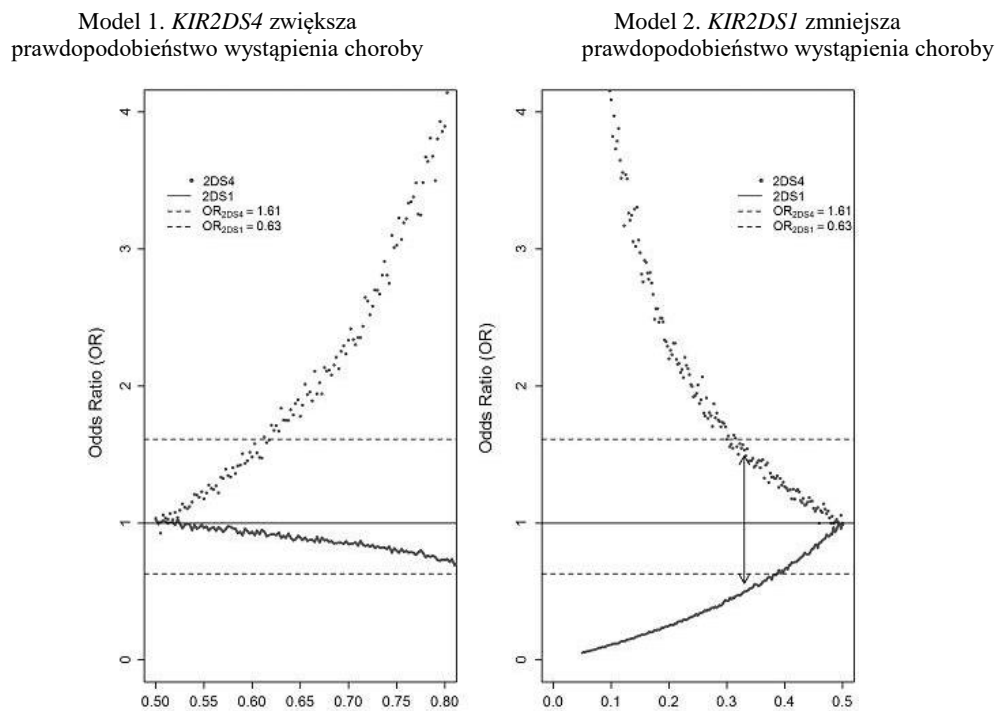
b OR = 0,692, 95%CI (0,49;0,97),  $p_{corr} = 0,047$

c OR = 0,658, 95%CI (0,5;0,86),  $p_{corr} = 0,015$

d OR = 1,55, 95%CI (0,98;  $\infty$ ),  $p_{corr} = 0,056$

#### 4.1.4. Symulacja Monte Carlo

Zastosowano dwa różne modele, w których badano związek pomiędzy częstością genów *KIR2DS1* i *KIR2DS4* a prawdopodobieństwem wystąpienia choroby. Celem symulacji było opisanie zmian ilorazu szans (OR) dla genów *KIR2DS1* i *KIR2DS4*, kiedy gen *KIR2DS4* jest związany z chorobą oraz zmian OR, kiedy gen *KIR2DS1* chroni przed zachorowaniem. Symulacja metodą Monte Carlo sugeruje, że to raczej nieobecność genu *KIR2DS1* wpływa na skłonność do wystąpienia choroby. Mianowicie **model 1** zakłada, że obecność genu *KIR2DS4* zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia choroby i że zmiany częstości genu *KIR2DS1* wynikają jedynie z nierównoważenia sprzężeń (LD) z genem *KIR2DS4* (Rycina 13). Na rysunku pokazano, że wzrostowi częstości genu *KIR2DS4* nie towarzyszy spadek częstości genu *KIR2DS1* równy wartości obserwowanej eksperymentalnie. **Model 2** z kolei zakłada, że obecność genu *KIR2DS1* chroni przed zachorowaniem i że zmiany częstości genu *KIR2DS4* wynikają jedynie z LD z genem *KIR2DS1* (Rycina 13). W modelu tym wykazano, że zmniejszającej się częstości genu *KIR2DS1* odpowiada wzrost częstości genu *KIR2DS4*, co jest bardziej zbliżone do naszych danych eksperymentalnych.



Rycina 13. Symulacja Monte Carlo wpływu genów *KIR2DS1* i *KIR2DS4* na podatność na AZS (Niepiekło-Miniewska i in., 2013).

#### 4.1.5. Analiza częstości haplotypów genów *KIR*

Analiza częstości haplotypów pozwoliła na oszacowanie 13 najczęstszych haplotypów w grupie kontrolnej (Tabela 19). W tabeli tej przedstawiono łączną częstość haplotypów nieposiadających genu *KIR2DS1* w grupie kontrolnej, która wynosiła 72.2%. W grupie kontrolnej zaobserwowano 5 haplotypów, których częstość wynosiła przynajmniej 1%. Z kolei w tabeli 20 przedstawiono częstości 15 najczęstszych haplotypów w grupie pacjentów, osiem z tych haplotypów nie zawierało genu *KIR2DS1* i ich częstość wynosiła co najmniej 1%. Ponadto łączna częstość haplotypów bez genu *KIR2DS1* wynosiła w populacji chorych 75.4%. Jak wspomniano wcześniej gen *KIR2DS1* występuje w silnym LD z genem *KIR3DS1*, dlatego można by oczekiwać, że spadek częstości *KIR2DS1* powinien pociągać za sobą spadek w częstości *KIR3DS1*, lecz różnica w częstości *KIR3DS1* między chorymi a grupą kontrolną nie była znamienna na poziomie istotności  $\alpha=0.05$ . W tabeli 19 widzimy dwa haplotypy (H8 i H13), które „łamiają” związek *KIR2DS1* z *KIR3DS1*, tzn. takie, które nie zawierają genu *KIR2DS1* ale zawierają *KIR3DS1*. W grupie kontrolnej częstość tych dwóch haplotypów wyniosła 2,41% i 1,38% (łącznie 3,8%), a w grupie chorych odpowiednio 3,3% i 3,21% (łącznie 6,5%).

Tabela 19. Częstości haplotypów genów *KIR* w grupie kontrolnej.

Haplotyp	Geny <i>KIR</i>										Częstość (%)
	<i>2DS2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DL1</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DS5</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS4</i>	
H1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	52,2
H2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	12,4
H3	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	7,21
H4	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	3,79
H5	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	3,45
H6	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	3,04
H7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2,46
H8	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	2,41
H9	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1,96
H10	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1,89
H11	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1,87
H12	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1,78
H13	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1,38

Nie uwzględniono genu *KIR 2DL5* (zbyt duży błąd oszacowań w sytuacji niemożności odróżnienia *2DL5A* od *2DL5B*)

Tabela 20. Częstości haplotypów genów *KIR* w grupie chorych na AZS.

Geny <i>KIR</i>											
Haplotyp	<i>2DS2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DL1</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DS5</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS4</i>	Częstość (%)
H1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	49,22
H2	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	10,75
H3	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1,66
H4	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	2,68
H5	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1,53
H6	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1,92
H7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2,96
H8	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	3,3
H9	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	2,8
H10	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	4,16
H11	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	3,21
H12	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	4,91
H13	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	2,52
H14	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	2,43
H15	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1,28

Nie uwzględniono genu *KIR 2DL5* (zbyt duży błąd oszacowań w sytuacji niemożności odróżnienia *2DL5A* od *2DL5B*)

#### 4.1.6. Analiza zależności pomiędzy występowaniem genów *KIR* a danymi klinicznymi

W celu sprawdzenia wpływu genów *KIR* na przebieg kliniczny choroby, przeanalizowano zależność pomiędzy częstością poszczególnych genów *KIR* oraz danymi klinicznymi badanych pacjentów takimi jak wiek zachorowania, płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby oraz choroby współistniejące (astma, alergiczny nieżyt nosa, zapalenie spojówek). W wyniku analizy częstości genów *KIR* w kontekście współwystępowania chorób takich jak astma, zapalenie spojówek czy alergiczny nieżyt nosa, zaobserwowano rzadsze występowanie genu *KIR2DS2* u osób z astmą jako chorobą współistniejącą. Różnica była istotna statystycznie, ale siła tego związku była niska ( $\chi^2 = 4,63$ ;  $p = 0,031$ ;  $V = 0,14$ ). Analizę wykonano przy użyciu testów  $\chi^2$  oraz dokładnych testów Fishera. Dane przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 21). Nie wykazano żadnych istotnych zależności związanych z częstościami innych genów *KIR* a występowaniem pozostałych chorób współistniejących. Dla pozostałych analizowanych cech klinicznych również nie wykazano żadnego związku z częstością występowania genów *KIR*.

WYNIKI

Tabela 21. Obecność genów *KIR* a współwystępowanie astmy u pacjentów z AZS.

Geny <i>KIR</i>			Astma		
			nie	tak	
<b>2DS2</b>	<b>brak</b>	N (%)	<b>68 (40,5)</b>	<b>40 (55,6)</b>	$\chi^2(1) = 4,63$ <b>p = 0,031</b> <b>V = 0,14</b>
	<b>obecny</b>	N (%)	<b>100 (59,5)</b>	<b>32 (44,4)</b>	
<b>2DL2</b>	brak	N (%)	68 (40,5)	38 (52,8)	$\chi^2(1) = 3,09$ p = 0,079 V = 0,11
	obecny	N (%)	100 (59,5)	34 (47,2)	
<b>2DL3</b>	brak	N (%)	16 (9,5)	5 (6,9)	$\chi^2(1) = 0,42$ p = 0,517
	obecny	N (%)	152 (90,5)	67 (93,1)	
<b>2DS3</b>	brak	N (%)	106 (63,1)	52 (72,2)	$\chi^2(1) = 1,87$ p = 0,172
	obecny	N (%)	62 (36,9)	20 (27,8)	
<b>2DL1</b>	brak	N (%)	5 (3,0)	4 (5,6)	$\chi^2(1) = 0,93$ p = 0,335
	obecny	N (%)	163 (97,0)	68 (94,4)	
<b>3DL1</b>	brak	N (%)	5 (3,0)	4 (5,6)	$\chi^2(1) = 0,93$ p = 0,335
	obecny	N (%)	163 (97,0)	68 (94,4)	
<b>3DS1</b>	brak	N (%)	109 (64,9)	47 (65,3)	$\chi^2(1) = 0,03$ p = 0,953
	obecny	N (%)	59 (35,1)	25 (34,7)	
<b>2DS5</b>	brak	N (%)	116 (69,0)	49 (68,1)	$\chi^2(1) = 0,02$ p = 0,879
	obecny	N(%)	52 (31,0)	23 (31,9)	
<b>2DS1</b>	brak	N (%)	113 (67,3)	52 (72,2)	$\chi^2(1) = 0,58$ p = 0,447
	obecny	N (%)	55 (32,7)	20 (27,8)	
<b>2DS4-pełny</b>	brak	N (%)	128 (76,2)	47 (65,3)	$\chi^2(1) = 3,04$ p = 0,081 V = 0,11
	obecny	N (%)	40 (23,8)	25 (34,7)	
<b>2DS4-delecyjny</b>	brak	N (%)	21 (12,5)	12 (16,7)	$\chi^2(1) = 0,74$ p = 0,390
	obecny	N (%)	147 (87,5)	60 (83,3)	
<b>2DL5</b>	brak	N (%)	71 (42,3)	39 (54,2)	$\chi^2(1) = 2,88$ p = 0,090 V = 0,11
	obecny	N (%)	97 (57,7)	33 (45,0)	



## 4.2 Ligandy receptorów KIR

Geny *KIR* są głównym czynnikiem wpływającym na zmienność fenotypu i funkcję komórek NK. Oprócz polimorfizmów tych genów zmienność wynika również z różnorodności ligandów KIR. Dlatego przeanalizowano możliwość udziału epitopów HLA (HLA-A, B i C) w prawdopodobieństwie zachorowania na AZS.

### 4.2.1. Rozkład częstości epitopów HLA-C (C1 i C2) w kontroli i u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry

Porównanie częstości epitopów C1 i C2 przedstawiono w tabeli 22. Nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami pacjentów, jak i pomiędzy całą badaną grupą pacjentów z AZS i kontrolą. Dla wszystkich badanych grup wartość  $p > 0,05$ .

Tabela 22. Porównanie częstości epitopów HLA-C (C1 i C2) u pacjentów z AZS i w kontroli.

Grupa badana	C1		C2	
	Częstość (%)	p	Częstość (%)	P
<b>Kontrola (N=561)</b>	470 (83,8)		382 (68,1)	
<b>Pacjenci 1 grupa (N=240)</b>	208 (86,7)	0,332	170 (70,8)	0,491
<b>Pacjenci 2 grupa (N=198)</b>	159 (80,3)	0,276	139 (70,2)	0,648
<b>Pacjenci ogółem (N=438)</b>	367 (83,8)	1	309 (70,5)	0,442

Epitop C2 na cząsteczce HLA-C jest ligandem dla cząsteczki *KIR2DS1*, dlatego w tabeli 23 przedstawiono rozkład częstości genu *KIR2DS1* w zależności od obecności epitopu C2. Ochronny efekt genu *KIR2DS1* w atopowym zapaleniu skóry jest niezależny od obecności czy też braku ligandu C2 ( $p=0,920$ ).

Tabela 23. Rozkład częstości epitopu C2 w zależności od obecności genu *KIR2DS1*.

Epitop C2	<i>KIR2DS1</i> <sup>+</sup>		<i>KIR2DS1</i> <sup>-</sup>	
	Pacjenci (N=140; N;%)	Kontrola (N=235; N;%)	Pacjenci (N=298; N;%)	Kontrola (N=327; N;%)
<b>C2+</b>	98 (70)	162 (68,9)	211 (70,8)	221 (67,8)
<b>C2-</b>	42 (30)	73 (31,1)	87 (29,2)	106 (32,2)
	$\chi^2=0,01$ ; $p=0,920$		$\chi^2=0,61$ ; $p=0,433$	

Analiza częstości innych genów *KIR* w połączeniu z ich ligandami (2DL1-C2, 2DL2-C1, 2DL3-C1) również nie wykazała żadnych istotnych różnic pomiędzy chorymi a kontrolą (dane nie pokazane).

#### 4.2.2. Rozkład częstości epitopów HLA-B Bw4 i HLA-A Bw4 w kontroli i u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry

Porównanie częstości epitopów HLA-B Bw4 z treoniną w pozycji 80 wykazało mniejszą częstość występowania tego epitopu w pierwszej badanej grupie pacjentów ( $p=0,015$ ), natomiast analiza częstości tego epitopu w drugiej badanej grupie nie wykazała żadnych istotnych statystycznie różnic. Nie wykazano także istotnych statystycznie różnic pomiędzy całą badaną grupą pacjentów z AZS a kontrolą. Podobnie analiza HLA-B Bw4 z izoleucyną w pozycji 80 jak i HLA-A Bw4 u pacjentów i w kontroli nie wykazała istotnych różnic. Dane przedstawiono w tabeli 24.

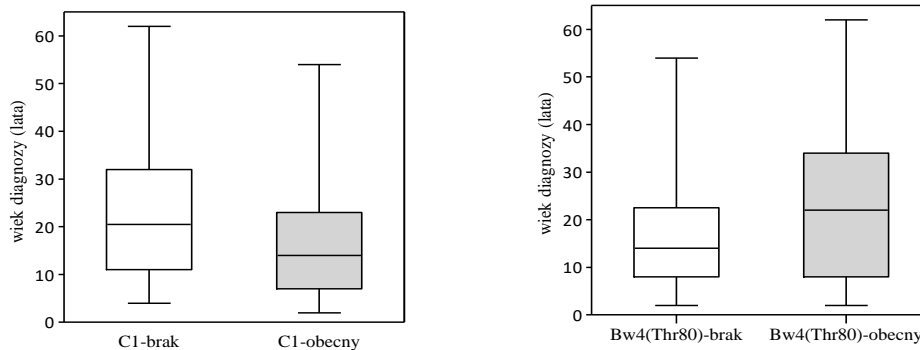
Tabela 24. Porównanie częstości epitopów HLA-B Bw4 i HLA-A Bw4 u pacjentów z AZS i w kontroli.

Grupa badana	HLA-B Bw4(Thr80)		HLA-B Bw4(Ile80)		HLA-A Bw4(Ile80)	
	Częstość (%)	p	Częstość (%)	p	Częstość (%)	p
<b>Kontrola (N=322)</b>	90 (27,9)		113 (35,1)		122 (37,8)	
<b>Pacjenci 1 grupa (N=240)</b>	45 (18,7)	<b>P=0,015</b>	88 (36,6)	P=0,7672	91 (37,9)	P=0,935
<b>Pacjenci 2 grupa (N=198)</b>	63 (31,8)	P=0,374	76 (38,3)	P=0,5061	69 (34,8)	P=0,545
<b>Pacjenci ogółem (N=438)</b>	108 (24,6)	P=0,348	164(37,4)	P=0,5560	160 (36,5)	P=0,704

Analiza częstości genu *KIR3DL1* w połączeniu z jego ligandami, którymi są cząsteczki HLA-B i niektóre HLA-A zawierające motyw Bw4 również nie wykazała różnic pomiędzy chorymi a kontrolą.

### 4.2.3. Analiza zależności pomiędzy występowaniem ligandów genów *KIR* a danymi klinicznymi

Przeprowadzono analizę zależności pomiędzy częstością ligandów genów *KIR* a danymi klinicznymi badanych pacjentów, takimi jak wiek zachorowania, płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby oraz choroby współistniejące (astma, alergiczny nieżyt nosa, zapalenie spojówek). Wykazano zależność pomiędzy wiekiem diagnozy badanych pacjentów a występowaniem określonych ligandów *KIR*. Wiek zachorowania badanych pacjentów z atopowym zapaleniem skóry mieścił się w granicach od 2 do 62 lat. Istotnie statystycznie różnice zaobserwowano dla pacjentów, którzy posiadali epitop C1 lub epitop HLA-B Bw4 z treoniną w pozycji 80. U pacjentów diagnozowanych w młodszym wieku częściej występował epitop C1 ( $p=0,023$ ), natomiast u pacjentów diagnozowanych w późniejszym wieku epitop HLA-B Bw4 (Thr80) ( $p=0,008$ ), rycina 14. Siła obu odnotowanych efektów, mierzona współczynnikiem  $d$  Cohena była umiarkowanie duża.



Rycina 14. Występowanie epitopu HLA-C (C1) i HLA-B (Bw4-Thr80) a wiek diagnozy badanych osób (mediana, min-max).

W zakresie pozostałych zmiennych nie odnotowano różnic istotnych statystycznie. Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 25.

## WYNIKI

Tabela 25. Wiek diagnozy badanych pacjentów z AZS a występowanie ligandów KIR

HLA	Wiek diagnozy pacjentów w przypadku braku ligandu		Wiek diagnozy pacjentów z obecnym ligandem		t	p	95% CI		d Cohena
	M	SD	M	SD					
<b>C1</b>	23,72	15,88	16,80	11,82	2,37	<b>0,023</b>	0,99	12,85	<b>0,56</b>
<b>C2</b>	16,06	12,49	18,41	12,65	-1,31	0,191	-5,88	1,18	0,19
<b>B Bw4 (Thr80)</b>	16,44	11,18	24,31	17,08	-2,76	<b>0,008</b>	-13,60	-2,13	<b>0,64</b>
<b>B Bw4 (Ile80)</b>	18,09	13,10	17,09	11,81	0,59	0,558	-2,34	4,33	0,08
<b>A Bw4 (Ile80)</b>	17,37	12,88	18,30	12,24	-0,55	0,582	-4,24	2,39	0,07

M – średnia; SD – odchylenie standardowe; t – wynik testu t Studenta; p – istotność statystyczna; 95%CI – przedział ufności

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę częstości występowania ligandów genów *KIR* wśród pacjentów z chorobami współistniejącymi. Wykazano, że epitop HLA-B Bw4 (Ile80) występuje rzadziej u pacjentów z astmą jako chorobą współistniejącą ( $p=0,002$ ). Siła obserwowanego związku była jednak niska ( $V=0,20$ ). Dla pozostałych badanych ligandów nie odnotowano wyników istotnych statystycznie. Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 26.

Tabela 26. Występowanie określonych ligandów KIR a współwystępowanie astmy u pacjentów z AZS.

Ligand KIR			Astma		
			nie	tak	
<b>HLA-C (C1)</b>	brak	N (%)	20 (11,9)	12 (16,7)	$\chi^2 = 0,99$ $p = 0,320$
	obecny	N (%)	148 (88,1)	60 (83,3)	
<b>HLA-C (C2)</b>	brak	N (%)	46 (27,4)	24 (33,3)	$\chi^2 = 0,86$ $p = 0,353$
	obecny	N (%)	122 (72,6)	48 (66,7)	
<b>HLA-B Bw4 (Thr80)</b>	brak	N (%)	142 (84,5)	59 (81,9)	$\chi^2 = 0,25$ $p = 0,620$
	obecny	N (%)	26 (15,5)	13 (18,1)	
<b>HLA-B Bw4 (Ile80)</b>	brak	N (%)	96 (57,1)	56 (77,8)	$\chi^2 = 9,24$ $p = 0,002$ $V = 0,20$
	obecny	N (%)	72 (42,9)	16 (22,2)	
<b>HLA-A Bw4 (Ile80)</b>	brak	N (%)	102 (60,7)	47 (65,3)	$\chi^2 = 0,45$ $p = 0,504$
	obecny	N (%)	66 (39,3)	25 (34,7%)	

Przeprowadzona analiza powiązań pomiędzy pozostałymi danymi klinicznymi takimi jak: płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby a obecnością ligandów genów

*KIR* również nie wykazała żadnych zależności pomiędzy badanymi cechami klinicznymi oraz ligandami receptorów *KIR*.

### 4.3. Częstość występowania alleli *HLA-C* u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej

Allele locus *HLA-C* można podzielić na podstawie dimorfizmu w pozycji 80 na dwie grupy. Grupa 1 (*HLA-C1*) z asparaginą w pozycji 80 i grupa 2 (*HLA-C2*) z lizyną w tej pozycji. Jak przedstawiono wyżej, częstość tych epitopów u pacjentów i w kontroli nie różniła się. Jednakże nie można wykluczyć, że w *AZS KIR2DS1* rozpoznaje tylko niektóre allele *HLA-C* noszące epitop C2. Dlatego w kolejnym etapie badań porównano występowanie alleli *HLA-C* u pacjentów i osób zdrowych. Statystycznie istotną różnicę zaobserwowano jedynie dla allelu *HLA-C\*05*, który jest stosunkowo rzadki w polskiej populacji. W grupie chorych 1,7% badanych osób posiadało allel *HLA-C\*05* w porównaniu z 3,91% w grupie kontrolnej ( $p=0,018$ ). Osoby, które posiadają allel *HLA-C\*05* mają ponad dwukrotnie niższe ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry niż osoby nieposiadające tego allelu ( $OR=0,41$ ;  $95\%CI = 0,21;0,85$ ). Dla pozostałych alleli *HLA-C* nie wykazano istotnych różnic w częstości występowania w grupie kontrolnej i w grupie badanej. W tabeli 27 przedstawiono częstości poszczególnych alleli *HLA-C*.

Tabela 27. Rozkład częstości alleli *HLA-C* u chorych z *AZS* i w kontroli.

Allele <i>HLA-C</i>	Grupa Kontrolna (N=549)	Pacjenci <i>AZS</i> (N=293)	p	OR (95%CI)
<i>C*01</i>	59 (5,37)	27 (4,62)	0,562	0,84 (0,52; 1,36)
<i>C*02</i>	76 (6,92)	43 (7,33)	0,116	1,48 (0,93; 2,36)
<i>C*03</i>	107 (9,74)	44 (6,99)	0,129	0,72 (0,49; 1,07)
<i>C*04</i>	121 (11,02)	69 (11,77)	0,989	1,09 (0,77; 1,52)
<i>C*05</i>	<b>43 (3,91)</b>	<b>10 (1,71)</b>	<b>0,018</b>	<b>0,41 (0,21; 0,85)</b>
<i>C*06</i>	121 (11,02)	48 (8,19)	0,062	0,69 (0,47; 1,00)
<i>C*07</i>	293 (26,68)	167 (28,49)	0,350	1,15 (0,87; 1,54)
<i>C*08</i>	19 (1,73)	16 (2,73)	0,228	1,61 (0,81; 3,18)
<i>C*12</i>	83 (7,55)	43 (7,33)	0,944	0,96 (0,64; 1,43)
<i>C*14</i>	12 (1,09)	6 (1,02)	0,905	1,06 (0,39; 2,87)
<i>C*15</i>	19 (1,73)	11 (3,07)	0,981	1,08 (0,51; 2,31)
<i>C*16</i>	17 (1,54)	11 (3,07)	0,760	1,22 (0,56; 2,64)
<i>C*17</i>	20 (1,82)	5 (0,86)	0,172	0,45 (0,17; 1,23)
<i>C*18</i>	0(0)	1 (0,17)	0,764	5,43 (0,22; 133,8)

#### 4.3.1. Częstość alleli *HLA-C* w zależności od obecności genu *KIR2DS1* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej

Porównanie częstość alleli *HLA-C* u osób *KIR2DS1* pozytywnych w grupie chorych i grupie kontrolnej zebrano w tabeli 28. Nie wykazano istotnych różnic w częstości występowania dla większości alleli *HLA-C* pomiędzy badanymi grupami, wyjątkiem jest allel *HLA-C\*07*, którego wyższą częstość zaobserwowano w badanej grupie chorych ( $p=0,038$ ). Allel *HLA-C\*07* dwukrotnie zwiększał ryzyko zachorowania na AZS u pacjentów posiadających *KIR2DS1*.

Tabela 28. Częstość alleli *HLA-C* u osób *KIR2DS1*<sup>+</sup> w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w kontroli.

Allele <i>HLA-C</i>	<i>KIR2DS1</i> <sup>+</sup>			
	Pacjenci (N=60; %)	Kontrola (N=71;%)	p	OR (95% CI)
<i>C*01</i>	5 (8.3)	4 (5,6)	0,793	1,52 (0,38; 5,94)
<i>C*02</i>	9 (15.0)	11 (15,5)	0,868	1,03 (0,39; 2,70)
<i>C*03</i>	8 (13.3)	11 (15,4)	0,919	0,83 (0,31; 2,24)
<i>C*04</i>	18 (30.0)	15 (21,1)	0,521	1,40 (0,63; 3,07)
<i>C*05</i>	3 (5.0)	2 (2,8)	1,000	1,52 (0,24; 9,48)
<i>C*06</i>	9 (15.0)	20 (28,2)	0,110	0,45 (0,18; 1,08)
<b><i>C*07</i></b>	<b>38 (63.3)</b>	<b>31 (43,6)</b>	<b>0,038</b>	<b>2,22 (1,10; 4,50)</b>
<i>C*08</i>	5 (8.3)	5 (7,1)	0,957	1,20 (0,33; 4,36)
<i>C*12</i>	11(18.3)	14 (19,7)	0,982	0,91 (0,38; ..19)
<i>C*14</i>	0 (0)	2 (2,8)	0,551	0,22 (0,01; 4,88)
<i>C*15</i>	3 (5)	3 (4,2)	0,835	1,19 (0,23; 6,14)
<i>C*16</i>	0 (0)	3 (4,2)	0,305	0,16 (0,01; 3,19)
<i>C*17</i>	2 (3.3)	2 (2,8)	0,735	1,19 (0,16; 8,71)
<i>C*18</i>	0 (0)	0 (0)	-	-

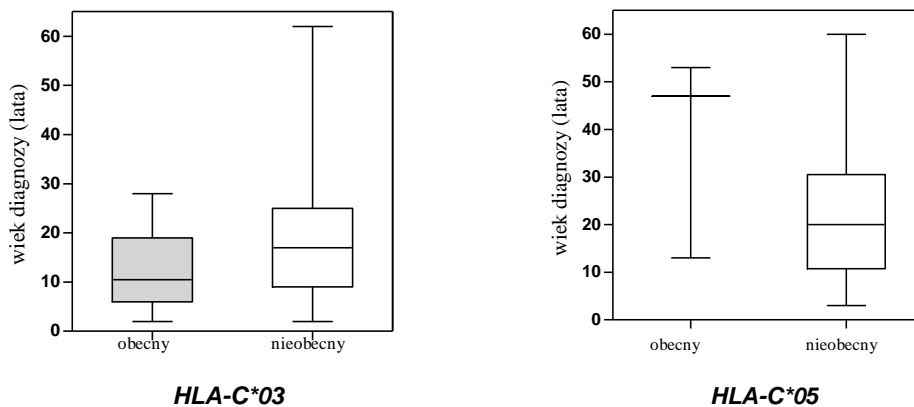
Natomiast analiza częstości występowania alleli *HLA-C* w zależności od braku obecności genu *KIR2DS1* w grupie pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i w grupie kontrolnej nie wykazała istotnych różnic (Tabela 29).

Tabela 29. Analiza częstość alleli *HLA-C* u osób KIR2DS1- w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.

Allele <i>HLA-C</i>	<i>KIR2DS1</i>			OR (CI95%)
	Pacjenci (N=136; %)	Kontrola (N=117;%)	p	
<i>C*01</i>	14 (10,1)	12 (10,2)	0,873	0,98 (0,43; 2,21)
<i>C*02</i>	19 (13,9)	7 (5,9)	0,068	2,48 (1,07; 6,14)
<i>C*03</i>	23 (16,9)	18 (15,3)	0,935	1,09 (0,5; 2,13)
<i>C*04</i>	24 (17,6)	25 (21,3)	0,501	0,76 (0,41; 1,43)
<i>C*05</i>	5 (3,6)	10 (8,5)	0,157	0,39 (0,13; 1,20)
<i>C*06</i>	25 (18,3)	29 (24,7)	0,240	0,66 (0,36; 1,21)
<i>C*07</i>	86 (63,2)	66 (56,4)	0,448	1,25 (0,75; 2,06)
<i>C*08</i>	5 (3,6)	4 (3,4)	0,792	1,05 (1,27; 4,02)
<i>C*12</i>	15 (12,8)	24 (20,5)	0,056	0,48 (0,23; 0,96)
<i>C*14</i>	4 (2,9)	0 (0)	0,179	7,80 (0,4; 146,6)
<i>C*15</i>	8 (5,8)	11 (9,4)	0,412	0,60 (0,23; 1,55)
<i>C*16</i>	7 (5,1)	0 (0)	0,309	6,02 (0,30;117,9)
<i>C*17</i>	3 (2,2)	1 (0,8)	0,739	2,55 (0,26; 24,9)
<i>C*18</i>	1 (0,7)	0 (0)	0,931	2,54 (0,10; 63,1)

#### 4.3.2. Analiza zależności pomiędzy częstościami alleli *HLA* locus *C* a danymi klinicznymi

Wykonana analiza zależności pomiędzy częstością alleli *HLA-C* a danymi klinicznymi badanych pacjentów takimi jak wiek diagnozy, płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby oraz choroby współistniejące wykazała zależność pomiędzy średnim wiekiem badanych pacjentów a częstościami alleli *HLA* locus *C*.



Rycina 15. Występowanie alleli *HLA-C\*03* i *HLA-C\*05* a wiek diagnozy badanych osób (mediana, min-max).

Wykonano analizy przy użyciu testów *t* Studenta dla prób niezależnych, porównując wiek zachorowania badanych osób posiadających i nieposiadających określone allele *HLA-C*.

## WYNIKI

Odnotowano dwa wyniki istotne statystycznie (Tabela 30). Zaobserwowano, że osoby z allelem *HLA-C\*03* były młodsze w momencie diagnozy niż osoby nieposiadające tego allelu ( $p=0,002$ ), siła tego oddziaływania była umiarkowanie duża ( $V=0,56$ ). Natomiast osoby diagnozowane w późniejszym wieku częściej posiadały allel *HLA-C\*05* ( $p=0,01$ ), siła efektu była duża ( $V=1,53$ ). Dla pozostałych alleli *HLA-C* nie wykazano istotnych statystycznie różnic.

Tabela 30. Występowanie określonych alleli *HLA* locus *C* w zależności od wieku badanych pacjentów.

Allele <i>HLA-C</i>	brak		obecny		t	p	95% CI		d Cohena
	M	SD	M	SD					
<i>C*01</i>	17,14	12,32	27,64	17,38	-2,20	0,044	-20,71	-0,30	0,81
<i>C*02</i>	17,60	12,74	21,55	16,03	-1,23	0,220	-10,30	2,39	0,30
<i>C*03</i>	<b>19,18</b>	<b>13,67</b>	<b>11,83</b>	<b>7,40</b>	<b>3,42</b>	<b>0,002</b>	<b>2,99</b>	<b>11,69</b>	<b>0,56</b>
<i>C*04</i>	16,96	12,91	22,00	13,71	-1,94	0,054	-10,17	0,09	0,38
<i>C*05</i>	<b>17,76</b>	<b>12,83</b>	<b>37,67</b>	<b>21,57</b>	<b>-2,62</b>	<b>0,010</b>	<b>-34,93</b>	<b>-4,89</b>	<b>1,53</b>
<i>C*06</i>	18,07	12,69	18,91	15,99	-0,28	0,782	-6,85	5,16	0,06
<i>C*07</i>	19,47	14,09	17,17	12,49	1,01	0,314	-2,20	6,79	0,17
<i>C*08</i>	18,54	13,52	13,44	8,53	1,11	0,268	-3,97	14,15	0,38
<i>C*12</i>	18,37	13,62	17,21	10,84	0,35	0,724	-5,33	7,66	0,09
<i>C*14</i>	18,24	13,38	17,00	3,00	0,16	0,873	-14,10	16,58	0,09
<i>C*15</i>	18,39	13,54	15,38	6,70	0,62	0,534	-6,55	12,57	0,23
<i>C*16</i>	18,52	13,29	11,50	10,88	1,27	0,205	-3,89	17,93	0,53
<i>C*17</i>	18,03	13,29	23,00	12,21	-0,82	0,412	-16,91	6,97	0,37
<i>C*18</i>	18,05	13,26	25,00	-	-0,52	0,603	-33,28	19,38	-

M – średnia; SD – odchylenie standardowe; t – wynik testu t Studenta; p – istotność statystyczna; 95%CI – przedział ufności

Analiza zależności pomiędzy częstościami alleli *HLA* locus *C* a pozostałymi cechami klinicznymi takimi jak: płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby nie wykazała istotnych statystycznie powiązań.



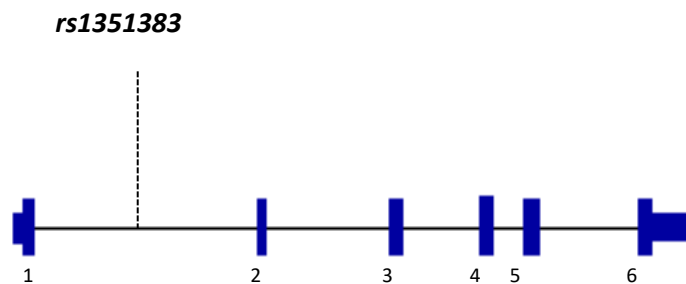
#### 4.4. Badanie związku polimorfizmów wybranych genów maszynerii prezentującej antygen z podatnością na atopowe zapalenie skóry

W oddziaływaniu zarówno receptora limfocyty T jak i KIR z cząsteczką HLA klasy I ważną rolę pełni peptyd związany przez tę cząsteczkę. Dlatego w następnym etapie zbadano możliwy udział polimorfizmów wybranych genów maszynerii prezentującej antygen w prawdopodobieństwie zachorowania na AZS.

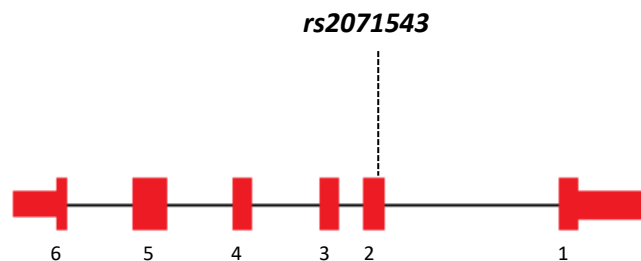
##### 4.4.1. Badanie związku polimorfizmów w genach *LMP2* i *LMP7* z podatnością na atopowe zapalenie skóry

Badany polimorfizm pojedynczego nukleotydu w genie *LMP2* znajduje się w regionie niekodującym *rs1351383* (*A>C*; Intron 1). Natomiast badany polimorfizm w genie *LMP7* *rs2071543* (*T>G*; Gln49Lys) znajduje się w sekwencji kodującej. Na rysunku poniżej przedstawiono lokalizację badanych miejsc polimorficznych.

##### *LMP2*



##### *LMP7*



Rycina 16. Lokalizacja badanych miejsc polimorficznych w genie *LMP(2 i 7)*.

#### 4.4.1.1. Ocena zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach *LMP2* i *LMP7* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga

Zgodności rozkładu genotypów badanych polimorfizmów w genie *LMP2* i genie *LMP7* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry przedstawiono w tabeli 31. W badanych grupach nie znaleziono odstępstwa rozkładów genotypów w badanych miejscach polimorficznych od rozkładu oczekiwanego z prawa Hardy'ego - Weinberga ( $p > 0,05$ ).

Tabela 31. Analiza zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach *LMP2* i *LMP7* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry.

Grupa/Genotyp	AA Wartości obserwowane (oczekiwane)	AB Wartości obserwowane (oczekiwane)	BB Wartości obserwowane (oczekiwane)	$\chi^2$	p
<b><i>LMP2 rs1351383 (A&gt;C)</i></b>					
	<i>A/A</i>	<i>A/C</i>	<i>C/C</i>		
<b>Chorzy</b>	103 (103,4)	130 (129,2)	40 (40,4)	0,010	0,921
<b>Kontrola</b>	94 (88,9)	98 (108,2)	38 (32,9)	2,038	0,153
<b><i>LMP7 rs2071543 (T&gt;G)</i></b>					
	<i>G/G</i>	<i>G/T</i>	<i>T/T</i>		
<b>Chorzy</b>	207 (206,6)	35 (35,9)	2 (1,6)	1,148	0,700
<b>Kontrola</b>	260 (263,6)	77 (69,8)	1 (4,6)	3,632	0,056

#### 4.4.1.2. Rozkład częstości genotypów i alleli w genach *LMP2* i *LMP7* w grupie pacjentów i w kontroli

Rozkład częstości genotypów i alleli w miejscu polimorficznym *rs1351383* w genie *LMP2* w grupie pacjentów z AZS i grupie kontrolnej nie różnił się w istotny sposób. Natomiast analiza genotypów w miejscu polimorficznym *rs2071543* w genie *LMP7* wykazała różnicę w rozkładzie częstości genotypów między osobami z atopowym zapaleniem skóry i grupą kontrolną ( $\chi^2=7,1014; p=0,028$ ). W populacji chorych 207 osób (85,5%) było homozygotami *G/G*, 35 osób było heterozygotami *G/T* (14,5%), natomiast 2 osoby były homozygotami *T/T* (0,8%). W grupie kontrolnej u 260 osób stwierdzono genotyp *G/G* (77,2%), 77 badanych osób było heterozygotami *G/T* (22,5%), a genotyp *T/T* stwierdzono u 1 osoby (0,3%). Analiza alleli w grupie chorych i w grupie kontrolnej wykazała różnice w częstościach alleli pomiędzy badanymi grupami ( $\chi^2=3,851; p=0,049$ ). Allel *T* w grupie chorych występował z niższą częstością (7,9%) w porównaniu do grupy kontrolnej (11,7%). Rozkład częstości genotypów i alleli w badanych grupach przedstawiono w tabeli 32.

## WYNIKI

Tabela 32. Częstość badanych genotypów i alleli genów *LMP2* i *LMP7* u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.

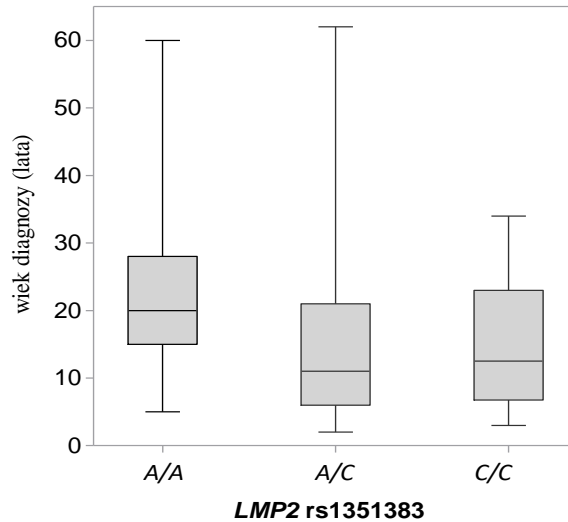
SNP	Genotyp/allel	Pacjenci N (%)	Kontrola N (%)	OR	95%CI	$\chi^2$	p
<i>LMP2</i> <i>rs1351383</i> <i>A&gt;C</i>	<i>A/A</i>	103 (37,7)	94 (40,9)	1			
	<i>A/C</i>	130 (47,6)	98 (42,6)	1,21	0,83; 1,77	1,2871	0,525
	<i>C/C</i>	40 (14,7)	38 (16,5)	0,96	0,57; 1,62		
	<i>A</i>	336 (61,5)	286 (62,0)	1			
	<i>C</i>	210 (38,5)	174 (38,0)	0,97	0,75; 1,20	0,0427	0,836
<i>LMP7</i> <i>rs2071543</i> <i>T&gt;G</i>	<i>G/G</i>	207 (85,5)	260 (77,2)	1			
	<i>G/T</i>	35 (14,5)	77 (22,5)	<b>0,58</b>	0,37; 0,89	<b>7,1014</b>	<b>0,028</b>
	<i>T/T</i>	2 (0,8)	1 (0,3)	2,09	0,27; 15,97		
	<i>G</i>	449 (92,0)	597 (88,3)	1			
	<i>T</i>	39 (7,9)	79 (11,7)	<b>0,65</b>	0,43; 0,98	<b>3,8510</b>	<b>0,049</b>

### 4.4.1.3. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach *LMP* (2 i 7) a danymi klinicznymi

Przeanalizowano zależność pomiędzy polimorfizmami w genach *LMP* (2 i 7) a danymi klinicznymi badanych pacjentów takimi jak wiek diagnozy, płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby oraz choroby współistniejące. Wykonano jednoczynnikową analizę wariancji, porównując wiek osób badanych w grupach o różnych wariantach genotypu w genie *LMP2* i *LMP7* (Tabela 33). Wykazano, że jedynie miejsce polimorficzne *rs1351383* w genie *LMP2* miało związek z wiekiem diagnozy chorych na atopowe zapalenie skóry. Po przeprowadzeniu analizy *post-hoc* przy zastosowaniu testów Sidaka, odnotowano istotną różnicę statystyczną dla wariantu polimorficznego *rs1351383* (Rycina 17).

Tabela 33. Wiek diagnozy w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genie *LMP2* i *LMP7*

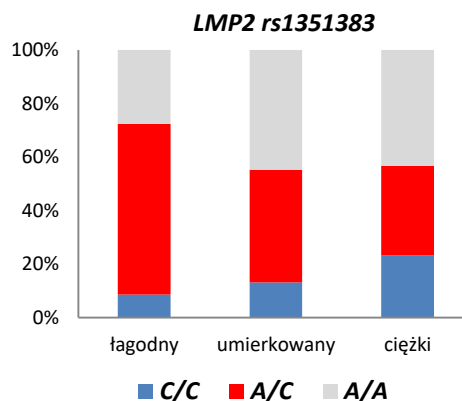
SNP	Genotyp	Średni wiek diagnozy (lata)	Odchylenie standardowe (SD)	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>LMP2</i> <i>rs1351383</i> <i>A&gt;C</i>	<i>A/A</i>	23,22	12,63	<b>8,92</b>	<b>&lt;0,001</b>
	<i>A/C</i>	15,04	12,28		
	<i>C/C</i>	15,05	9,23		
<i>LMP7</i> <i>rs2071543</i> <i>T&gt;G</i>	<i>G/G</i>	17,52	12,79	0,68	0,509
	<i>G/T</i>	20,44	11,37		
	<i>T/T</i>	15,67	8,08		



Rycina 17. Wiek badanych osób a występowanie określonych genotypów w miejscu polimorficznym *rs1351383* (mediana, min-max).

Zaobserwowano, że nosiciele allelu *C* (*A/C* i *C/C*) w miejscu polimorficznym *rs1351383* w genie *LMP2* mieli średni wiek diagnozy niższy w porównaniu do osób z genotypem *A/A* ( $p < 0,001$ ).

W kolejnym etapie analizy sprawdzono, czy stopień zaawansowania choroby mierzony współczynnikiem SCORAD jest powiązany z występowaniem określonych genotypów w miejscach polimorficznych w genach *LMP2* i *LMP7*. Wykonano analizy przy użyciu testów  $\chi^2$  lub dokładnych testów Fishera. Istotny statystycznie wynik zaobserwowano dla polimorfizmu *rs1351383* genu *LMP2*. Odnotowano, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby wzrastała częstość homozygot *C/C* (Rycina 18).



Rycina 18. Poziom zaawansowania choroby a występowanie określonych genotypów w miejscu *rs1351383*.

Siła efektu mierzona współczynnikiem *V* Cramera była niska ( $p = 0,028$ ,  $V = 0,18$ ), szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 34.

Tabela 34. Współczynnik SCORAD a polimorfizmy w genach *LMP2* i *LMP7*.

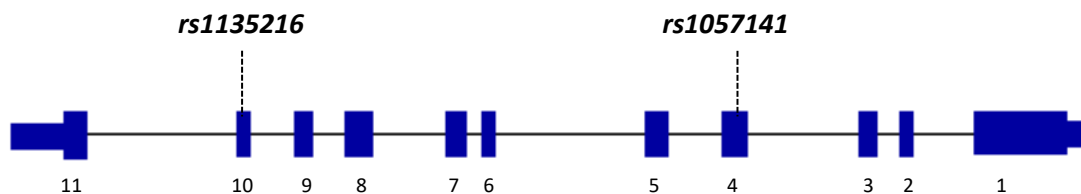
SNP	Genotyp	N (%)	SCORAD			
			Łagodny (<25)	Umiarkowany (>25<50)	Ciężki (>50)	
<i>LMP2</i> <i>rs1351383</i> <i>A&gt;C</i>	<i>A/A</i>	N (%)	16 (27,6)	34 (44,7)	13 (43,3)	$\chi^2(4) = 10,84$ $p = 0,028$ $V = 0,18$
	<i>A/C</i>	N (%)	37 (68,8)	32 (42,1)	10 (33,3)	
	<i>C/C</i>	N (%)	5 (8,6)	10 (13,2)	7 (23,3)	
<i>LMP7</i> <i>rs2071543</i> <i>T&gt;G</i>	<i>G/G</i>	N (%)	55 (87,3)	75 (81,5)	38 (88,4)	$p = 0,476$
	<i>G/T</i>	N (%)	6 (9,5)	16 (17,4)	5 (11,6)	
	<i>T/T</i>	N (%)	2 (3,2)	1 (1,1)	0 (0,0)	

Następnie przeprowadzono analizę zależności pomiędzy polimorfizmami w genach *LMP2* i *LMP7* a płcią, współwystępowaniem astmy, alergicznego nieżytu nosa i zapalenia spojówek oraz rodzinnego występowania choroby. Nie odnotowano wyników, które mogłyby wskazywać na powiązania badanych polimorfizmów z analizowanymi danymi klinicznymi.

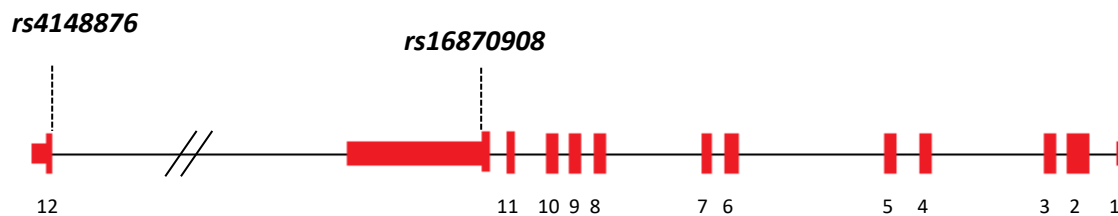
#### 4.4.2. Badanie związku polimorfizmów w genach *TAP1* i *TAP2* z podatnością na atopowe zapalenie skóry

Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu badane w genie *TAP1* i genie *TAP2* należą do polimorfizmów niesynonimicznych, w których zmiana kodowanego aminokwasu może powodować zmiany struktury lub funkcji białka. Na rysunku poniżej przedstawiono lokalizację badanych miejsc polimorficznych dla genu *TAP1*: *rs1057141* (*T>C*; Ile333Val), *rs1135216* (*T>C*; Asp637Gly) i dla genu *TAP2*: *rs16870908* (*C>T*; Leu647Phe), *rs4148876* (*C>T*; Arg651Cys).

##### *TAP1*



##### *TAP2*



Rycina 19. Lokalizacja badanych miejsc polimorficznych w genie *TAP1* i *2*).

#### 4.4.2.1. Ocena zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach *TAP1* i *TAP2* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga

Analizę zgodności rozkładu genotypów badanych polimorfizmów w genie *TAP1* i genie *TAP2* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry przedstawiono w tabeli 35. W żadnej z badanych grup nie znaleziono odstępstwa rozkładów genotypów w badanych miejscach polimorficznych od rozkładu oczekiwanego z prawa Hardy'ego - Weinberga ( $p > 0,05$ ).

Tabela 35. Analiza zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach *TAP1* i *TAP2* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na AZS.

Grupa/Genotyp	AA Wartości obserwowane (oczekiwane)	AB Wartości obserwowane (oczekiwane)	BB Wartości obserwowane (oczekiwane)	$\chi^2$	p
<b><i>TAP1 rs1057141 (T&gt;C)</i></b>					
	<i>T/T</i>	<i>T/C</i>	<i>C/C</i>		
<b>Chorzy</b>	180 (181,8)	74 (70,4)	5 (6,8)	0,686	0,4076
<b>Kontrola</b>	163 (163,6)	62 (60,7)	5 (5,6)	0,101	0,7512
<b><i>TAP1 rs1135216 (T&gt;C)</i></b>					
	<i>T/T</i>	<i>T/C</i>	<i>C/C</i>		
<b>Chorzy</b>	183 (185,3)	73 (68,4)	4 (6,3)	1,185	0,2763
<b>Kontrola</b>	177 (177,4)	50 (49,2)	3 (3,4)	0,064	0,8010
<b><i>TAP2 rs4148876 (G&gt;A)</i></b>					
	<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	<i>A/A</i>		
<b>Chorzy</b>	233 (231,3)	32 (35,3)	3 (1,3)	2,350	0,1253
<b>Kontrola</b>	204 (202,9)	25 (27,2)	2 (0,9)	1,486	0,2229
<b><i>TAP2 rs16870908 (G&gt;A)</i></b>					
	<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	<i>A/A</i>		
<b>Chorzy</b>	238 (236,7)	24 (26,5)	2 (0,7)	2,375	0,1233
<b>Kontrola</b>	206 (206,7)	25 (23,6)	0 (0,7)	0,756	0,3846

#### 4.4.2.2. Rozkład częstości genotypów i alleli w genach *TAP1* i *TAP2* w grupie pacjentów i w kontroli

Porównanie częstości genotypów i alleli w miejscach polimorficznych (*rs1057141*, *rs1135216*) w genie *TAP1* oraz (*rs4148876*, *rs16870908*) w genie *TAP2* nie wykazało istotnych różnic między grupą chorych na atopowe zapalenie skóry a grupą kontrolną. Dane dotyczące częstości badanych genotypów i alleli przedstawiono w tabeli 36.

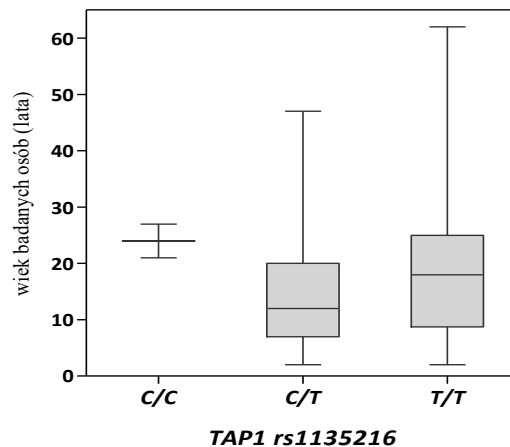
Tabela 36. Częstość badanych genotypów i alleli w genach *TAP1* i *TAP2* u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.

SNP	Genotyp/ allel	Pacjenci (N, %)	Kontrola (N,%)	OR	95%CI	$\chi^2$	p
<i>TAP1</i> <i>rs1057141</i> <i>T&gt;C</i>	<i>T/T</i>	180 (69,5)	163 (70,9)	1			
	<i>C/T</i>	74 (28,6)	62 (27,0)	1,08	0,73;1,61	0,1822	0,9129
	<i>C/C</i>	5 (1,9)	5 (2,2)	0,91	0,27; 3,01		
	<i>T</i>	434 (83,7)	388 (84,3)	1			
	<i>C</i>	84 (16,3)	72 (15,7)	0,95	0,68;1,35	0,0578	0,8100
<i>TAP1</i> <i>rs1135216</i> <i>T&gt;C</i>	<i>T/T</i>	183 (70,4)	177 (77,0)	1			
	<i>C/T</i>	73 (28,1)	50 (21,7)	1,41	0,93; 2,13	2,7171	0,2570
	<i>C/C</i>	4 (1,5)	3 (1,3)	1,24	0,30; 5,10		
	<i>T</i>	439 (83,7)	388 (84,3)	1			
	<i>C</i>	81 (16,3)	72 (15,7)	1,01	0,71;1,42	0,0010	0,9742
<i>TAP2</i> <i>rs4148876</i> <i>G&gt;A</i>	<i>G/G</i>	233 (86,9)	204 (88,3)	1			
	<i>G/A</i>	32 (11,9)	25 (10,8)	1,12	0,64;1,94	0,2420	0,8860
	<i>A/A</i>	3 (1,1)	2 (0,9)	1,23	0,24;6,28		
	<i>G</i>	498 (92,9)	433 (93,7)	1			
	<i>A</i>	38 (7,1)	29 (6,3)	0,87	0,53;1,44	0,2616	0,6091
<i>TAP2</i> <i>rs16870908</i> <i>G&gt;A</i>	<i>G/G</i>	238 (90,2)	206 (88,4)	1			
	<i>G/A</i>	24 (9,1)	25 (10,7)	0,83	0,46;1,49	0,3946	0,8209
	<i>A/A</i>	2 (0,8)	2 (0,9)	0,87	0,15;5,05		
	<i>G</i>	498 (92,9)	433 (93,7)	1			
	<i>A</i>	38 (7,1)	29 (6,3)	0,87	0,53;1,44	0,2616	0,6091



#### 4.4.2.3. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach *TAP* (1 i 2) a danymi klinicznymi

Przeprowadzono analizę zależności pomiędzy cechami klinicznymi badanych pacjentów takimi jak wiek, płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby, chorobami współistniejącymi oraz badanymi polimorfizmami w genach *TAP* (1 i 2). Spośród dwóch badanych niesynonimicznych polimorfizmów w genie *TAP1* i dwóch w genie *TAP2* tylko jeden *rs1135216* w genie *TAP1* miał związek z wiekiem diagnozy chorych na atopowe zapalenie skóry. Wykonano analizy przy użyciu jednoczynnikowych analiz wariancji, porównując wiek osób badanych w grupach o różnych wariantach genotypu. Zaobserwowano jedną istotną statystycznie różnicę, wykonano analizę *post-hoc* przy użyciu testów Sidaka. Wyniki analizy wykazały, że osoby będące homozygotami *T/T* w miejscu polimorficznym *rs1135216* były diagnozowane w późniejszym wieku niż osoby z genotypem *C/T* ( $p=0,033$ ). Z uwagi na niewielką liczebność homozygot *C/C* (tylko 2 osoby) grupa ta nie różniła się od pozostałych (Rycina 20).



Rycina 20. Wiek diagnozy badanych osób a występowanie określonych genotypów w miejscu *rs1135216* (mediana, min-max).

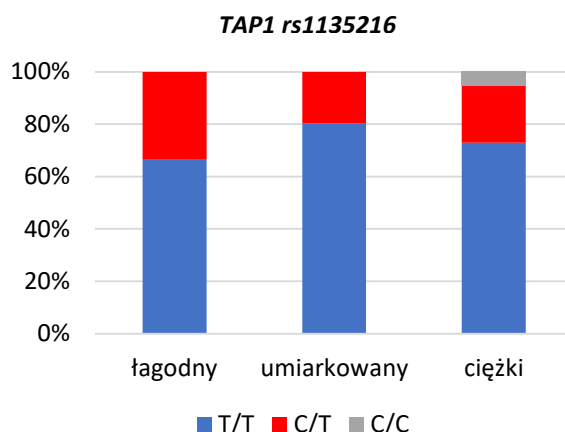
W przypadku pozostałych badanych polimorfizmów w genach *TAP* (1 i 2) nie wykazano, aby miały one związek z wiekiem diagnozy pacjentów z AZS (Tabela 37).

## WYNIKI

Tabela 37. Wiek diagnozy w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genach *TAP1* i *TAP2*.

SNP	Genotyp	Średni wiek diagnozy (lata)	Odchylenie standardowe (SD)	F	p
<i>TAP1</i> <i>rs1057141</i>	<i>T/T</i>	20,62	13,80	6,24	0,132
	<i>C/T</i>	13,3	7,88		
	<i>T&gt;C</i>	27	15,56		
<i>TAP1</i> <i>rs1135216</i>	<i>T/T</i>	19,64	13,43	<b>3,48</b>	<b>0,033</b>
	<i>C/T</i>	14	9,46		
	<i>C/C</i>	24	4,24		
<i>TAP2</i> <i>rs4148876</i>	<i>G/G</i>	18,2	12,87	2,82	0,062
	<i>G/A</i>	13,36	9,76		
	<i>G&gt;A</i>	7,33	3,21		
<i>TAP2</i> <i>rs16870908</i>	<i>G/G</i>	17,62	12,52	0,27	0,973
	<i>G/A</i>	18,05	14,77		
	<i>G&gt;A</i>	14,18	8,727		

W kolejnym etapie sprawdzono, czy stopień zaawansowania choroby mierzony współczynnikiem SCORAD jest powiązany z występowaniem określonych genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genach *TAP1* i *TAP2*. Wykonano analizy przy użyciu testów  $\chi^2$  lub dokładnych testów Fishera. Dla większości badanych polimorfizmów nie zaobserwowano związku polimorfizmów ze stopniem zaawansowania choroby. Wyjątek stanowił genotyp homozygotyczny *C/C* w miejscu polimorficznym *rs1135216* genu *TAP1* - odnotowano, że genotyp ten występował tylko u pacjentów z ciężkim przebiegiem AZS, u których współczynnik SCORAD > 50 (Rycina 21). Siła efektu mierzona współczynnikiem *V* Cramera była jednak niska z powodu bardzo małej liczby osób z tym genotypem (2 osoby), ( $p=0,046$ ,  $V=0,18$ ).



Rycina 21. Poziom zaawansowania choroby (SCORAD) a występowanie określonych genotypów w miejscu *rs1135216*.

WYNIKI

Tabela 38. Współczynnik SCORAD w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genie *TAP1* i *TAP2*.

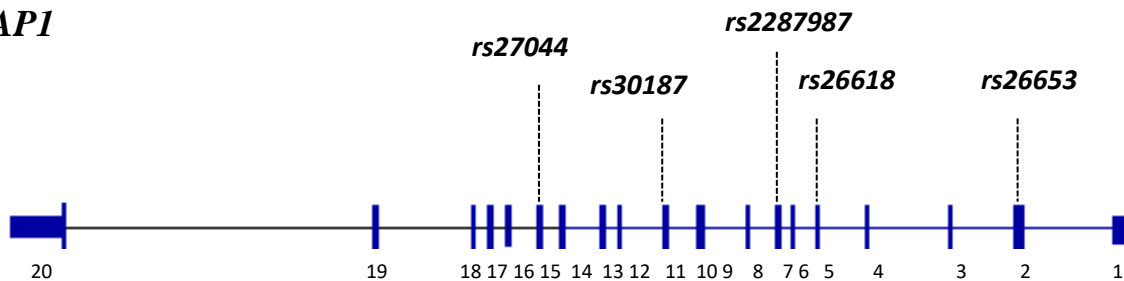
SNP	Genotyp	SCORAD			
		Łagodny (<25)	Umiarkowany (>25<50)	Ciężki (>50)	
<i>TAP1</i> <i>rs1057141</i> <i>T&gt;C</i>	<i>T/T</i>	29 (58,0%)	57 (68,7%)	28 (71,8%)	<i>p</i> = 0,372
	<i>C/T</i>	21 (42,0%)	24 (28,9%)	11 (28,2%)	
	<i>C/C</i>	0 (0,0%)	2 (2,4%)	0 (0,0%)	
<i>TAP1</i> <i>rs1135216</i> <i>T&gt;C</i>	<i>T/T</i>	38 (66,7%)	65 (80,2%)	27 (73,0%)	<b><i>p</i> = 0,046</b> <b><i>V</i> = 0,18</b>
	<i>C/T</i>	19 (33,3%)	16 (19,8%)	8 (21,6%)	
	<i>C/C</i>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (5,4%)	
<i>TAP2</i> <i>rs4148876</i> <i>G&gt;A</i>	<i>G/G</i>	53(80,3%)	83 (85,6%)	39 (91,0%)	<i>P</i> =0,508
	<i>G/A</i>	11 (16,7%)	13 (13,4%)	4 (9,0%)	
	<i>A/A</i>	2 (3,0%)	1 (1,0%)	0 (0,0%)	
<i>TAP2</i> <i>rs16870908</i> <i>G&gt;A</i>	<i>G/G</i>	55 (87,3%)	85 (88,5%)	40 (90,9%)	<i>P</i> =0,487
	<i>G/A</i>	7 (11,1%)	10 (10,4%)	4 (9,1%)	
	<i>A/A</i>	1 (1,6%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	

Następnie przeprowadzono analizę zależności pomiędzy polimorfizmami w genach *TAP1* i *TAP2* a pozostałymi danymi klinicznymi. Nie odnotowano wyników, które mogłyby wskazywać na związek badanych polimorfizmów z analizowanymi danymi klinicznymi.

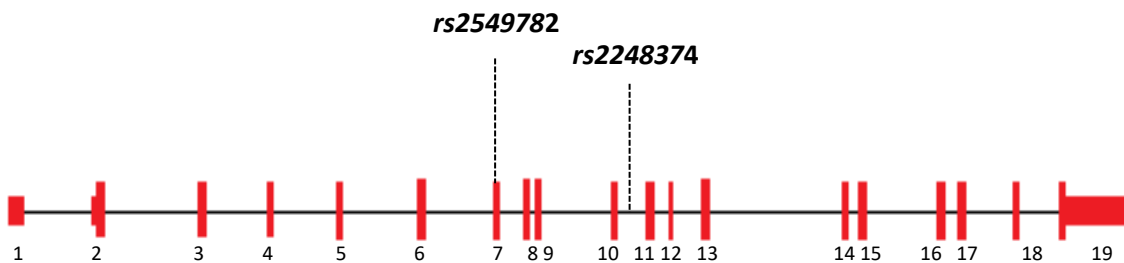
#### 4.4.3. Badanie związku polimorfizmów *ERAP1* i *ERAP2* z podatnością na atopowe zapalenie skóry

Wszystkie badane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w genie *ERAP1* były zlokalizowane w regionach kodujących, w których zmiana kodowanego aminokwasu może powodować zmiany struktury lub funkcji białka. Natomiast w genie *ERAP2*, jedno z badanych miejsc polimorficznych znajdowało się w regionie kodującym, natomiast drugie w sekwencji niekodującej. Lokalizację badanych miejsc polimorficznych dla genu *ERAP1*: *rs26653* (*G>C*; Arg127Pro), *rs26618* (*T>C*; Ile276Met), *rs2287987* (*T>C*; Met349Val), *rs30187* (*C>T*; Lys528Arg), *rs27044* (*C>G*; Gln730Glu) i dla genu *ERAP2*: *rs2549782* (*G>T*; Lys392Asn), *rs2248374* (*A>G*; Intron 10) przedstawiono na rysunku poniżej.

##### *ERAP1*



##### *ERAP2*



Rycina 22. Lokalizacja badanych miejsc polimorficznych w genie *ERAP1* i *ERAP2*.

#### 4.4.3.1. Ocena zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach *ERAP1* i *ERAP2* z rozkładem Hardy'ego – Weinberga

Ocenę zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genie *ERAP1* i genie *ERAP2* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry przedstawiono w tabeli 39. W żadnej z badanych grup nie znaleziono odstępstwa rozkładów genotypów genów *ERAP1* i *ERAP2* od rozkładu oczekiwanego z prawa Hardy'ego - Weinberga ( $p > 0,05$ ).

Tabela 39. Analiza zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach *ERAP1* i *ERAP2* z rozkładem Hardy'ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na AZS.

Grupa/Genotyp	AA Wartości obserwowane (oczekiwane)	AB Wartości obserwowane (oczekiwane)	BB Wartości obserwowane (oczekiwane)	$\chi^2$	p
<b><i>ERAP1 rs26618 T&gt;C</i></b>					
	<i>T/T</i>	<i>T/C</i>	<i>C/C</i>		
<b>Chorzy</b>	144 (142,6)	138 (140,7)	36 (34,6)	0,114	0,7359
<b>Kontrola</b>	189 (185,8)	121 (127,3)	25 (21,8)	0,835	0,3610
<b><i>ERAP1 rs26653 G&gt;C</i></b>					
	<i>G/G</i>	<i>G/C</i>	<i>C/C</i>		
<b>Chorzy</b>	171 (173,8)	129 (123,3)	19 (21,8)	0,685	0,4079
<b>Kontrola</b>	175 (176,9)	137 (133,0)	23 (24,9)	0,300	0,5836
<b><i>ERAP1 rs30187 C&gt;T</i></b>					
	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	<i>T/T</i>		
<b>Chorzy</b>	135 (142,2)	156 (141,5)	28 (35,2)	3,322	0,0684
<b>Kontrola</b>	150 (144,4)	140 (151,0)	45 (39,4)	1,791	0,1808
<b><i>ERAP1 rs27044 C&gt;G</i></b>					
	<i>C/C</i>	<i>C/G</i>	<i>G/G</i>		
<b>Chorzy</b>	165 (162,0)	124 (129,9)	29 (26,0)	0,660	0,4166
<b>Kontrola</b>	188 (184,3)	121 (128,3)	26 (22,3)	1,093	0,2958
<b><i>ERAP1 rs2287987 T&gt;C</i></b>					
	<i>T/T</i>	<i>T/C</i>	<i>C/C</i>		
<b>Chorzy</b>	119 (119,5)	75 (74,1)	11 (11,5)	0,033	0,8544
<b>Kontrola</b>	208(206,3)	105 (108,5)	16 (14,3)	0,337	0,5611
<b><i>ERAP2 rs2248374 A&gt;G</i></b>					
	<i>A/A</i>	<i>A/G</i>	<i>G/G</i>		
<b>Chorzy</b>	90 (84,6)	146 (156,8)	78 (72,6)	1,482	0,2234
<b>Kontrola</b>	89 (81,3)	162 (167,5)	84 (86,3)	0,356	0,5504
<b><i>ERAP2 rs2549782 G&gt;T</i></b>					
	<i>G/G</i>	<i>G/T</i>	<i>T/T</i>		
<b>Chorzy</b>	89(83,85)	146 (156,3)	78 (72,85)	1,361	0,2434
<b>Kontrola</b>	89 (81,3)	162 (167,5)	84 (86,3)	0,356	0,5504

#### 4.4.3.2. Rozkład częstości genotypów i alleli w genach *ERAP1* i *ERAP2* w grupie pacjentów i w kontroli

Analiza badanych wariantów polimorficznych w genie *ERAP1* (*rs26618*, *rs26653*, *rs30187*, *rs27044* i *rs2287987*) i w genie *ERAP2* (*rs2549782* i *rs2248374*) dla większości badanych miejsc polimorficznych nie wykazała różnic w rozkładzie częstości genotypów i alleli między osobami z atopowym zapaleniem skóry i grupą kontrolną. Wyjątek stanowił wariant genetyczny *rs26618*, analiza genotypów w tym miejscu polimorficznym wykazała różnicę w rozkładzie częstości genotypów między chorymi a grupą kontrolną ( $\chi^2 = 8,7438$ ;  $p=0,0126$ ). W populacji chorych 144 osoby (45%) były homozygotami *T/T*, 138 osób było heterozygotami *C/T* (43,3%), natomiast u 36 chorych stwierdzono genotyp *C/C* (11,3%). W grupie kontrolnej u 189 osób stwierdzono genotyp *T/T* (56,4%), 121 badanych osób było heterozygotami *C/T* (36,1%), a genotyp *C/C* stwierdzono u 25 osób (7,5%). Osoby będące heterozygotami *C/T* i homozygotami *C/C* miały większe ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry w porównaniu z homozygotami *T/T* (OR odpowiednio 1,49;1,87). Zaobserwowano również różnicę w częstościach alleli pomiędzy badanymi grupami ( $\chi^2=8.874$ , 1;  $p=0,0029$ ). Wykazano, że allel *C* w grupie chorych występował z wyższą częstością (33%) w porównaniu do grupy kontrolnej (25,5%). Nosicielstwo allelu *C* w miejscu polimorficznym *rs26618* zwiększało ryzyko zachorowania około 1,5 raza na AZS (OR=1,43, CI95% =1,13;1,82). Rozkład częstości genotypów i alleli w badanych grupach przedstawiono w tabeli 40.

Tabela 40. Częstość badanych genotypów i alleli genów *ERAP1* i *ERAP2* u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.

SNP	Genotyp/allel	Pacjenci N(%)	Kontrola N(%)	OR	CI95%	$\chi^2$	p
<i>ERAP1</i> <i>rs26618</i> <i>T&gt;C</i>	<i>T/T</i>	144 (45,3)	189 (56,4)	1			
	<i>C/T</i>	138 (43,4)	121 (36,1)	<b>1,49</b>	<b>1,07; 2,07</b>	<b>8,7438</b>	<b>0,0126</b>
	<i>C/C</i>	36 (11,3)	25 (7,5)	<b>1,87</b>	<b>1,08; 3,25</b>		
	<i>T</i>	426 (67,0)	499 (74,5)				
	<i>C</i>	210 (33,0)	171 (25,5)	<b>1,43</b>	<b>1,13; 1,82</b>	<b>8,8741</b>	<b>0,0029</b>
<i>ERAP1</i> <i>rs26653</i> <i>G&gt;C</i>	<i>G/G</i>	171 (53,6)	175 (52,2)	1			
	<i>G/C</i>	129 (40,4)	137 (40,9)	0,96	0,70; 1,33	0,2765	0,8709
	<i>C/C</i>	19 (6,0)	23 (6,9)	0,85	0,45; 1,60		

WYNIKI

	<b>G</b>	471 (73,8)	487 (72,7)				
	<b>C</b>	167 (26,2)	183 (27,3)	0,9436	0,73; 1,206	0,2159	0,6422
<b>ERAP1</b> <b>rs30187</b> <b>C&gt;T</b>	<b>C/C</b>	135 (42,3)	150 (44,8)	1			
	<b>C/T</b>	156 (48,9)	140 (41,8)	1,24	0,89; 1,71		
	<b>T/T</b>	28 (8,8)	45 (13,4)	0,70	0,41; 1,17	5,2249	0,0734
	<b>C</b>	426 (67,7)	440 (65,7)				
	<b>T</b>	212 (33,3)	230 (34,3)	1,050	0,83; 1,32	0,1766	0,6743
<b>ERAP1</b> <b>rs27044</b> <b>C&gt;G</b>	<b>C/C</b>	165 (51,9)	188 (56,1)	1			
	<b>C/G</b>	124 (39,0)	121 (36,1)	1,17	0,84 ; 1,62	1,2572	0,5333
	<b>G/G</b>	29 (9,1)	26(7,8)	1,27	0,72; 2,23		
	<b>C</b>	454 (71,1)	497(74,2)				
	<b>G</b>	184 (28,9)	173 (25,8)	0,85	0,67; 1,1	1,501	0,2205
<b>ERAP1</b> <b>rs2287987</b> <b>T&gt;C</b>	<b>T/T</b>	119 (58,0)	208 (63,2)	1			
	<b>C/T</b>	75 (36,6)	105 (31,9)	1,25	0,86; 1,81		
	<b>C/C</b>	11 (5,4)	16 (4,9)	1,22	0,55; 2,67	1,4324	0,4886
	<b>T</b>	313 (76,3)	521 (79,2)				
	<b>C</b>	97 (23,7)	137 (20,8)	0,84	0,63; 1,14	1,189	0,2755
<b>ERAP2</b> <b>rs2248374</b> <b>A&gt;G</b>	<b>G/G</b>	78 (24,8)	84 (25,1)	1			
	<b>A/G</b>	146 (46,5)	162 (48,4)	0,97	0,61; 1,42	0,3799	0,8270
	<b>A/A</b>	90 (28,7)	89 (26,5)	1,10	0,71; 1,67		
	<b>G</b>	302 (48,10)	330 (49,0)				
	<b>A</b>	326 (51,9)	340 (51,0)	1,04	0,84; 1,30	0,1760	0,6749
<b>ERAP2</b> <b>rs2549782</b> <b>T&gt;G</b>	<b>T/T</b>	78 (24,8)	84 (25,1)	1			
	<b>G/T</b>	146 (46,6)	163 (48,7)	0,96	0,66; 1,41	0,4167	0,8119
	<b>G/G</b>	89 (28,4)	88 (26,3)	1,09	0,71; 1,67		
	<b>T</b>	302 (48,4)	340 (52,1)				
	<b>G</b>	324 (51,6)	330 (47,9)	0,94	0,76; 1,18	1,670	0,6828

#### 4.4.3.3. Rozkład genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* wśród pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i w grupie osób kontrolnych w zależności od obecności genu *KIR2DS1*

Wykazano ochronne działanie genu *KIR2DS1* u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry oraz różnicę w rozkładzie częstości genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* w genie *ERAP1*. Dlatego w kolejnym etapie analizy sprawdzono czy warianty polimorficzne *rs26618* w genie *ERAP1* mają związek z obecnością lub brakiem genu *KIR2DS1*. Porównanie rozkładu częstości genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* w genie *ERAP1* u osób posiadających gen *KIR2DS1* w grupie chorych i w kontroli nie wykazało istotnych statystycznie różnic ( $\chi^2=1,425$ ;  $p=0,490$ ). Wyniki analizy genotypów w badanych grupach przedstawiono w tabeli 41.

Tabela 41. Rozkład genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* wśród pacjentów z AZS i w grupie kontrolnej w zależności od obecności genu *KIR2DS1*.

<i>rs26618</i>	<i>KIR2DS1</i> <sup>+</sup>		
	Pacjenci (N=90;%)	Kontrola (N=139;%)	OR (95% CI)
<i>T/T</i>	43 (47,8)	75 (54,0)	1
<i>C/T</i>	42 (46,6)	54 (38,8)	1,35 (0,78; 2,34)
<i>C/C</i>	5 (5,6)	10 (7,2)	0,91 (0,30; 2,72)
$\chi^2=1,425$ ; $p=0,490$			

Natomiast analiza rozkładu genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej u osób nieposiadających genu *KIR2DS1* wykazała różnicę w częstości genotypów pomiędzy badanymi grupami ( $\chi^2=8,157$ ;  $p=0,017$ ). Częstość heterozygot *C/T* w grupie chorych wynosiła 41,3%, natomiast w grupie kontrolnej 34,1%. Z kolei homozygoty z genotypem *C/C* wystąpiły z częstością 13,9 % w grupie pacjentów i z częstością 7,7% w grupie kontrolnej (Tabela 42). W grupie osób nieposiadających genu *KIR2DS1* osoby będące heterozygotami *C/T* miały 1,5 razy większe ryzyko zachorowania niż osoby posiadające genotyp homozygotyczny *T/T* (OR=1,57 CI95%=1,02;2,41). Natomiast u osób z genotypem homozygotycznym *C/C* ryzyko zachorowania było ponad 2-krotnie wyższe (OR= 2,30; CI95%= 1,16;4,55).



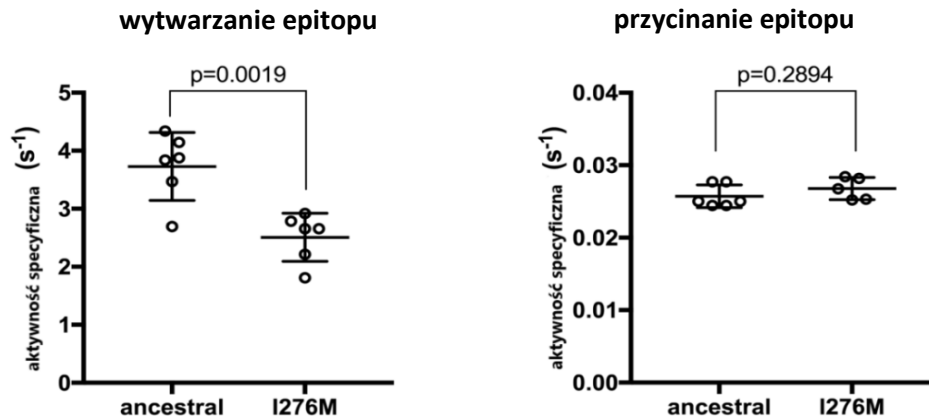
Tabela 42. Rozkład genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* wśród pacjentów i w grupie kontrolnej negatywnych pod względem genu *KIR2DS1*.

<i>rs26618</i>	<i>KIR2DS1</i>		
	Pacjenci (N=194 %)	Kontrola (N=194;%)	OR (95% CI)
<i>T/T</i>	87 (44,8)	113 (58,2)	1
<i>C/T</i>	80 (41,3)	66 (34,1)	<b>1,57 (1,02;2,41)</b>
<i>C/C</i>	27 (13,9)	15 (7,7)	<b>2,30 (1,16;4,55)</b>
$\chi^2=8,157$ ; $p=0,017$			

#### 4.4.3.4. Badanie aktywności enzymatycznej wariantów ERAP1 w miejscu polimorficznym *rs26618* (Ile276Met) wobec prekursora epitopu HLA-C\*05:01

Zaobserwowano związek polimorfizmu *rs26618* z ryzykiem zachorowania na AZS. Brak jednak danych dotyczących biologicznej funkcji tego polimorfizmu. Dlatego na kolejnym etapie badań przetestowano aktywność enzymatyczną dwóch wariantów, różniących się w pozycji 276 (Ile lub Met) wobec N-końcowo wydłużonego prekursora LIVDRPVTLV liganda HLA-C \*05:01 IVDRPVTLV.

Analiza genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* (Ile276Met) w genie ERAP1 wykazała różnicę w rozkładzie częstości genotypów między osobami z atopowym zapaleniem skóry i grupą kontrolną ( $\chi^2 = 8,7438$ ;  $p=0,0126$ ). Porównanie aktywności enzymatycznej dwóch wariantów aminopeptydazy różniących się tylko w pozycji 276 (Ile lub Met) wobec prekursora epitopu HLA-C\*05:01 wykazało, że oba warianty ERAP1 były w stanie skutecznie wygenerować epitop IVDRPVTLV z prekursorowego peptydu LIVDRPVTLV. Jednak allotyp z izoleucyną w pozycji 276 był w stanie wygenerować ten epitop około 50% szybciej (Rycina 25, lewy panel). Oba warianty były mniej skuteczne w przycinaniu dojrzałego epitopu do mniejszych peptydów. Kinetyka ich była 100-krotnie wolniejsza w porównaniu do generowania epitopu, ale z bardzo podobnymi prędkościami dla obu wariantów (Rycina 25, prawy panel).



Rycina 23. Aktywność wariantu Ile276Met aminopeptydazy ERAP1. Lewy panel: N-końcowe przycinanie prekursora epitopu LIVDRPVTLV HLA-C\*05:01. Prawy panel: Przycinanie epitopu IVDRPVTLV (Niepiekło-Miniewska i in., 2019).

#### 4.4.3.5. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genie *ERAP2* (*rs2248374*) i *ERAP1* (*rs26618*)

Analiza badanych wariantów genetycznych w genie *ERAP1* wykazała związek polimorfizmu *rs26618* z ryzykiem zachorowania na AZS. Ponieważ *ERAP1* może działać jako homodimer lub heterodimer z *ERAP2*, co może oddziaływać na funkcję enzymu *ERAP1*, dlatego sprawdzono czy polimorfizm *rs2248374* *ERAP2*, który kontroluje ekspresję białka *ERAP2* wpływa na efekt polimorfizmu *rs26618* związanego z ryzykiem zachorowania na AZS.

Rozkład genotypów dla wariantu polimorficznego *rs2248374* *ERAP2* nie różnił się pomiędzy badaną grupą chorych a grupą kontrolną. Natomiast analiza genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* *ERAP1*, wykazała różnicę w rozkładzie częstości genotypów między chorymi a grupą kontrolną. Osoby będące heterozygotami *C/T* i homozygotami *C/C* miały większe ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry w porównaniu z homozygotami *T/T*. Szczegółowe dane zamieszczono w tabeli poniżej.

## WYNIKI

Tabela 43. Rozkład genotypów dla wariantów polimorficznych *ERAP2*-rs2248374 i *ERAP1*-rs26618 w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i grupie kontrolnej.

SNP	Genotyp	AZS N(%)	Kontrola N(%)	OR	CI95%	$\chi^2$	p
<i>ERAP2</i> rs2248374	<i>G/G</i>	78 (24,8)	84 (25,1)	1			
	<i>A/G</i>	146 (46,5)	163 (48,4)	0,96	0,66; 1,42	0,03	0,853
	<i>G&gt;A</i> <i>A/A</i>	90 (28,7)	88 (26,5)	1,10	0,72; 1,69	0,19	0,657
<i>ERAP1</i> rs26618	<i>T/T</i>	141 (45,3)	189 (56,4)	1			
	<i>C/T</i>	138 (43,4)	121 (36,1)	<b>1,53</b>	<b>1,10; 2,12</b>	<b>6,48</b>	<b>0,011</b>
	<i>T&gt;C</i> <i>C/C</i>	35 (11,3)	25 (7,5)	<b>1,88</b>	<b>1,07; 3,28</b>	<b>4,99</b>	<b>0,025</b>

Analiza rozkładu kombinacji genotypów *ERAP2-ERAP1* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i grupie kontrolnej wykazała różnicę w częstości genotypów pomiędzy badanymi grupami tylko dla kombinacji *ERAP2 rs2248374\*A/A - ERAP1 rs26618\*C/C* ( $p=0,004$ , OR =3,36, CI95% =1,41;8,02). Dla pozostałych kombinacji genotypów nie wykazano istotnych różnic w rozkładzie pomiędzy badanymi grupami, szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 44.

Tabela 44. Rozkład genotypów *ERAP2-ERAP1* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i grupie kontrolnej.

<i>ERAP2</i> rs2248374	<i>ERAP1</i> rs26618	AZS N (%)	Kontrola N(%)	p	OR	95%CI
<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	<b>21 (6,7)</b>	<b>7 (2,1)</b>	<b>0,004</b>	<b>3,36</b>	<b>1,41;8,02</b>
<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	38 (12,1)	44 (13,1)	0,781	0,91	0,57;1,45
<i>A/A</i>	<i>T/T</i>	31 (9,8)	38 (11,3)	0,631	0,86	0,52;1,41
<i>A/G</i>	<i>C/C</i>	8 (2,5)	11 (3,3)	0,746	0,77	0,31;1,94
<i>A/G</i>	<i>C/T</i>	79 (25,1)	66 (19,7)	0,115	1,37	0,95;1,98
<i>A/G</i>	<i>T/T</i>	59 (18,8)	85 (25,4)	0,054	0,68	0,47;0,99
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	6 (1,9)	7 (2,1)	0,906	0,91	0,30;2,75
<i>G/G</i>	<i>C/T</i>	21 (6,7)	11 (3,2)	0,068	2,11	1,00;4,45
<i>G/G</i>	<i>TT</i>	51 (16,2)	66 (19,8)	0,296	0,79	0,53;1,18

Synergistyczny efekt polimorfizmów *rs2248374 ERAP2* i *rs26618 ERAP1* obserwowano tylko dla genotypu *ERAP2 rs2248374\*A/A - ERAP1 rs26618\*C/C* (Rycina 26). Osoby z genotypem homozygotycznym *ERAP2 rs2248374\*A/A - ERAP1 rs26618\*C/C* miały ponad 3-krotnie wyższe ryzyko zachorowania niż osoby z pozostałymi genotypami. Iloraz szans (OR) wzrastał od 1,10 dla *ERAP2 rs2248374\*A/A* i 1,88 dla *ERAP1 rs26618\*C/C* (Tabela 43) do 3,36 dla kombinacji genotypów *ERAP2 rs2248374\*A/A - ERAP1 rs26618\*C/C* (Tabela 44).



Rycina 24. Synergistyczny efekt polimorfizmów *rs2248374ERAP2* i *rs26618ERAP1* w AZS.

#### 4.4.3.6. Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach *ERAP* (1 i 2) a danymi klinicznymi

Przeanalizowano zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami w genach *ERAP* (1 i 2) oraz cechami klinicznymi badanych pacjentów takimi jak wiek diagnozy, płeć, współczynnik SCORAD, rodzinne występowanie choroby oraz choroby współistniejące. Analiza siedmiu polimorfizmów w genie *ERAP* (pięciu w genie *ERAP1* i dwóch w genie *ERAP2*) wykazała tylko, że występowanie określonych genotypów w miejscu polimorficznym *rs27044* w genie *ERAP1* miało związek z wiekiem diagnozy chorych na atopowe zapalenie skóry. Wykonano jednoczynnikowe analizy wariancji, porównując wiek osób badanych w grupach o różnych wariantach genotypu. Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 45.

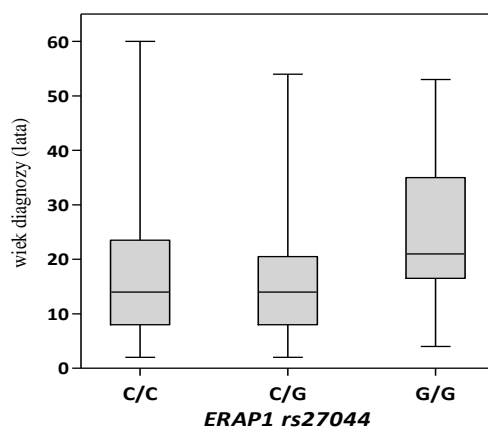
Tabela 45. Wiek badanych a występowanie określonych genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genach *ERAP1* i *ERAP2*.

SNP	Genotyp	Średni wiek zachorowania (lata)	Odchylenie standardowe (SD)	F	p
<i>ERAP1 rs26618</i> <i>T&gt;C</i>	<i>T/T</i>	18,27	12,47	0,97	0,381
	<i>C/T</i>	17,51	12,46		
	<i>C/C</i>	21,70	15,39		
<i>ERAP1 rs26653</i> <i>G&gt;C</i>	<i>G/G</i>	18,73	13,70	1,83	0,163
	<i>G/C</i>	17,18	11,51		
	<i>C/C</i>	25,67	11,82		
<i>ERAP1 rs30187</i> <i>C&gt;T</i>	<i>C/C</i>	19,36	13,48	0,46	0,634
	<i>C/T</i>	17,53	12,62		
	<i>T/T</i>	18,50	11,64		
<i>ERAP1 rs27044</i> <i>C&gt;G</i>	<i>C/C</i>	<b>17,59</b>	<b>13,03</b>	<b>3,74</b>	<b>0,026</b>
	<i>C/G</i>	<b>15,51</b>	<b>10,19</b>		
	<i>G/G</i>	<b>24,59</b>	<b>14,15</b>		
<i>ERAP1 rs2287987</i> <i>C&gt;T</i>	<i>T/T</i>	19,02	13,86	1,26	0,287
	<i>C/T</i>	19,68	12,84		
	<i>C/C</i>	12,22	7,76		

## WYNIKI

<b>ERAP2 rs2248374</b> <b>A&gt;G</b>	<b>A/A</b>	16,46	11,16		
	<b>A/G</b>	18,06	13,05	0,87	0,419
	<b>G/G</b>	19,74	13,98		
<b>ERAP2 rs2549782</b> <b>T&gt;G</b>	<b>T/T</b>	16,46	11,16		
	<b>T/G</b>	18,06	13,05	0,87	0,419
	<b>G/G</b>	19,74	13,98		

Istotny statystycznie wynik wykazano tylko dla *rs27044*. Po wykonaniu analizy *post-hoc* przy zastosowaniu testów Sidaka, zaobserwowano istotną różnicę statystyczną w przypadku *rs27044*. Wykazano, że homozygoty *G/G* w miejscu polimorficznym *rs27044* były diagnozowane w późniejszym wieku niż heterozygoty *G/C* i homozygoty *C/C* ( $p=0,026$ ), co przedstawiono na rycinie poniżej.



Rycina 25. Wiek badanych osób a występowanie określonych genotypów w miejscu *rs27044* (mediana, min-max)

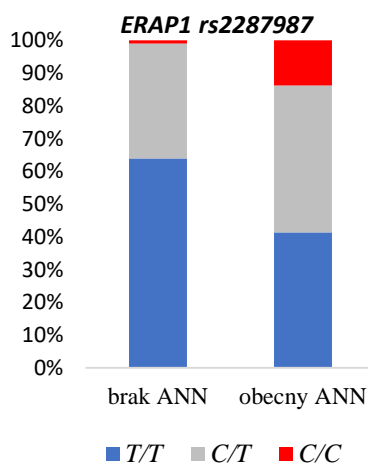
W kolejnym etapie sprawdzono, czy występowanie chorób współistniejących jest powiązane z występowaniem określonych genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genach *ERAP1* i *ERAP2*. Wykonano analizy przy użyciu testów  $\chi^2$  bądź też dokładnych testów Fishera. Dla większości badanych wariantów genetycznych w genach *ERAP1* i *ERAP2* nie wykazano żadnych zależności pomiędzy genotypami a występowaniem chorób współistniejących z wyjątkiem alergicznego nieżytu nosa, dane przedstawiono w tabeli poniżej.

WYNIKI

Tabela 46. Współwystępowanie alergicznego nieżytu nosa w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznym w genach *ERAP1* i *ERAP2*.

SNP	Genotyp	Alergiczny nieżyt nosa (ANN)		
		nie	tak	
<i>ERAP1 rs26618</i> T>C	T/T	57 (44,90%)	35 (47,90%)	$\chi^2(2) = 0,18$ p = 0,915
	C/T	55 (43,30%)	30 (41,10%)	
	C/C	15 (11,80%)	8 (11,00%)	
<i>ERAP1 rs26653</i> G>C	G/G	71 (55,90%)	44 (59,50%)	$\chi^2(2) = 0,93$ p = 0,627
	G/C	49 (38,60%)	28 (37,80%)	
	C/C	7 (5,50%)	2 (2,70%)	
<i>ERAP1 rs30187</i> C>T	C/C	57 (44,90%)	32 (43,80%)	$\chi^2(2) = 0,54$ p = 0,762
	C/T	60 (47,20%)	33 (45,20%)	
	T/T	10 (7,90%)	8 (11,00%)	
<i>ERAP1 rs27044</i> C>G	C/C	60 (52,20%)	41 (60,30%)	$\chi^2(2) = 1,76$ p = 0,414
	C/G	45 (39,10%)	20 (29,40%)	
	G/G	10 (8,70%)	7 (10,30%)	
<i>ERAP1 rs2287987</i> T>C	T/T	<b>62 (63,90%)</b>	<b>24 (41,40%)</b>	$\chi^2(2) = 14,40$ <b>p &lt; 0,001</b> <b>V = 0,31</b>
	C/T	<b>34 (35,10%)</b>	<b>26 (44,80%)</b>	
	C/C	<b>1 (1,00%)</b>	<b>8 (13,80%)</b>	
<i>ERAP2 rs2248374</i> A>G	A/A	27 (21,60%)	23 (31,10%)	$\chi^2(2) = 3,42$ p = 0,181
	A/G	63 (50,40%)	28 (37,80%)	
	G/G	35 (28,00%)	23 (31,10%)	
<i>ERAP2 rs2549782</i> T>G	T/T	27 (21,60%)	23 (31,10%)	$\chi^2(2) = 3,42$ p = 0,181
	T/G	63 (50,40%)	28 (37,80%)	
	G/G	35 (28,00%)	23 (31,10%)	

Zaobserwowano, że homozygoty T/T w miejscu polimorficznym rs2287987 w genie *ERAP1* występowały rzadziej u osób z współwystępującym alergicznym nieżytem nosa (p < 0,001). Siła tego związku była umiarkowanie duża (V=0,31).



Rycina 26. Występowanie alergicznego nieżytu nosa (ANN) oraz występowanie określonych genotypów w miejscu *rs2287987*.

Przeprowadzona analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach *ERAP1* i *ERAP2* oraz pozostałymi cechami klinicznymi nie wykazała powiązań badanych polimorfizmów z analizowanymi danymi klinicznymi.

## 5. DYSKUSJA

Atopowe zapalenie skóry jest złożoną chorobą o wieloczynnikowym podłożu, w której oprócz czynników środowiskowych kluczową rolę odgrywają predyspozycje genetyczne. Ponieważ w patogenezie AZS obserwuje się nieprawidłową regulację odpowiedzi immunologicznej, dlatego geny zaangażowane w odpowiedź immunologiczną wydają się być wiarygodnymi kandydatami do badań dotyczących podatności na atopowe zapalenie skóry. Dlatego też do badań wybrałam geny receptorów KIR oraz ich ligandy (cząsteczki HLA klasy I). Na skuteczną prezentację antygenów w postaci peptydów związanych przez HLA klasy I może mieć wpływ polimorfizm genów *LMP2*, *LMP7*, *TAP1*, *TAP2*, *ERAP1* i *ERAP2* wchodzących w skład tzw. maszynerii prezentacji antygeny (APM), które również były przedmiotem moich badań.

Pomimo dość dokładnie poznanych mechanizmów immunologicznych AZS, rola komórek NK w rozwoju tej choroby jest bardzo słabo udokumentowana i poznana. W literaturze nie ma również doniesień dotyczących związku cząsteczek KIR i kodujących je genów z atopowym zapaleniem skóry. W badaniach przedstawionych w niniejszej dysertacji wykazałam ochronne działanie genu *KIR2DS1* u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (OR=0,629). W przypadku pozostałych genów *KIR* nie wykazałam istotnych różnic w rozkładzie częstości pomiędzy grupą badaną i kontrolną. W innych chorobach skóry takich jak łuszczyca czy łuszcycowe zapalenie stawów (Kuśnierczyk 2013) opisano związek genu *KIR2DS1* z podatnością na chorobę, a nie z jego efektem ochronnym. Przeciwna rola genu *KIR2DS1* może wynikać z różnic w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry i łuszczycy. Różnice te dotyczą zarówno udziału komórek NK, jak i niektórych subpopulacji limfocytów T z ekspresją receptorów KIR. W atopowym zapaleniu skóry obserwuje się zwiększoną apoptozę keratynocytów (Rabane i in., 2012), natomiast w łuszczycy mamy do czynienia z nadmierną proliferacją keratynocytów i zmniejszoną ich zdolnością do apoptozy (Kastelan i in., 2009). Ponadto w łuszczycy obserwuje się przewagę limfocytów Th1/Th17/IL-23 i NK1 podczas gdy w AZS dominują Th2, NK2, przynajmniej w pierwszej fazie choroby (von Bubnoff i in., 2010; Guttman-Yassky i in., 2011). Różnice między tymi dwiema jednostkami chorobowymi dotyczą również występowania skórnych infekcji wirusowych i bakteryjnych (Boguniewicz i in., 2011). Zarówno w AZS jak i w łuszczycy mamy do czynienia z podwyższoną liczbą limfocytów T. Pacjenci z atopowym zapaleniem skóry, w przeciwieństwie do pacjentów



z łuszczycą, są zdolni do zwiększonego uwalniania z grasicy limfocytów T, szczególnie subpopulacji CD8<sup>+</sup> (Just i in., 2008). Wszystkie te różnice mogą wpływać na udział pozytywnych pod względem *KIR2DS1* subpopulacji komórek zaangażowanych w patofizjologię chorób o odmiennym przebiegu klinicznym powodując przeciwstawny związek z genem *KIR2DS1*. Ochronny efekt dla genu *KIR2DS1* i innych genów *KIR* aktywujących zaobserwowano także w innej dermatozie jaką jest pęcherzyca liściasta, która również jest chorobą skórą z dominacją odpowiedzi Th2 (Augusto i in., 2012).

Przeprowadzona analiza genów *KIR* wykazała, że gen *KIR2DS1* występuje w silnym pozytywnym niezrównoważeniu sprzężeń (LD) z genami *KIR3DS1* i *KIR2DS5* oraz w silnym negatywnym LD z genem *KIR2DS4*, co zostało również opisane w innych populacjach (Gourraud i in., 2010; Gonzalez-Galarza i in., 2011). Na podstawie przeprowadzonej analizy można oczekiwać, że gen *KIR2SD4* jest związany z podatnością na atopowe zapalenie skóry oraz że geny *KIR3DS1* i *KIR2DS5*, podobnie jak gen *KIR2DS1*, wykazują efekt ochronny. Nie zaobserwowałam jednak istotnych różnic w częstości występowania genów *KIR3DS1* i *KIR2DS5* pomiędzy grupą badanych pacjentów z AZS a grupą kontrolną. Natomiast osoby posiadające gen *KIR2DS4* miały nieco wyższe ryzyko zachorowania na AZS niż osoby, które tego genu nie miały. Jednakże na podstawie symulacji Monte Carlo można wywnioskować, że to raczej nieobecność genu *KIR2DS1* była związana ze skłonnością do wystąpienia choroby. Symulacja ta wykazała, że wzrostowi częstości genu *KIR2DS4* nie towarzyszy spadek częstości genu *KIR2DS1* równy wartości obserwowanej. Natomiast symulacja zmniejszania się częstości genu *KIR2DS1* daje wzrost częstości genu *KIR2DS4* odpowiadający wynikowi eksperymentalnemu. Dlatego wydaje się słuszne założenie, że obecność genu *KIR2DS1* chroni przed zachorowaniem, i że zmiany częstości genu *KIR2DS4* wynikają jedynie z ujemnego LD z genem *KIR2DS1*. W badaniach przeprowadzonych w 2005 roku przez Atkasa i wsp. opisano zwiększony odsetek komórek NK dodatnich pod względem CD158b (*KIR2DL2*, *KIR2DL3* i/lub *KIR2DS2*) u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, podczas gdy nie było różnicy w ekspresji CD158a (*KIR2DL1/KIR2DS1*). Przeciwciała monoklonalne wykorzystane w tym badaniu nie różnicowały pomiędzy cząsteczkami *KIR2DL1* i *KIR2DS1* (jak również pomiędzy cząsteczkami *KIR2DL2*, *KIR2DS2* i *KIR2DS3*), dlatego wzrost odsetka komórek *KIR2DS1* może być maskowany przez wiązanie przeciwciała z cząsteczką *KIR2DL1*. Ponad połowa osobników w populacjach kaukazyjskich jest ujemna dla genu *KIR2DS1* (<http://www.allelefrequencies.net>), częstość tego genu u badanych pacjentów z AZS była jeszcze niższa i wynosiła 31,74%, podczas gdy 93-100% osób posiada gen *KIR2DL1*.

Podobne wyniki zaobserwowano w niniejszych badaniach (97% osób *KIR2DL1*-dodatnich w kontroli i 95% u pacjentów). Poszczególne klony komórek NK i T wykazują na swojej powierzchni ekspresję tylko części swoich genów *KIR*, co jeszcze bardziej komplikuje wzór ekspresji cząsteczek KIR (Parham 2005). Dla przykładu, nie wszystkie komórki NK i T osób posiadających gen *KIR2DS1* wykazują jego ekspresję na powierzchni. Dlatego jeśli tylko część komórek dodatnich pod względem *KIR2DS1*, a nie *KIR2DL1*, byłaby podwyższona w AZS, nie zostałyby wykryte u większości pacjentów, pomimo posiadania genu *KIR2DS1*, ale ich komórki wybarwiłyby się pozytywnie przeciwciałem CD158a z powodu obecności genu *KIR2DL1*. Sytuacja wygląda inaczej w przypadku *KIR2DL2* i *KIR2DS2*, ponieważ te dwa geny występują w silnym dodatnim LD, przez co odsetek osób *KIR2DL2*<sup>+</sup> *KIR2DS2*<sup>-</sup> jest nieistotny zarówno u pacjentów, jak i w kontroli. Tak więc jeśli występuje, wzrost populacji komórek *KIR2DS2*<sup>+</sup> jest on łatwiejszy do wykrycia. Dlatego aby odpowiedzieć na pytanie, czy odsetek komórek *KIR2DS1*<sup>+</sup> jest podwyższony w AZS, należałoby zastosować przeciwciało specyficzne dla *KIR2DS1*, które nie reaguje krzyżowo z *KIR2DL1*. Na uwagę zasługują również badania, w których stwierdzono, że cząsteczka *KIR2DS1* spontanicznie agreguje w roztworze *in vitro* jak i na powierzchni komórki, co w znacznym stopniu ułatwia aktywację komórek po związaniu ligandu (Hayley i in., 2011). Jeżeli cząsteczki *KIR2DS1* ulegają ekspresji na komórkach NK lub T, które regulują reakcję alergiczną poprzez wydzielanie cytokin lub bezpośrednio zabijanie komórek efektorowych, komórki te mogą przyczynić się do ochrony przed AZS. Natomiast w łuszczycy i pokrewnych chorobach skóry cząsteczki *KIR2DS1* mogą być obecne na komórkach efektorowych, przez co zwiększają reakcję autoimmunologiczną. Niniejsze opracowanie ma charakter nowatorski i stanowi pierwsze doniesienie na temat udziału genów *KIR* w atopowym zapaleniu skóry.

Oprócz heterogeniczności genotypów *KIR* zmienność ich wynika także z różnorodności ligandów KIR. Ligandami dla receptorów KIR są antygeny głównego układu zgodności tkankowej (HLA) klasy I (HLA-A, B i C), które są skrajnie polimorficzne (Trowsdale i in., 2015). Na podstawie dimorfizmu w pozycji 80 w helisie  $\alpha 1$  łańcucha ciężkiego allele HLA locus C można podzielić na dwie grupy. Grupa 1 (HLA-C1) z asparaginą w pozycji 80 rozpoznawana jest przez cząsteczki *KIR2DL2*/*KIR2DL3*, natomiast grupa 2 (HLA-C2) zawierająca w tej pozycji lizynę rozpoznawana jest przez cząsteczki *KIR2DL1*/*KIR2DS1* (Parham 2005; 2012; Kulkarni i in., 2008; Middleton i in., 2010). Cząsteczki HLA-B oraz niektóre HLA-A zawierające motyw Bw4 są ligandem dla *KIR3DL1* (Kulkarni i in., 2008; Middleton i in., 2010). Dymorfizm w pozycji 80 epitopu Bw4 wpływa na oddziaływanie z podtypami *KIR3DL1*. Aktywujące receptory *KIR2DS1*,

KIR2DS2 i KIR3DS1 w swoich domenach zewnątrzkomórkowych wykazują wysoką homologię do ich odpowiedników wśród receptorów hamujących (odpowiednio: KIR2DL1, 2DL2/2DL3 i 3DL1), ale mają znacznie niższe powinowactwo lub w ogóle nie wykazują powinowactwa do tych samych ligandów (Kulkarni i in., 2008, Stewart i in., 2005). W swojej pracy przeprowadziłam także ocenę częstości występowania epitopów HLA-C (C1 i C2) wśród chorych na atopowe zapalenie skóry i w kontroli, nie wykazałam jednak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania tych epitopów pomiędzy badanymi grupami. Ponadto zaobserwowałam, że ochronny efekt genu *KIR2DS1* w AZS nie zależy od obecności czy też braku epitopu C2, który jest ligandem dla produktu tego genu. W literaturze istnieją liczne doniesienia wykazujące związek pomiędzy łuszczycą i łuszczycowym zapaleniem stawów oraz genem *KIR2DS1*, którego ligandem jest allel *HLA-C\*06* należący do grupy C2 (Kuśnierzcyk 2013). W populacji amerykańskiej zaobserwowano, że związek genu *KIR2DS1* z łuszczycowym zapaleniem stawów nie zależy od obecności epitopu C2 (Williams i in., 2005). Badanie pozostałych ligandów receptorów KIR, czyli cząsteczek HLA-B i niektórych HLA-A zawierających motyw Bw4, których dymorfizm w pozycji 80 epitopu Bw4 wpływa na oddziaływanie z podtypami KIR3DL1, nie wykazało różnic w populacji chorych na AZS i zdrowych stanowiących kontrolę. W kolejnym etapie przeprowadziłam analizę zależności pomiędzy genami *KIR* i ich ligandami oraz danymi klinicznymi pacjentów. Zaobserwowałam, że u pacjentów diagnozowanych w młodszym wieku częściej występował epitop C1 ( $p=0,023$ ), natomiast u osób, u których chorobę zdiagnozowano w późniejszym wieku epitop HLA-B Bw4 (Thr80) ( $p=0,008$ ). W literaturze brak doniesień na temat związku genów *KIR* i *HLA* z wiekiem zachorowania na AZS natomiast istnieją liczne doniesienia dotyczące zmian jakie z wiekiem zachodzą w układzie immunologicznym, w tym w populacjach komórek NK i limfocytów T. Zaobserwowano, że wraz z wiekiem wzrasta liczba komórek NK na skutek akumulacji dojrzałych komórek o fenotypie CD56<sup>dim</sup>. Ponadto wykazano podwyższony lub niezmienny poziom ekspresji receptorów KIR obecnych na komórkach NK. W badaniach przeprowadzonych na populacji irlandzkiej przez Maxwella i wsp. analizowano różnorodność genów *KIR* w zależności od wieku, nie wykazano związku rozkładu genów *KIR* ze starzeniem (Lynn i in., 2004). Z kolei w badaniach Almeida-Oliveira i wsp. wykazano większą częstość genów *KIR2DL5* i *KIR2DS3* u osób starszych. Natomiast nie wykazano różnicy w częstości występowania ligandów HLA-C (C1 i C2) oraz HLA-B Bw4 w różnych grupach wiekowych (Almeida-Oliveira i in., 2010).

Ponadto wykazałam także rzadsze występowanie genu *KIR2DS2* ( $p=0,031$ ) jak również epitopu HLA-B Bw4 (Ile80) ( $p=0,002$ ) u osób z astmą jako chorobą współistniejącą. Siła obserwowanych związków była jednak stosunkowo niska. Przeprowadzone przez Weidingera i wsp. badania GWAS dla chromosomu 6, na którym zlokalizowane są geny *HLA* wykazały związek atopowego zapalenia skóry z genami zgodności tkankowej, nie wykazały jednak wpływu tych genów na fenotyp AZS u osób z astmą jako chorobą współistniejącą. W badaniach tych także zaobserwowano, że znane mutacje w genie *FLG* (R501X i 2282del4) mają związek z astmą tylko u osób chorujących również na AZS. (Weidinger i in., 2013). Natomiast w badaniach przeprowadzonych na polskiej populacji wykazano, że mutacje (R501X i 2282del4) są niezależnymi czynnikami ryzyka wystąpienia astmy atopowej (Ponińska i in., 2011).

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki badań dotyczą także polimorfizmu allelicznego genu *HLA-C*, którego produkty stanowią większość znanych ligandów dla receptorów KIR. Statystycznie istotną różnicę zaobserwowałam jedynie dla allelu *HLA-C\*05*, który jest stosunkowo rzadki w polskiej populacji. Osoby, które nie posiadały allelu *HLA-C\*05* miały ponad dwukrotnie mniejsze ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry niż osoby posiadające ten allel ( $OR=0,41$ ). Dla pozostałych alleli *HLA-C* nie wykazałam istotnych różnic w częstości występowania w grupie kontrolnej i w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry. Porównanie częstości alleli *HLA-C* u osób posiadających gen *KIR2DS1* w grupie chorych i grupie kontrolnej nie wykazało istotnych różnic w częstości występowania dla większości alleli *HLA-C* pomiędzy badanymi grupami, wyjątkiem jest allel *HLA-C\*07*, którego większą częstość zaobserwowano w badanej grupie chorych ( $OR=2,22$ ). Allel *HLA-C\*07* dwukrotnie zwiększał ryzyko zachorowania na AZS u pacjentów pozytywnych pod względem *KIR2DS1*. Zależność ta wynika prawdopodobnie z niewielkiej liczebności badanych grup, bowiem gen *KIR2DS1* obecny był tylko u 31% chorych i 41% osób w grupie kontrolnej. Allel *HLA-C\*07* należy do najczęstszych alleli *HLA-C* w populacji polskiej *C\*07:01:01* (25,8%), ponieważ wchodzi w skład konserwatywnego haplotypu *A\*01:01:01-B\*08:01:01-C\*07:01:01-DQB1\*02:01:01-DRB1\*03:01:01*, występującego z częstością 5,87% (Nestorowicz i in., 2020). Haplotyp ten związany jest z przesunięciem odpowiedzi immunologicznej Th1/Th2 w kierunku Th2 (Ivanova i in., 2019), a co za tym idzie z podatnością na wiele chorób związanych z kompleksem genów MHC (Price i in., 1999).

Natomiast analiza częstości występowania alleli *HLA-C* przy braku genu *KIR2DS1* w grupie pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i w grupie kontrolnej nie wykazała

istotnych różnic. W naszej populacji praktycznie jedynym wykrywalnym podtypem *HLA-C\*05* jest allel *HLA-C\*05:01* (Schmidt i in., 2009). W badaniach przeprowadzonych w 2011 przez O'hUigin i wsp. wykazano, że allel *HLA-C\*05:01* posiada delecję w miejscu wiązania mikro-RNA (miR-148a) w regionie nieulegającym translacji 3', który związany jest z wysoką ekspresją na powierzchni komórki podobnie jak obecność allelu -35C w regionie promotorowym *HLA-C* (Thomas i in., 2009). Z kolei inna grupa badawcza wykazała, że allel *rs2395471\*G* polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w genie *HLA-C*, związany jest z niską ekspresją (Vince i in., 2016). Niemniej jednak rezultatem obecności tych polimorfizmów jest raczej wysoka ekspresja na powierzchni komórki (Thomas i in., 2009; O'hUigin i in., 2011). Dlatego *HLA-C\*05:01* może potencjalnie skutecznie prezentować związane peptydy. Spośród ponad 20 tysięcy zdrowych Polaków allel *HLA-C\*05:01* wykryto wyłącznie w haplocybie z *HLA-B\*44:02* (Schmidt i in., 2011). Ten alotyp HLA-B posiada jako peptyd liderowy resztę treoniny w pozycji -21. Alotypy HLA-B z treoniną w pozycji -21 promują edukację komórek NK za pośrednictwem receptorów KIR w przeciwieństwie do allotypów HLA-B z metioniną w pozycji -21, które promują edukację komórek NK poprzez CD49/NKG2A (Horowitz i in., 2016). Dlatego dla osób pozytywnych pod względem *HLA-C\*05:01* edukacja komórek NK powinna przebiegać poprzez interakcję z receptorami KIR. Zarówno hamujące (Anfossi i in., 2006) jak i aktywujące cząsteczki KIR, do których należy KIR2DS1 (Fauriat i in., 2010) odgrywają istotną rolę w edukacji komórek NK. Dotychczasowe badania dotyczące roli alleli *HLA-B* w AZS były zazwyczaj przeprowadzane na bardzo małej liczbie pacjentów przy zastosowaniu głównie typowania metodą serologiczną i dawały rozbieżne wyniki (Larsen i in., 1980; Svejgaard i in., 1985; Affes i in., 2007; Takejima i in., 2017). Zatem rola *HLA-B -21Thr* w porównaniu z *-21Met* w AZS wciąż wymaga dalszych badań. Planujemy w przyszłości kontynuować ten temat i przeprowadzić bardziej szczegółowe badania dotyczące roli cząsteczek HLA w AZS z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji.

Porównanie genetycznego podłoża atopowego zapalenia skóry i innej przewlekłej dermatozy jaką jest łuszczyca, pokazuje zarówno nakładające się jak i przeciwne efekty poszczególnych genów (Weidinger i in., 2013; Baurecht i in., 2015). Wiele doniesień wskazuje na związek genów *HLA* z atopowym zapaleniem skóry. W badaniu przeprowadzonym przez Weidingera wykazano, że allel *HLA-DRB1\*07:01* wiąże się z większym ryzykiem zachorowania na łuszczycę, ale jednocześnie chroni przed zachorowaniem na AZS. Odwrotny efekt zaobserwowano natomiast dla alleli *HLA-DRB1\*04:01*, *DRB1\*11:01* i *DQB1\*03:01*, które zwiększały ryzyko zachorowania na

AZS. Stwierdzono również związek specyficznych wariantów aminokwasów w kieszeni wiążącej peptyd cząsteczki HLA-DRB1 z zachorowaniem i przebiegiem AZS (Margolis i in., 2015). Natomiast badania przeprowadzone na populacji koreańskiej wykazały, że allotyp HLA-A24 związany jest z większą podatnością na AZS (Lee i in., 2001; Al-Shobaili i in., 2016). Związek antygenów HLA klasy I z podatnością na AZS wykazano także w populacji europejskiej dla allelu *HLA-B\*44:02*, natomiast efekt ochronny stwierdzono dla *HLA-B\* 57:01* (Weidinger i in., 2013). Związek *HLA-C\*06:02* z łuszczycą potwierdzono w wielu badaniach (Zhou i in., 2018; Veal i in., 2002; Capon i in., 2017), również w badaniach obejmujących polską populację (Szczerkowska-Dobosz i in., 1996; 2004; Łuszczek i in., 2003; Stawczyk-Macieja i in., 2018; Wiśniewski i in., 2018). Przeprowadzone badania asocjacyjne całego genomu GWAS wykazały słaby efekt ochronny allelu *HLA-C\*06:02* w AZS (Baurecht i in., 2015; Zhou i in., 2016).

Z kolei przeprowadzona przeze mnie analiza zależności pomiędzy częstościami alleli *HLA* locus *C* oraz cechami klinicznymi nie wykazała istotnych statystycznie powiązań z wyjątkiem wieku diagnozy badanych. Zaobserwowano, że osoby diagnozowane w młodszym wieku częściej posiadały allel *HLA-C\*03* ( $p=0,002$ ), natomiast osoby, u których chorobę zdiagnozowano w późniejszym wieku, częściej posiadały allel *HLA-C\*05* ( $p=0,01$ ), co można wiązać z ochronnym efektem tego allelu wykrytym w moich badaniach. W badaniach Le Morvana z 2001 roku analizowano korelację pomiędzy ekspresją cząsteczek HLA-A i HLA-B na powierzchni leukocytów krwi obwodowej oraz wiekiem, zaobserwowano obniżoną ekspresję u osób starszych. Niższa ekspresja cząsteczek HLA klasy I może wpłynąć na zdolność rozpoznawania niektórych endogennych peptydów przez TCR cytotoksycznych komórek T i uczestniczyć w zmianie repertuaru limfocytów CD8<sup>+</sup> (Le Morvan i in., 2001). W późniejszych badaniach Ivanovej i wsp. nad związkiem antygenów HLA klasy I i II z długością życia wykazano większą częstość alleli *HLA-A\*01:01:01:01*, *HLA-C\*07:01:02*, *HLA-B\*35:02:01* i *HLA-B\*15:17:01:01* oraz allelu *HLA-DRB1\*07:01:01:01* u osób starszych. Obserwacje przeprowadzone na populacjach bułgarskiej, rumuńskiej i włoskiej oraz na mieszkańcach Kuwejtu, potwierdziły i rozszerzyły wcześniejsze obserwacje wynikające z badań na populacji greckiej i francuskiej, potwierdzając związek allelu *DRB1\*07* z długością życia (Ivanova i in., 2019).

W ostatnich latach ukazały się doniesienia wykazujące, że oddziaływania cząsteczek KIR2DS1 z HLA-C są warunkowane rodzajem prezentowanego peptydu (Chapel i in., 2017). Repertuar peptydów wiązanych przez daną cząsteczkę HLA klasy I zależy nie tylko od preferencji wiązania peptydów przez daną cząsteczkę, ale także od aktywności tak zwanej

maszynerii prezentującej antygen (APM). Skuteczność prezentacji antygenów na powierzchni komórki jest wynikiem działania białek wchodzących w skład APM, natomiast ich aktywność uzależniona jest od polimorfizmu ich genów.

Elementami APM są cząsteczki LMP2 i LMP7, białka o małej masie cząsteczkowej 2 i 7, które są komponentami immunoproteasomu. Polimorfizmy w genach *LMP2* i *LMP7* oddziałują na proteosomalną aktywność, przez co wpływają na wytwarzanie oraz na prezentację różnych epitopów limfocytom T, a tym samym na odpowiedź immunologiczną. W niniejszej pracy przeanalizowałam warianty genetyczne w regionie niekodującym genu *LMP2* *rs1351383* (Intron 1) oraz zmiany w regionie kodującym białko w genie *LMP7* *rs2071543* (Gln49Lys). Wykazałam dla polimorfizmu *LMP7* *rs2071543* częstsze występowanie allelu *T* w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy chorych ( $p=0,0497$ ). Badanie to wymaga jednak potwierdzenia na większej populacji. Natomiast rozkład częstości genotypów dla wariantu polimorficznego *rs1351383* w grupie pacjentów z AZS i grupie kontrolnej nie różnił się w istotny sposób.

Wiedza na temat roli cząsteczek LMP2 i LMP7 w atopowym zapaleniu skóry jest bardzo ograniczona. W literaturze istnieje tylko jedno doniesienie dotyczące polimorfizmu w genach *LMP2* i *LMP7* w populacji koreańskiej, w którym nie wykazano związku tych genów z AZS (Lee i in., 2001). Niniejsze badanie jest pierwszym badaniem dotyczącym związku polimorfizmów *LMP* (2 i 7) z atopowym zapaleniem skóry w populacji kaukazoidalnej. W literaturze obserwuje się nieliczne doniesienia dotyczące polimorfizmu w genach *LMP* (2 i 7) w innej chorobie skóry jaką jest łuszczyca, w której podobnie jak w AZS obserwuje się dysfunkcję naskórka i rozregulowanie odpowiedzi immunologicznej. Badania przeprowadzone na populacji japońskiej nie wykazały związku genów *LMP* (2 i 7) z łuszczycą (Pyo i in., 2003). Natomiast w populacji europejskiej wykazano asocjację z łuszczycą genotypu *G/G* w miejscu polimorficznym *LMP2*\_Arg60His (Kramer i in., 2007). Liczne badania wykazały, że polimorfizmy w genach *LMP2* i *LMP7* są odpowiedzialne za zmiany funkcjonalne, które powodują mniejszą zdolność tych cząsteczek do przetwarzania antygeny. Warianty genetyczne genów *LMP2* i *LMP7* są związane z występowaniem, rozwojem oraz przebiegiem wielu chorób infekcyjnych, chorób autoimmunologicznych oraz nowotworowych (Ferrington i in., 2012; Mandal i in., 2017; Yang i in., 2017).

Analiza zależności pomiędzy polimorfizmami w genach *LMP* (2 i 7) a danymi klinicznymi wykazała, że w miejscu polimorficznym *rs1351383* u nosicieli allelu *C* (*CC* i *AC*) choroba diagnozowana była we wcześniejszym wieku i jednocześnie miała cięższy przebieg. Zaobserwowałam, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania choroby mierzonyj

współczynnikiem SCORAD wzrastała częstość homozygot *C/C*. Jednak siła efektu mierzona współczynnikiem *V* Cramera była niska ( $V=0,18$ ), dlatego obserwacje te również należy potwierdzić poprzez przeprowadzenie dalszych analiz na większych grupach badanych.

W literaturze istnieją doniesienia dotyczące zmian jakie zachodzą w immunoproteasomie z wiekiem, niewiele natomiast jest dostępnych obserwacji na temat polimorfizmów w genach *LMP2* i *LMP7* i ich wpływu na aktywność proteosomalną związaną z wiekiem (Mishto i in., 2001; Johnston-Carey i in., 2016). W jedynych dostępnych badaniach przeprowadzonych przez Mishto i wsp. nie wykazano różnic w częstości genotypów pomiędzy grupą młodych i starszych osób w genie *LMP2\_Arg60His* i *LMP7\_Gln145Lys* (Mishto i in., 2001).

Kolejnymi badanymi genami należącymi do maszyny prezentującej antygen były geny kodujące białko transportowe TAP, które strukturalnie jest heterodimerem złożonym z podjednostek TAP1 i TAP2. Cząsteczki TAP1 i TAP2 odgrywają istotną rolę w dostarczaniu peptydów odpowiednich dla cząsteczek HLA klasy I z cytosolu do światła siateczki śródplazmatycznej (Gadola i in., 2000). Warianty genetyczne genu *TAP* mogą modyfikować strukturę molekularną, przez co wpływają na proces selekcji i transportu peptydu antygenowego (Naderi 2016, Praest 2018). Liczne doniesienia pozwoliły na określenie dwóch głównych miejsc polimorficznych w genie *TAP1*: zamiana izoleucyny na walinę *rs1057141* (Ile333Va) oraz zamiana kwasu asparaginowego w glicynę *rs1135216* (Asp637Gly). W swojej pracy przeanalizowałam częstość występowania polimorfizmów *rs1135216* i *rs1057141* w genie *TAP1*, oraz *rs4148876* (Arg651Cys) i *rs16870908* (Leu647Phe) w genie *TAP2*. Nie wykazałam związku badanych polimorfizmów z atopowym zapaleniem skóry. Natomiast w wyniku analizy związku genów *TAP1* i *TAP2* z danymi klinicznymi pacjentów wykazałam, że osoby będące homozygotami *T/T* w miejscu polimorficznym *rs1135216* były diagnozowane w starszym wieku w porównaniu do osób z genotypem *C/T* ( $p=0,03$ ). Z uwagi na niewielką liczebność homozygot *C/C* grupa ta nie różniła się od pozostałych. Ponadto zaobserwowałam również, że genotyp homozygotyczny *C/C* polimorfizmu *rs1135216* występuje jedynie u pacjentów z ciężkim przebiegiem AZS, u których współczynnik SCORAD > 50. Siła efektu mierzona współczynnikiem *V* Cramera była jednak niska w związku z niską liczbą tych homozygot, dlatego wynik ten należy zweryfikować w badaniach na większej grupie chorych.

W piśmiennictwie nie ma doniesień na temat związku polimorfizmów w genach *TAP* (1 i 2) z cechami klinicznymi u chorych na atopowe zapalenie skóry. Geny *TAP* (1 i 2) podobnie jak geny *LMP* (2 i 7) nie były dotychczas szeroko badane w różnych jednostkach chorobowych, w tym także w AZS. W nielicznych dostępnych danych literaturowych



dotyczących badań polimorfizmu *TAP1* (*rs1057141* i *rs1135216*) w populacji tunezyjskiej, japońskiej i koreańskiej nie zaobserwowano związku polimorfizmu tych genów z AZS (Liu i in., 2018). Podobnie w populacji czeskiej nie wykazano asocjacji pomiędzy polimorfizmami w genie *TAP1* a atopowym zapaleniem skóry (Izakovicová Hollá 2001). Natomiast analiza genu *TAP2* u Koreańczyków wykazała związek allelu *TAP2\*C* (Ile379/Ala565/Thr665) i genotypu *TAP2\*A* (Val379/Ala565/Thr665) - *TAP2\*C* (Ile379/Ala565/Thr665) z atopowym zapaleniem skóry (Lee i in., 2001). Zaobserwowano także wyższy poziom ekspresji *TAP2* u japońskich pacjentów z atopowym zapaleniem skóry w stosunku do osób z kontroli (Nagata i in., 2003). W pęcherzycy pospolitej, która jest również chorobą skórną z dominacją odpowiedzi Th2 zidentyfikowano dwa allele *TAP2\*C* (Ile379/Ala565/Thr665) i *TAP2\*D* (Ile379/Thr565/Thr665) związane z ryzykiem choroby u Żydów izraelskich (Slomov i in., 2005). Natomiast związek polimorfizmów *TAP* (1 i 2) z łuszczycą opisano u Niemców (Kramer i in., 2007) i Japończyków (Pyo i in., 2003). Również w najnowszych badaniach przeprowadzonych w populacji polskiej wykazano związek allelu *rs241447\*C* (665 Ala) *TAP2* z łuszczycą. Jednakże efekt *rs241447 TAP2* był całkowicie zależny od obecności allelu *HLA-C\*06:02*, który jest silnie związany z łuszczycą. Obserwowany związek allelu *HLA-C\* 06:02* i *rs241447\*C TAP2* prawdopodobnie wynika z LD pomiędzy tymi genami (Wiśniewski i in., 2020).

Najlepiej poznanymi i opisanymi elementami APM są aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej (ERAP) 1 i 2. Aminopeptydazy ERAP1 i ERAP2 przycinają peptydy do długości 8-10 aminokwasów, które są wiązane z wyższym powinowactwem przez cząsteczki MHC klasy I (Leone i in., 2013; Herman i in., 2015; Evnouchidou i in., 2019). Gen *ERAP1* jest niezwykle polimorficzny. Różne niesynonimiczne polimorfizmy pojedynczego nukleotydu powodują zmianę sekwencji powstającego białka przez co wpływają zarówno na różnice w poziomie ekspresji jak i na aktywność enzymu (Stratikos i in., 2014; Hanson i in., 2019). W niniejszej pracy przeanalizowałam częstość występowania pięciu zmian genetycznych w regionie genu *ERAP1*: *rs26618*, *rs26653*, *rs30187*, *rs27044* i *rs2287987*. Wszystkie badane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w genie *ERAP1* były zlokalizowane w regionach kodujących, w których zamiana kodowanego aminokwasu może powodować zmiany struktury i/lub funkcji białka. Badania te wykazały, że *rs26618* w genie *ERAP1* jest związany z ryzykiem zachorowania na atopowe zapalenie skóry. Analiza genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* wykazała różnicę w rozkładzie częstości genotypów między pacjentami z AZS i grupą kontrolną. Obecność allelu *C* w miejscu polimorficznym *rs26618* zwiększała ryzyko zachorowania na AZS (OR=1,43), osoby będące

nosicielami allelu *C* (*C/T* i *C/C*) w porównaniu z homozygotami *T/T* miały większe ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry (OR odpowiednio 1,49; 1,87). Dla pozostałych badanych wariantów polimorficznych: *rs26653*, *rs30187*, *rs27044* i *rs2287987* w genie *ERAP1* nie wykazałam istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami. Ponadto analiza rozkładu genotypów w miejscu polimorficznym *rs26618* w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej osób nieposiadających genu *KIR2DS1* wykazała różnicę w częstości genotypów pomiędzy badanymi grupami ( $p=0,017$ ). W grupie osób nieposiadających genu *KIR2DS1* heterozygoty *C/T* miały 1,5 razy większe ryzyko zachorowania niż osoby posiadające genotyp homozygotyczny *T/T* ( $OR=1,57$ ), a u osób z genotypem homozygotycznym *C/C* ryzyko zachorowania było ponad 2 krotnie wyższe ( $OR=2,30$ ). Związek polimorfizmu *rs26618* z ryzykiem zachorowania na AZS i dodatkowo z ujemnym wynikiem *KIR2DS1* wykazany w badanej populacji nie jest do końca jasny. Ten wariant polimorficzny znajduje się na trzeciej pozycji w kodonie 276 ale jego biologiczna funkcja nie jest znana. Z informacji zawartych w bazach danych wynika, że *rs26618* posiada dwa allele *T* i *C*, które zmieniają kodowany aminokwas w pozycji 276 (Ile lub Met). Obserwowany związek pomiędzy polimorfizmem *rs26618* a AZS przy braku związku pozostałych miejsc polimorficznych *ERAP1* można wyjaśnić brakiem nierównowagi sprzężeń *rs26618* z pozostałymi badanymi polimorfizmami *rs26653* i *rs30187*. Brak nierównowagi sprzężeń pomiędzy polimorfizmami w genie *ERAP1* został opisany w populacji hiszpańskiej (Szczypiorska i in., 2011) jak również w populacji polskiej (Yao i in., 2016). Natomiast u Chińczyków w odróżnieniu od Europejczyków inne warianty polimorficzne genu *ERAP1* (*rs26653*, *rs30187* i *rs27044*) są w znacznym LD (Yao i in., 2016). Wykazano, że u Chińczyków *rs26618* był związany z ryzykiem wystąpienia zarówno niedrobnokomórkowego raka płuc (Yao i in., 2016) jak i zakażeń wirusem HCV (Liu i in., 2017). Postawiono hipotezę, że może to być ważny wariant polimorficzny, który wydaje się wpływać zarówno na aktywność jak i/lub strukturę enzymu *ERAP1*. Brak jednak danych dotyczących biologicznej funkcji tego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu. W celu zbadania funkcjonalnego znaczenia tego wariantu aminopeptydazy *ERAP1*, przetestowano aktywność enzymatyczną dwóch wariantów powstałych w wyniku ukierunkowanej mutagenyzy, różniących się w pozycji 276 (Ile lub Met) wobec N-końcowo wydłużonego prekursora LIVDRPVTLV (Leu-Ile-Val-Asp-Arg-Pro-Val-Thr-Leu-Val) liganda HLA-C\*05:01, IVDRPVTLV (Ile-Val-Asp-Arg-Pro-Val-Thr-Leu-Val). Badanie aktywności aminopeptydazy *ERAP1* zostało wykonane we współpracy z dr Efstratiosem Stratikosem i dr Anastasią Mpakali z National Centre for Scientific Research „Demokritos” w Atenach.

Porównanie aktywności enzymatycznej dwóch wariantów aminopeptydazy różniących się tylko w pozycji 276 (Ile lub Met) wobec prekursora epitopu HLA-C\*05:01 wykazało, że oba warianty ERAP1 były w stanie skutecznie wygenerować epitop IVDRPVTLV z prekursorowego peptydu LIVDRPVTLV. Jednak allotyp ERAP1 z izoleucyną w pozycji 276 był w stanie wygenerować ten epitop o około 50% szybciej. Oba warianty były znacznie mniej skuteczne w dalszym przycinaniu dojrzałego epitopu do mniejszych peptydów. Kinetyka ich była 100-krotnie wolniejsza w porównaniu do generowania epitopu, ale z bardzo podobnymi prędkościami dla obu wariantów. Zastosowany w naszych badaniach test nie sprawdza poziomów prezentacji epitopów HLA-C\*05:01. W wielu wcześniej przeprowadzonych badaniach wykazano ilościowo podobne różnice w szybkościach przycinania epitopów przez warianty ERAP1, które wpływają zarówno na odpowiedź cytotoksycznych limfocytów T jak i na funkcję komórek NK (Evnouchidou i in., 2011; Reeves i in., 2013; Aldhamen i in., 2015). Konieczna jest bardziej szczegółowa analiza wpływu polimorfizmu Ile276Met ERAP1 na immunopeptydom HLA-C, bowiem otrzymane przez nas wyniki sugerują, że ten wariant polimorficzny ma zdolność oddziaływania na ładunek peptydowy HLA-C\*05:01 *in vivo*. Obserwowany ochronny efekt genu *KIR2DS1* w atopowym zapaleniu skóry oraz związek polimorfizmu Ile276Met ERAP1 z AZS tylko u osób ujemnych pod względem genu *KIR2DS1* sugerują, że wariant ERAP1 276Met może przyczyniać się do ryzyka wystąpienia choroby wyłącznie przy braku ochronnego efektu *KIR2DS1*. Na wiązanie aktywujących cząsteczek KIR z antygenami HLA klasy I mają wpływ peptydy wiązane przez cząsteczki HLA (Hilton i in., 2017; Sim i in., 2017). Ponieważ ERAP1 wpływa na optymalizację peptydów, które są wiązane z wyższym powinowactwem przez cząsteczki MHC klasy I można postawić hipotezę, że „wolniejszy” allel ogranicza optymalny ładunek peptydu, przez co pozwala na wiązanie i prezentowanie mniej optymalnych peptydów, co wywołuje odpowiedź cytotoksyczną. W atopowym zapaleniu skóry receptor *KIR2DS1* może umożliwić komórkom NK zabijanie komórek efektorowych niezależnie od peptydu dostarczonego przez ERAP1. Natomiast przy braku cząsteczki *KIR2DS1* na aktywność komórek T CD8<sup>+</sup> zaangażowanych w patogenezę AZS może wpływać peptyd przycinany przez ERAP1 i następnie prezentowany przez HLA-C\*05:01 z mniejszą lub większą wydajnością w zależności od wariantu polimorficznego rs26618.

Polimorfizmy w genie *ERAP2* (rs2549782 i rs2248374) stanowiły kolejne badane warianty genetyczne aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej. W przeciwieństwie do genu *ERAP1*, *ERAP2* jest znacznie mniej polimorficznym genem. Wariant rs2248374\*G *ERAP2* z asparaginą w pozycji 392 koduje transkrypt z przedwczesnym kodonem stop,

co skutkuje powstaniem krótszej, niekatalitycznej formy tego białka (Hattori i in., 2013; Saulle i in., 2020a). Stąd też tylko około 75% osób posiada funkcjonalną formę enzymu ERAP2 w postaci wariantu z lizyną w pozycji 392, zaś u pozostałych 25% występują krótsze izoformy o nieznannej biologicznej roli (Lopez de Castro i in., 2018; Compagnone i in., 2019; Saulle i in., 2020a). Przeprowadzona przeze mnie analiza polimorfizmów *rs2549782* i *rs2248374* nie wykazała związku badanych wariantów, czyli obecności lub braku funkcjonalnego ERAP2 z podatnością na AZS. ERAP2 może działać jako homodimer lub heterodimer z ERAP1 i wpływać na jego wydajność (Lopez de Castro i in., 2018). Analiza wpływu polimorfizmu *rs2248374 ERAP2*, który kontroluje ekspresję białka ERAP2 na efekt polimorfizmu *rs26618* związanego z ryzykiem zachorowania na AZS wykazała synergistyczny efekt tylko dla genotypu *ERAP2 rs2248374\*A/A - ERAP1 rs26618\*C/C*. Osoby z tym genotypem miały ponad trzykrotnie większą szansę zachorowania na AZS niż osoby z pozostałymi genotypami (OR=3,36). Iloraz szans (OR) dla poszczególnych genotypów *ERAP2 rs2248374\*A/A* oraz *ERAP1 rs26618\*C/C* wynosił odpowiednio 1,10 i 1,88. W badaniach przeprowadzonych przez Ye i wsp. wykazano, że w komórkach zakażonych wirusem grypy u homozygot *rs2248374\*G* pojawiają się skrócone produkty białkowe pozbawione domeny katalitycznej o nieznannej biologicznej roli (Ye i in., 2018; Saulle i in., 2020a). Z uwagi na ograniczoną liczbę doniesień literaturowych i dostępnych danych na ten temat można jedynie spekulować, że krótkie izoformy ERAP2 mogą zaburzać funkcję ERAP1 poprzez tworzenie nieproduktywnego dimeru z tym enzymem. To wyjaśniałoby dlaczego genotyp *rs26618\*C/C - rs2248374\*A/A* niesie większe ryzyko zachorowania na AZS. Wariant *rs26618\*C* z metioniną w pozycji 276 wchodzi w skład haplotypu wykazującego niską aktywność enzymatyczną (Reeves i in., 2013), zawierającego argininę w pozycji 528 i glutaminę w pozycji 730 (Ombrello i in., 2015). Prawdopodobnie mechanizm związany z udziałem *rs26618\*C* w patogenezie AZS wymaga interakcji z funkcjonalnym ERAP2 kodowanym przez *rs2248374\*A* i braku skróconych izoform ERAP2 kodowanych przez *rs2248374\*G*. Należy jednak zauważyć, że 45% pacjentów nie posiadało wariantu *ERAP1 rs26618\*C* a 93% nie posiadało genotypu *rs26618\*C/C - rs2248374\*A/A*, a wystąpiło u nich atopowe zapalenie skóry. Można to wytłumaczyć faktem, że nie wszystkie peptydy antygenowe (epitopy) związane przez cząsteczki HLA klasy I i prezentowane limfocytom T wymagają przycięcia przez ERAP1 (Admon i in., 2019; Chen i in., 2016). Dlatego inne czynniki, genetyczne lub środowiskowe, mogły przyczyniać się u tych osób do wystąpienia AZS.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki stanowią pierwsze badania dotyczące związku wariantów polimorficznych w regionie genów *ERAP* (1 i 2) z rozwojem oraz ryzykiem wystąpienia atopowego zapalenia skóry. W literaturze istnieje natomiast wiele doniesień dotyczących związku polimorfizmów w genach *ERAP* (1 i 2) z łuszczycą, chorioretinopatią ptasią, zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa, chorobą Behçeta (Lopezde Castro i in., 2016; 2018), czy też chorobami infekcyjnymi (HIV, HCV, HPV) (Saulle i in., 2020a). Również inne infekcje wirusowe i bakteryjne stymulują pojawianie się takich białek (Saulle i in., 2020b)

W kolejnym etapie mojej pracy przeanalizowałam również zależność pomiędzy cechami klinicznymi badanych pacjentów a badanymi polimorfizmami w genach *ERAP* (1 i 2). Wykazałam jedynie, że heterozygoty *G/C* i homozygoty *C/C* w miejscu polimorficznym *rs27044* miały średni wiek diagnozy niższy niż osoby z genotypem *G/G* ( $p=0,026$ ). Ze względu na brak doniesień literaturowych dotyczących udziału polimorfizmów w genach *ERAP* (1 i 2) w rozwoju AZS tym bardziej trudno jest przewidzieć w jaki sposób te polimorfizmy mogą wpływać na wiek diagnozy u chorych na atopowe zapalenie skóry.

Ponadto zaobserwowałam, że homozygoty *T/T* dla wariantu polimorficznego *rs2287987* w genie *ERAPI* występowały rzadziej u osób, u których współwystępował alergiczny nieżyty nosa ( $p < 0,001$ ). Liczne obserwacje kliniczne i badania epidemiologiczne wykazały, że ryzyko wystąpienia innych chorób atopowych, głównie astmy i alergicznego nieżyty nosa, jest znacznie wyższe u dzieci z atopowym zapaleniem skóry. Ryzyko wystąpienia u nich alergicznego nieżyty nosa to aż 75 % (Thomsen 2015). Z wiekiem dochodzi bowiem do zmienności narządowej reakcji organizmu przeciw alergenom pokarmowym i wziewnym, zjawisko to nazywane jest „marszem alergicznym” (Spergel i in., 2003; Aw i in., 2020). W literaturze brak doniesień na temat roli polimorfizmów w genach wchodzących w skład tzw. maszynerii prezentacji antygeny (APM) w rozwoju chorób o podłożu alergicznym. Jedyne badania przeprowadzone w populacji koreańskiej wykazały silny związek pomiędzy polimorfizmami w genie *TAPI* a alergicznym nieżytem nosa. W grupie chorych zaobserwowano większą częstość genotypów *Ile/Val* w pozycji 333 i *Asp/Gly* w pozycji 637 w porównaniu z grupą kontrolną (Kim i in., 2007).

Dotychczas nie zbadano wpływu cząsteczek maszynerii prezentującej antygen i kodujących je genów na występowanie i przebieg AZS w populacji europejskiej. Nieliczne badania przeprowadzone na populacjach orientalnych nie wykazały istotnych związków polimorfizmów genów maszynerii prezentującej antygen z AZS poza związkiem allelu *TAP2\*C* (*Ile379/Ala565/Thr665*) u Koreańczyków. Różnice genetyczne pomiędzy populacją

kaukazoidalną a populacjami orientalnymi znajdują odzwierciedlenie w różnicach w powiązaniach genetycznych z wieloma chorobami (Ameen i in., 2005; Guan i in., 2014; Kim i in., 2014; Yao i in., 2016), jak również w rozkładzie częstości alleli i haplotypów genów *HLA* i *KIR* (<http://www.allelefrequences.net/>). Wydaje się zatem, że głównie polimorfizm w genach *ERAP* (1 i 2) może wpływać na podatność na AZS u osób rasy kaukazoidalnej. Prawdopodobnie wynika to z różnic w zdolności przycinania peptydu przez enzymy kodowane przez dwa warianty *ERAP1 rs26618* oraz upośledzanie funkcji ERAP1 poprzez tworzenie nieproduktywnego dimeru z krótkimi izoformami ERAP2, podczas gdy polimorfizmy innych składników maszyneryi prezentującej antygen LMP2, LMP7, TAP1 lub TAP2 prawdopodobnie nie wpływają na wytwarzanie i transport peptydu hipotetycznie wpływającego na podatność na AZS. Wyniki te należy jednak potwierdzić na większych grupach badanych, zarówno w populacji europejskiej, jak i innych populacjach. W zróżnicowanych etnicznie populacjach pochodzących z różnych regionów geograficznych mogą bowiem istnieć dodatkowe czynniki sprzyjające rozwojowi AZS.

Podsumowując, częstość występowania AZS wzrosła w ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci praktycznie w każdym kraju na świecie, a w niektórych krajach obserwuje się dalszy wzrost. Szybko rosnącemu rozpowszechnianiu się choroby na świecie nie można przypisać tylko czynników genetycznych, ale także ekspozycję osób predysponowanych na warunki środowiskowe. Interakcja gen-środowisko ma kluczowe znaczenie w patogenezie AZS, która wydaje się bardziej złożona niż wcześniej zakładano. Poszukiwanie nowych genów związanych z ryzykiem wystąpienia choroby może przyczynić się do lepszego zrozumienia etiopatogenezy AZS, jak również w przyszłości może być wykorzystane do zidentyfikowania biomarkerów, które mogą stanowić cenne narzędzie diagnostyczne i prognostyczne. Ponadto zidentyfikowanie nowych genów zaangażowanych w patogenezę AZS może przyczynić się do bardziej zaawansowanej oceny genotypów i fenotypów klinicznych atopowego zapalenia skóry, co może pozwolić na prawidłową identyfikację podgrup pacjentów, w których różne czynniki środowiskowe i genetyczne odgrywają kluczową rolę w klinicznym przebiegu choroby. Wzajemne oddziaływania zaburzeń bariery skórnej i odpowiedzi immunologicznej przyczyniają się do rozwoju choroby. Działania ukierunkowane na którykolwiek z tych szlaków mogą prowadzić do wprowadzenia nowych terapii.

## 6. WNIOSKI

### Wniosek ogólny:

W patogenezie atopowego zapalenia skóry oprócz innych, znanych wcześniej czynników, znaczącą rolę odgrywają również cząsteczki zaangażowane w przetwarzanie i prezentację antygeny, a ich warianty genetyczne wpływają na podatność na chorobę i jej przebieg.

### Wnioski szczegółowe:

1. Ochronne działanie genu *KIR2DS1* u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry.
2. Ochronne działanie allelu *HLA-C\*05* w badanej grupie chorych na atopowe zapalenie skóry.
3. Związek wariantu polimorficznego *rs26618* w genie *ERAP1* z ryzykiem zachorowania na atopowe zapalenie skóry, ale tylko u osób nieposiadających genu *KIR2DS1*.
4. Związek aktywności enzymatycznej wariantu *ERAP1 rs26618\*C* wobec prekursora epitopu *HLA-C\*05:01* z atopowym zapaleniem skóry.
5. Synergistyczny efekt genotypu *ERAP2 rs2248374\*A/A* - *ERAP1 rs26618\*C/C* związany z ryzykiem zachorowania na AZS.
6. Wpływ wariantów polimorficznych w genach *KIR*, *HLA*, *LMP2*, *TAP1*, *ERAP1* na wiek diagnozy, ciężkość przebiegu choroby oraz związek z chorobami współistniejącymi.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Admon A. ERAP1 shapes just part of the immunopeptidome. *Hum Immunol.* 2019; 80(5):296-301.
2. Affes H, Mahfoudh N, Kammoun A, Masmoudi A, Marrekchi S, Turki H, Makni H. HLA-A, B, DR and DQ alleles study in Tunisian patients with atopic dermatitis. *Tunis Med.* 2007;85:834-838.
3. Agrawal N, Brown MA. Genetic associations and functional characterization of M1 aminopeptidases and immune-mediated diseases. *Genes Immun.* 2014;15(8):521-7.
4. Aktas E, Akdis M, Bilgic S, Disch R, Falk CS, Blaser K, Akdis C, Deniz G. Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin Exp Immunol.* 2005;140:301-309.
5. Aldhamen YA, Pepelyayeva Y, Rastall DP, Seregin SS, Zervoudi E, Koumantou D, Aylsworth CF, Quiroga D, Godbehere S, Georgiadis D, Stratikos E, Amalfitano A. Autoimmune disease-associated variants of extracellular endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 induce altered innate immune responses by human immune cells. *J Innate Immun.* 2015;7:275-289.
6. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, Falcao RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol.* 2011;72(4):319-29.
7. Al-Shobaili HA, Ahmed AA, Alnomair N, Alobead ZA, Rasheed Z. Molecular Genetic of Atopic dermatitis: An Update. *Int J Health Sci.* 2016;10(1):96-120.
8. Ameen M, Allen MH, Fisher SA, Lewis CM, Cuthbert A, Kondeatis E, Vaughan RW, Murakami H, Nakagawa H, Barker JN. Corneodesmosin (CDSN) gene association with psoriasis vulgaris in Caucasian but not in Japanese populations. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(4):414-8.
9. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk ChS, Roetynck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagne F, Ugolini S, Vivier E. Human NK-cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* 2006;25:331-342.
10. Armandola A EA, Momburg F, Nijenhuis M, Bulbuc N, Früh K, Hämmerling GJ. A point mutation in the human transporter associated with antigen processing (TAP2) alters the peptide transport specificity. *Eur J Immunol.* 1996;26(8):1748-55.



11. Arons E, Kunin V, Schechter C, Ehrlich R. Organization and functional analysis of the mouse transporter associated with antigen processing 2 promoter. *J Immunol.* 2001; 15:166(6):3942-51.
12. Augusto DG, Lobo-Alves SC, Melo MF, Pereira NF, Petzl-Erler ML. Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease. *PLoS ONE* 2012;7(7).
13. Augusto DG, Petzl-Erler ML . KIR and HLA under pressure: evidences of coevolution across worldwide populations. *Hum Genet.* 2015;134(9):929-40.
14. Avena-Woods C. Overview of atopic dermatitis. *Am J Manag Care.* 2017; 23:115-123.
15. Aw M, Penn J, Gauvreau GM, Lima H, Sehmi R. Atopic March: Collegium Internationale Allergologicum. *Int Arch Allergy Immunol.* 2020;181(1):1-10.
16. Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(1):74-80.
17. Baurecht H, Hotze M, Brand S, Büning C, Cormican P, Corvin A i in. Genome-wide comparative analysis of atopic dermatitis and psoriasis gives insight into opposing genetic mechanisms. *Am J Hum Genet.* 2015;8:96(1):104-20.
18. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci.* 2018; 22:19(2).
19. Beziat V, Hugo G, Hilton HG, Norman PJ, Traherne J. A. Deciphering the killer-cell immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. *Immunology* 2016;150:248–264248.
20. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol.* 2010; 22(2):125-37.
21. Biedermann T, Skabytska Y, Kaesler S, Volz T. Regulation of T cell immunity in atopic dermatitis by microbes: The Yin and Yang of cutaneous inflammation. *Front Immunol.* 2015;13:6:353.
22. Bin L, and Leung DY. Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2016;12:52.
23. Błachowicz O, Zwolińska K. Rola genów kodujących immunoglobulinopodobne receptory komórek cytotoksycznych (KIR) oraz ich ligandy w podatności i przebiegu zakażenia HIV. *Postepy Hig Med Dośw.* 2016;70:1409-1423.
24. Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev.* 2011;242(1):233-46.

25. Bonamonte D, Filoni A, Vestita M, Romita P, Foti C, Angelini G. The role of the environmental risk factors in the pathogenesis and clinical outcome of atopic dermatitis. *Biomed Res Int.* 2019;21:2450605.
26. Boyton RJ, Altmann DM. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease *Clin Exp Immunol.* 2007;149(1):1-8.
27. Bożek A, Reich A. Metody oceny nasilenia atopowego zapalenia skóry. *Przeegl Dermatol.* 2016;103:479-485.
28. Brooks P, Murray RZ, Mason GGF, Hendil KB, Rivett AJ. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 2000; 352:611-615.
29. Brucet M, Marques L, Sebastian C, Lloberas J, Celada A. Regulation of murine TAP1 and LMP2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1. *Genes Immun.* 2004;5(1):26-35.
30. Cabanillas B, Novak N. Atopic dermatitis and filaggrin. *Curr Opin Immunol.* 2016; 42:1-8.
31. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112(3): 461–469.
32. Capon F. The Genetic Basis of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2017;25:18(12).
33. Carrillo-Bustamante P, Kesmir C, de Boer RJ. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics* 2016;68(1):3-18.
34. Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US) 2003;28.
35. Chapel A, Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Ziegler M, Lunemann S, Martus G, Altfeld M. Peptide-specific engagement of the activating NK cell receptor KIR2DS1. *Sci Rep.* 2017;25:7(1):2414.
36. Chen H, Li L, Weimershaus M, Evnouchidou I, van Endert P, Bouvier M. ERAP1-ERAP2 dimers trim MHC I-bound precursor peptides; implications for understanding peptide editing. *Sci Rep.* 2016;12:6:28902.
37. Cifaldi L, Romania P, Lorenzi S, Locatelli F, Fruci D. Role of endoplasmic reticulum aminopeptidases in health and disease: from infection to cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(7):8338-52.
38. Colucci F, Traherne J. Killer-cell immunoglobulin-like receptors on the cusp of modern immunogenetics. *Immunology.* 2017;152(4):556-561.
39. Colucci F. The role of KIR and HLA interactions in pregnancy complications. *Immunogenetics.* 2017;69:557–565.

40. Compagnone M, Cifaldib L, Frucia D. Regulation of ERAP1 and ERAP2 genes and their dysfunction in human cancer. *Human Immunology*. 2019;80:318-324.
41. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-40.
42. D'Alicandro V, Romania P, Melaiu O, Fruci D. Role of genetic variations on MHC class I antigen-processing genes in human cancer and viral-mediated diseases. *Mol Immunol*. 2019;113:11-15.
43. Deniz G, van de Veen W, Akdis M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 32(3):527-535.
44. Diaz-Pena R, Mondelo-Macia P, Molina de la Torre AJ, Sanz-Pamplona R, Moreno V, Martín V. Analysis of killer immunoglobulin-like receptor genes in colorectal cancer. *Cells*. 2020;24:9(2).
45. Dokmeci E, Herrick CA. The immune system and atopic dermatitis. *Semin Cutan Med Surg*. 2008;27(2):138-43.
46. Ebstein F, Kloetzel P-M, Kruger E, Seifert U. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cell. Mol. Life Sci*. 2012;69:2543–2558.
47. Egawa G, Weninger W. Pathogenesis of atopic dermatitis: A short review *Cogent Biology*. 2015;1:1103459.
48. Eggensperger S, Tampe R. The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity. *Biol Chem*. 2015;396(9-10):1059-72.
49. Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza-Gordillo J, Rodríguez E, Matanovic A, Marenholz I i in. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2013;45(7):808-12.
50. Elliott T. Transporter associated with antigen processing. *Advances in Immunology*. 1997; 65.
51. Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G i in. A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2009;41(5):596-601.
52. Esparza-Gordillo J1, Schaarschmidt H, Liang L, Cookson W, Bauerfeind A, Lee-Kirsch MA i in. A functional IL-6 receptor (IL6R) variant is a risk factor for persistent atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):371-7.
53. Evnouchidou I, Kamal RP, Seregin SS, Goto Y, Tsujimoto M, Hattori A, Voulgari PV, Drosos AA, Amalfitano A, York IA, Stratikos E. Coding single nucleotide polymorphisms of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 can affect antigenic

- peptide generation in vitro by influencing basic enzymatic properties of the enzyme. *J Immunol.* 2011;186:1909-1913.
54. Evnouchidou I, van Endert P. Peptide trimming by endoplasmic reticulum aminopeptidases: Role of MHC class I binding and ERAP dimerization. *Hum Immunol.* 2019;80(5):290-295.
55. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Michaelsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood.* 2017;115:1166-1174.
56. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Yenan T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010;18:115(11):2167-2176.
57. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56<sup>bright</sup> natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood.* 2003;15:101(8):3052-7.
58. Ferrington DA, Gregerson DS. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;109:75-112.
59. Gadola SD, Moins-Teisserenc HT, Trowsdale J, Gross WL, Cerundolo V. TAP deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2000;121(2):173-8.
60. Gardiner CM. Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why. *Int J Immunogenet.* 2008;35(1):1-8.
61. Geng J, Zaitouna AJ, Raghavan M. Selected HLA-B allotypes are resistant to inhibition or deficiency of the transporter associated with antigen processing (TAP). *PLoS Pathog.* 2018;14(7):1007171.
62. George D, Mallery M. *SPSS for Windows Step by Step: A Simple Guide and Reference, 17.0 update (10a ed.)* Boston: Pearson. 2010.
63. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia* PWN 2017.
64. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res.* 2010;39:D913-9.
65. Goto Y, Hattori A, Ishii Y, Tsujimoto M. Reduced activity of the hypertension-associated Lys528Arg mutant of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase-1. *FEBS Lett.* 2006;20:580(7):1833-8.

66. Goto Y, Ogawa Y, Tsumoto H, Miura Y, Nakamura TJ, Ogawa K, Akimoto Y, Kawakami H, Endo T, Yanoshita R, Tsujimoto M. Contribution of the exosome-associated form of secreted endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 to exosome-mediated macrophage activation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018; 1865(6):874-888.
67. Gourraud PA, Meenagh A, Cambon-Thomsen A, Middleton D. Linkage disequilibrium organization of the human KIR superlocus: implications for KIR data analyses. *Immunogenetics.* 2010;62(11-12):729-40.
68. Guan YP, Yang XX, Yao GY, Qiu F, Chen J, Chen LJ, Ye CS, Li M . Breast cancer association studies in a Han Chinese population using 10 European-ancestry-associated breast cancer susceptibility SNPs. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(1):85-91.
69. Guethlein LA, Norman PJ, Hilton HG, Parham P. Co-evolution of MHC class I and variable NK cell receptors in placental mammals. *Immunol Rev.* 2015;267(1): 259-82.
70. Guttman-Yassky E, Krueger JG. Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? *Curr Opin Immunol.* 2017;48:68-73.
71. Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis – part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;127:1420-1432.
72. Hanson AL, Morton CJ, Parker MW, Bessette D, Kenna TJ. The genetics, structure and function of the M1 aminopeptidase oxytocinase subfamily and their therapeutic potential in immune-mediated disease. *Hum Immunol.* 2019;80(5):281-289.
73. Hattori A, Matsumoto K, Mizutani S, Tsujimoto M. Genomic organization of the human adipocyte-derived leucine aminopeptidase gene and its relationship to the placental leucine aminopeptidase/oxytocinase gene. *J Biochem.* 2001;130(2):235-41.
74. Hattori A, Tsujimoto T. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry, physiology and pathology. *J. Biochem.* 2013;154(3):219–228.
75. Hayley M, Bourbigot S, Booth V. Self-association of an activating natural killer cell receptor, KIR2DS1. *PLoS ONE* 2011;6:e23052.
76. Hermann C, Trowsdale J, Boyle LH. TAPBPR: a new player in the MHC class I presentation pathway. *Tissue Antigens.* 2015;85:155–167.
77. Hermann C, van Hateren A, Trautwein N, Neerincx A, Duriez PJ, Stevanović S, Trowsdale J, Deane JE, Elliott T, Boyle LH. TAPBPR alters MHC class I peptide presentation by functioning as a peptide exchange catalyst. *Elife.* 2015;6:4.

78. Hilton HG, Parham P. Missing or altered self: human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics*. 2017;69:567579.
79. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M i in. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012;44(11):1222-6.
80. Horowitz A, Djaoud Z, Nemat-Gorgani N, Blokhuis J, Hilton HG, Beziat V, Malmberg KJ, Norman PJ, Guethlein LA, Parham P. Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Sci. Immunol. Sci Immunol*. 2016;1(3).
81. Hsu, KC., Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulinlike receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. 2002; *Immunol Rev*. 2002;90:40-52.
82. Ivanova M, Creary LE, Al Hadra B, Lukanov T, Mazzocco M, Sacchi N, Ameen R, Al-Shemmari S, Moise A, Ursu LD, Constantinescu I, Vayntrub T, Fernández-Vina MA, Shivarov V, Naumova. E17th IHIW component "Immunogenetics of Ageing" - New NGS data. *Hum Immunol*. 2019;80(9):703-713.
83. Izakovicova Holla L, Vasku A, Izakovic V, Znojil V. The interaction of the polymorphisms in transporter of antigen peptides (TAP) and lymphotoxin alpha (LT-alpha) genes and atopic diseases in the Czech population. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(9):1418-23.
84. Jamil KM, Khakoo SI. KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;298348.
85. Jiang W, Johnson C, Jayaraman J, Simecek N, Noble J, Moffatt MF, Cookson WO, Trowsdale J, Traherne JA. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res*. 2012;22(10):1845-54.
86. Johnston-Carey H K, LCD, Davies KJA The Immunoproteasome in Oxidative Stress, Aging, and Disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015;51(4): 268–281.
87. Just HL, Deleuran M, Vestergaard C, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K. T-cell receptor excision circles (TREC) in CD4+ and CD8+ T-cell subpopulations in atopic dermatitis and psoriasis show major differences in the emission of recent thymic emigrants. *Acta Dermatol Venereol*. 2008;88:566-572.
88. Kamińska K, Plata-Nazar K. Atopowe zapalenie skóry u dzieci. Program ALERNI, *Forum Medycyny Rodzinnej*. 2009;3(5):367–371.

89. Kapur S, Watson W, Carr S. Atopic dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018; 12:14:52.
90. Kastelan M, Prpić-Massari L, Brajac I. Apoptosis in psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2009;17(3):182-6.
91. Kaufman BP, Guttman-Yassky E, Alexis AF Atopic dermatitis in diverse racial and ethnic groups-Variations in epidemiology, genetics, clinical presentation and treatment. *Exp Dermatol.* 2018;27(4):340-357.
92. Kelly A, Trowsdale J. Genetics of antigen processing and presentation. *Immunogenetics.* 2019;71:161-170.
93. Kenneth LW, White LC, Kelly A, Beck S, Trowsdale J, Ting JPY. Coordinate Regulation of the Human TAP1 and LMP2 Genes from a Shared Bidirectional Promoter. *J. Exp. Med.* 1995;181:1459-1471.
94. Kim J, Kim BE, Leung DYM. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy Asthma Proc.* 2019;1:40(2):84-92.
95. Kim J, Kim Y, Lee K-A. Ethnic differences in gastric cancer genetic susceptibility: Allele flips of interleukin gene. *World J Gastroenterol.* 2010;20(16):4558–4565.
96. Kim JE, Kim JS, Cho DH, Park HJ. Molecular mechanisms of cutaneous inflammatory disorder: Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17:1234.
97. Kim KE, Cho SH, Choi SJ, Jeong JH, Lee SH, Park CW, Tae K. TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in korean patients with allergic rhinitis. *J Korean Med Sci.* 2007; 22(5):825–831.
98. Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K. New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J Immunol Res.* 2015;54:1984.
99. Klonowska J, Gleń J, Nowicki RJ, Trzeciak M. New cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis-new therapeutic targets. *Int J Mol Sci.* 2018;9:19(10).
100. Kochan G, Krojer T, Harvey D, Fischer R, Chen L, Vollmar M, von Delft F, Kavanagh KL, Brown MA, Bowness P, Wordsworth P, Kessler BM, Oppermann U. Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108(19):7745-50.
101. Kowalska-Oleńdzka E, Czarnecka M, Baran A. Epidemiology of atopic dermatitis in Europe. *J Drug Assess.* 2019;12;8(1):126-128.

102. Kramer U, Illig T, Grune T, Krutmann J, Esser C. Strong associations of psoriasis with antigen processing LMP and transport genes TAP differ by gender and phenotype. *Genes Immun.* 2007;8(6):513-7.
103. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. Semin Immunol. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol.* 2008;20(6):343-52.
104. Kuśnierczyk P, Stratikos E. Endoplasmic reticulum aminopeptidases as a double-faced tool to increase or decrease efficiency of antigen presentation in health and disease. *Hum Immunol.* 2019;80(5):277-280.
105. Kuśnierczyk P. Antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej budowa, genetyka i funkcja biologiczna. *KOSMOS.* 1992;41(4):349 -369.
106. Kuśnierczyk P. Budowa i funkcja immunoglobulinopodobnych receptorów naturalnych komórek cytotoksycznych u człowieka *Chemistry, Environment, Biotechnology.* 2010;165-174.
107. Kuśnierczyk P. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene associations with autoimmune and allergic diseases, recurrent spontaneous abortion, and neoplasms. *Front Immunol.* 2013;29:4:8.
108. Kuśnierczyk P. Sensing the self: structure, genetics, biological function and possible disease associations of KIR genes and molecules. *Leading-Edge Immunology Research*, Nova Science Publishers, New York, 2006;95-125.
109. Lankat-Buttgereit B, Tampé R. The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett.* 1999;31:464(3):108-12.
110. Lankat-Buttgereit B, Tampé R. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev.* 2002;82(1):187-204.
111. Larsen FS, Grunnet N, Vase P. HLA antigens in atopic dermatitis. A family study. *Dermatologica.* 1980;160:17-20.
112. Le Morvan C, Cogne M, Drouet M HLA-A and HLA-B transcription decrease with ageing in peripheral blood leucocytes. *Clin Exp Immunol.* 2001; 125(2):245-50.
113. Le Page ME, Goodridge JP, John E, Christiansen FT, Witt CS. Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- $\gamma$  responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol.* 2014;15:192(2):732-40.
114. Lee HJ, Ha SJ, Han H, Kim JW. Distribution of HLA-A, B alleles and polymorphisms of TAP and LMP genes in Korean patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(12):1867-74.



115. Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst.* 2013;21:105(16):1172-87.
116. Lesiak A, Przybyłowska K, Zakrzewski M, Stelmach I, Kuna P, van Geel M, Sysa-Jędrzejowska A, Narbutt J. Mutacje R501X i 2282del4 w genie filagryny a atopowe zapalenie skóry R501X and 2282del4 filaggrin mutations and atopic dermatitis. *Alergia Astma Immunologia.* 2010;15(3):162-169.
117. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113(5):651-7.
118. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int.* 2013;62(2):151-61.
119. Liang Y, Chang C, Lu Q. The Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis- Filaggrin and Other Polymorphisms. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016 ; 51(3):315-328.
120. Liang-Shiou Ou, Donald YM, Leung, MD. Advances in atopic dermatitis. *Chang Gung Med J.* 2005;28:1-8.
121. Liu R, Chen X, Qi J. Associations of TAP1 genetic polymorphisms with atopic diseases: asthma, rhinitis and dermatitis. *Oncotarget.* 2018;9:1553-1562.
122. Liu S, Cao D, Shen Y, Li Y, Li Y, Shi L, Yu J, Li C, Zhang X, Sun M, Yao Y. The ERAP gene is associated with HCV chronic infection in a Chinese Han population. *Hum Immunol.* 2017;78731-738.
123. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling NK cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol.* 2013;31.
124. Lopez de Castro JA, Alvarez-Navarro C, Brito A, Guasp P, Martín-Esteban A, Sanz-Bravo A. Molecular and pathogenic effects of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in MHC-I-associated inflammatory disorders: Towards a unifying view. *Mol Immunol.* 2016;77:193-204.
125. Lopez de Castro JA. How ERAP1 and ERAP2 shape the peptidomes of disease-associated MHC-I proteins. *Front Immunol.* 2018;30:9:2463.
126. Lorente E, García R, Lopez D. Allele-dependent processing pathways generate the endogenous Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I peptide repertoire in transporters associated with antigen processing (TAP)-deficient cells. *J Biol Chem.* 2011;286( 44):38054-38059.

127. Lorente E, Garcia R, Mir C, Barriga A, Lemonnier FA, Ramos M, Lopez D. Role of metalloproteases in vaccinia virus epitope processing for transporter associated with antigen processing (TAP)-independent Human Leukocyte Antigen (HLA)-B7 Class I antigen presentation. *J Biol Chem.* 2012;287(13): 9990-10000.
128. Łuszczek W, Kubicka W, Cisło M, Nockowski P, Mańczak M, Woszczek G, Baran E, Kuśnierczyk P. Strong association of HLA-Cw6 allele with juvenile psoriasis in Polish patients. *Immunol Lett.* 2003;2;85(1):59-64.
129. Mandal RK, Dar SA, Jawed A, Wahid M, Lohani M, Panda AK, Mishra BN, Akhter N, Areeshi MY, Haque S. Impact of LMP7 (rs2071543) gene polymorphism in increasing cancer risk: evidence from a meta-analysis and trial sequential analysis. *Oncotarget.* 2017; 21:9(5):6572-6585.
130. Manianguou B, Legrand N, Alizadeh M, Guyet U, Willem C, David G, Charpentier E, Walencik A, Retière C, Gagne K. Killer immunoglobulin-like receptor allele determination using next-generation sequencing technology. *Front Immunol.* 2017; 8: 547.
131. Margolis DJ, Mitra N, Kim B, Gupta J, Hoffstad OJ, Papadopoulos M, Wubbenhorst B, Nathanson KL, Duke JL, Monos DS, Kamoun M. Association of HLA-DRB1 genetic variants with the persistence of atopic dermatitis. *Hum Immunol.* 2015;76(8): 571-7.
132. Matamoros N, Mila J, Llano M, Balas A, Vicario JL, Pons J, Crespi C, Martinez N, Iglesias-Alzueta J, Lopez-Botet M. Molecular studies and NK cell function of a new case of TAP2 homozygous human deficiency. *Clin Exp Immunol.* 2001;125(2):274-82.
133. Maxwell LD, Ross OA, Curran MD, Reac IM, Middleton D. Investigation of KIR diversity in immunosenescence and longevity within the Irish population. *Experimental Gerontology.* 2004;39:1223–1232.
134. Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology.* 2010;129(1): 8–19.
135. Mishto M, Santoro A, Bellavista E, Sessions R, Textoris-Taube K, Dal Piaz F, Carrard G, Forti K, Salvioli S, Friguet B, Kloetzel PM, Rivett AJ, Franceschi. A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localisation and insight into the regulatory mechanisms. *C. Biol Chem.* 2006;387(4):417-29.

136. Moosbrugger-Martinz V, Gruber R, Ladstatter K, Bellutti M, Blunder S, Schmutz M, Dubrac S. Filaggrin null mutations are associated with altered circulating Tregs in atopic dermatitis. *J Cell Mol Med.* 2019;23(2):1288-1299.
137. Mpakali A, Giastas P, Mathioudakis N, Mavridis IM, Saridakis E, Stratikos E. Structural basis for antigenic peptide recognition and processing by endoplasmic reticulum (ER) aminopeptidase 2. *J. Biol. Chem.* 2015;290:26021-26032a.
138. Mpakali A, Saridakis E, Harlos K, Zhao Y, Papakyriakou A, Kokkala P, Georgiadis D, Stratikos E. Crystal Structure of Insulin Regulated Aminopeptidase with Bound Substrate Analogue Provides Insight on Antigenic Epitope Precursor Recognition and Processing. *J Immunol.* 2015;195:2842-2851b.
139. Naderi M, Hashemi M, Amininia S. Association of TAP1 and TAP2 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2016;15(1):62-8.
140. Nagata N, Oshida T, Yoshida NL, Yuyama N, Sugita Y, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H. Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patient. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;132(2):156-167.
141. Nedoszytko B, Lange M, Sokołowska-Wojdyło M, Renke J, Trzonkowski P, Sobjanek M, Szczerkowska-Dobosz A, Niedozytko M, Górka A, Romantowski J, Czarny J, Skokowski J, Kalinowski L, Nowicki R. The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part II: The Treg role in skin diseases pathogenesis. *Adv Dermatol Allergol.* 2017;(5):405-417.
142. Nestorowicz K, Bogacz A, Bukowska A, Chraplak M, Czerwiński J, Góralski M, Gronkowski M, Jopek K, Kniżewski Ł, Kolasiński M, Kowalski ML, Nowak J, Sowiński M, Wróblewska-Kabba S, Tymoniuk B, Dudkiewicz M. High-resolution allele frequencies for NGS based HLA-A, B, C, DQB1 and DRB1 typing of 23,595 bone marrow donors recruited for the Polish central potential unrelated bone marrow donor registry. *Hum Immunol.* 2020;81(2-3):49-51.
143. Novak N, Leung DY. Advances in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(6):778-83.
144. Nowicki R. ABC A topowego zapalenia skóry. Termedia Wydawnictwa Medyczne. Poznań 2015.
145. Nutten S. Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab.* 2015;66:1:8-16.

146. O'huigin C, Kulkarni S, Yunping Xu Y, Den Z, Kidd J, Kidd K, Gao X, Carrington M. The molecular origin and consequences of escape from miRNA regulation by HLA-C Alleles. *Amer J Hum Genet* 2011; 89:424–431.
147. Ombrello MJ, Kastner DL, Remmers EF. Endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 and rheumatic disease: genetics. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;27:349–356.
148. Paladini F, Fiorillo MT, Vitulano C, Tedeschi V, Piga M, Cauli A, Mathieu A, Sorrentino R. An allelic variant in the intergenic region between ERAP1 and ERAP2 correlates with an inverse expression of the two genes. *Sci Rep.* 2018;10:8(1):10398.
149. Parham P, Moffett A. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):133-44.
150. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Guethlein LA. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012; 19:367(1590):800-11.
151. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):201-14.
152. Paternoster L, Standl M, Chen CM, Ramasamy A, Bønnelykke K, Duijts I, i in. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new risk loci for atopic dermatitis *Nat Genet.* 2011;25;44(2):187-92.
153. Paternoster L, Standl M, Waage J, Baurecht H, Hotze M, Strachan DP i in. Multi-ethnic genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2015;47(12):1449-1456.
154. Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, Bertaina A, Moretta F, Del Zotto G, Pietra G, Mingari MC, Locatelli F, Moretta L. Killer Ig-like receptors (KIRs): Their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation. *Front Immunol.* 2019;28:10:1179.
155. Polańska A, Jenerowicz D. Rys historyczny wybranych zagadnień związanych z etiopatogenezą i leczeniem atopowego zapalenia skóry. *Nowiny Lekarskie.* 2008;77:5, 382–384.
156. 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;18;6(2):e16933.

157. Portelli MA, Hodge E, Sayers I. Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):21-31.
158. Praest P, Luteijn RD, Brak-Boer IGJ, Lanfermeijer J, Hoelen H, Ijgosse L, Costa AI, Gorham RD Jr, Lebbink RJ, Wiertz EJHJ. *Mol Immunol*. The influence of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms on TAP function and its inhibition by viral immune evasion proteins. 2018;101:55-64.
159. Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, French M, Mallal S, Christiansen F. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* 1999;167:257-74.
160. Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Kim TY, Kim TG. Association of TAP and HLA-DM genes with psoriasis in Koreans. *J Invest Dermatol*. 2003;120(4):616-22.
161. Raciborski F, Jahnz-Rozyk K, Kłak A, Sybilski AJ, Grąbczewska AM, Brzozowska M, Śliwczyński AM. Epidemiology and direct costs of atopic dermatitis in Poland based on the National Health Fund register (2008-2017). *Postepy Dermatol Alergol*. 2019;36(6):727-733.
162. Rebane A, Zimmermann MA, Baurecht H, Koreck A, Karelson M, i in. Mechanisms of IFN- $\gamma$ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2012;129, 1297-1306.
163. Reeves E, Edwards CJ, Elliott T, James E. Naturally occurring ERAP1 haplotypes encode functionally distinct alleles with fine substrate specificity. *J Immunol*. 2013; 191:35-43.
164. Reeves E, James E. The role of polymorphic ERAP1 in autoinflammatory disease. *Biosci Rep*. 2018;29:38(4).
165. Rerknimitr P, Otsuka A, Nakashima C, Kabashima K. The etiopathogenesis of atopic dermatitis: barrier disruption, immunological derangement, and pruritus. *Inflamm Regen*. 2017;5:37:14.
166. Ritz U, Seliger B. The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance. *Mol Med*. 2001; 7(3):149-58.
167. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA Database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43:423-431.
168. Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE. IPD-the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res*. 2013:41.

169. Robinson J, Soormally AR, Hayhurst JD, Marsh SGE. The IPD-IMGT/HLA Database - New developments in reporting HLA. *Human Immunology*. 2016;77:233-237.
170. Roe D, Vierra-Green C, Pyo CW, Eng K, Hall R, Kuang R, Spellman S, Ranade S, Geraghty DE, Maiers M. Revealing complete complex KIR haplotypes phased by long-read sequencing technology. *Genes and Immunity*. 2017;18:127-134.
171. Sabounchi S, Bollyky J, Nadeau K. Review of Environmental Impact on the Epigenetic Regulation of Atopic Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015; 15(6):33.
172. Saida B, Dani P, Patnaik N, Agrawal B, Rajarathna T, Jaiswal A, Singh K, Rani R. Haplotypes of Polymorphic Antigen Processing Genes for Low Molecular Mass Polypeptides (LMP2 and LMP7) are Strongly Associated with Type 1 Diabetes in North India. *J Diabetes Metab*. 2014, 5:11.
173. Samoliński B, Raciborski F, Lipiec A, Tomaszewska A, Krzych-Falta E, Samel-Kowalik P, Walkiewicz A, Lusawa A, Borowicz J, Komorowski J, Samolińska-Zawisza U, Sybilski A.J, Piekarska B, Nowicka A. Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce (ECAP). *Alergologia Polska*. 2014;10-18.
174. Sanz-Bravo A, Martin-Esteban A, Kuiper JJW, García-Peydro M, Barnea E, Admon A, López de Castro JA. Allele-specific alterations in the peptidome underlie the joint association of HLA-A\*29:02 and Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 (ERAP2) with Birdshot Chorioretinopathy. *Mol Cell Proteomics*. 2018;17(8):1564-1577.
175. Saulle I, Vanetti C, Goglia S, Vicentini C, Tombetti E, Garziano M, Clerici M, Biasin M. A New ERAP2/Iso3 isoform expression is triggered by different microbial stimuli in human cells. Could it play a role in the modulation of SARS-CoV-2 infection? *Cells*. 2020;9:1951b.
176. Saulle I, Vicentini C, Clerici M, Biasin M. An Overview on ERAP Roles in Infectious Diseases. *Cells*. 2020;14:9(3)a.
177. Saunders PM, Pymm P, Pietra G, Hughes VA, Hitchen C, O'Connor GM, Loiacono F, Widjaja J, Price DA, Falco M, Mingari MC, Moretta L, McVicar DW, Rossjohn J, Brooks AG, Vivian JP. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1 polymorphism defines distinct hierarchies of HLA class I recognition *J Exp Med*. 2016;2:213(5): 791-807.
178. Schaarschmidt H, Ellinghaus D, Rodriguez E, Kretschmer A, Baurecht H, Lipinski S i in. A genome-wide association study reveals 2 new susceptibility loci for atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(3):802-6.

179. Schmidt A, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C. Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Human Immunology*. 2009;70:895–902.
180. Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Inoko H. Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunol Rev*. 1999;167:193-9.
181. Sim MJ, Malaker SA, Khan A, Stowell JM, Shabanowitz J, Peterson ME, Rajagopalan S, Hunt DF, Altmann DM, Long EO, Boyton RJ. Canonical and cross-reactive binding of NK cell inhibitory receptors to HLA-C allotypes is dictated by peptides bound to HLA-C. *Front Immunol*. 2017;8:193.
182. Slomov E, Loewenthal R, Korostishevsky M, Goldberg I, Brenner S, Gazit E. Pemphigus vulgaris is associated with the transporter associated with antigen processing (TAP) system *Hum Immunol*. 2005;66(12):1213-22.
183. Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*. 2006;38(3):337-42.
184. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(6):118-27.
185. Stawczyk-Macieja M, Szczerkowska-Dobosz A, Rębała K, Gabig-Cimińska M, Nowicki RJ, Haraś A, Cybulska L, Kapińska E. ERAP1 and HLA-C\*06 are strongly associated with the risk of psoriasis in the population of northern Poland. *Postępy Dermatol Alergol*. 2018;35(3):286–292.
186. Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A, Gauthier L, Romagné F, Ferracci G, Arosa FA, Moretta A, Sun PD, Ugolini S, Vivier E. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 13;102(37):13224-9.
187. Stratikos E, Stamogiannos A, Zervoudi E, Fruci D. A role for naturally occurring alleles of endoplasmic reticulum aminopeptidases in tumor immunity and cancer predisposition. *Front Oncol*. 2014;19:4:363.
188. Stratikos E, Stern LJ. Antigenic peptide trimming by ER aminopeptidases-insights from structural studies. *Mol Immunol*. 2013;55(3-4):212-9.

189. Sullivan M, Silverberg NB. Current and emerging concepts in atopic dermatitis pathogenesis. *Clin Dermatol*. 2017;35(4):349-353
190. Sun LD, Xiao FL, Li Y, Zhou WM, Tang HY, Tang XF, Zhang H, Schaarschmidt H i in. Genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Chinese Han population. *Nat Genet*. 2011;12;43(7):690-4.
191. Svejgaard, E, Jakobsen B, Svejgaard A. Studies of HLA-ABC and DR antigens in pure atopic dermatitis and atopic dermatitis combined with allergic respiratory disease. *Acta Derm. Venereol*. 1985;114:72-76.
192. Szczerkowska-Dobosz A, Placek W, Szczerkowska Z, Roszkiewicz J. Psoriasis vulgaris with the early and late onset-HLA phenotype correlations. *Arch Immunol Ther Exp*. 1996;44(4):265-9.
193. Szczerkowska-Dobosz A, Rebała K, Szczerkowska Z, Witkowska-Toboła A. Correlation of HLA-Cw\*06 allele frequency with some clinical features of psoriasis vulgaris in the population of northern Poland. *J Appl Genet*. 2004;45(4):473-6.
194. Szczypiorska M, Sanchez A, Bartolome N, Arteta D, Sanz J, Brito E, Fernandez P, Collantes E, Martínez A, Tejedor D, Artieda M, Mulero J. ERAP1 polymorphisms and haplotypes are associated with ankylosing spondylitis susceptibility and functional severity in a Spanish population. *Rheumatology* 2011;50:1969-75.
195. Takejima P, Agondi RC, Rodrigues H, Aun MV, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Allergic and nonallergic asthma have distinct phenotypic and genotypic features. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017;172:150-160.
196. Tanioka T, Hattori A, Mizutani S, Tsujimoto M. Regulation of the human leukocyte-derived arginine aminopeptidase/endoplasmic reticulum-aminopeptidase 2 gene by interferon-gamma. *FEBS J*. 2005;272(4):916-28.
197. Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):239-45.
198. Thomas R, Apps R, Qi Y, Gao X, Male V, O'hUigin C, O'Connor G i in. HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nature Genet*. 2009;4:1290-1294.
199. Thomsen SF. Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy*. 2014;2:354250.
200. Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *Eur Clin Respir J*. 2015;24:2.



201. Trowsdale J, Des C, Alexander DJ., Barrow James A. Traherne J. Surveillance of cell and tissue perturbation by receptors in the LRC, *Immunological Reviews* 2015;267: 117–136.
202. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:301-23.
203. Tsakok T, Woolf R, Smith CH, Weidinger S, Flohr C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol.* 2019;180(3):464-474.
204. Tsujimoto M, Aoki K, Ohnishi A, Goto Y. Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 beyond antigenic peptide-processing enzyme in the endoplasmic reticulum. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(2):207-214.
205. Turner JD, Schwartz RA. Atopic dermatitis. A clinical challenge. *Acta Dermatoven APA.* 2006;15:2.
206. Vambutas A. Vincent R. Bonagura, Reed EF, Abramson AL, Mullooly V, DeVoti J, Gjertson DW, Steinberg BM. Polymorphism of transporter associated with antigen presentation 1 as a potential determinant for severity of disease in recurrent respiratory papillomatosis caused by human papillomavirus types 6 and 11. *J Infect Dis.* 2004;189:871-9.
207. Vandiedonck C, Knight JC. The human major histocompatibility complex as a paradigm in genomics research. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2009;8(5): 379–394.
208. Veal CD, Capon F, Allen MH, Heath EK, Evans JC, Jones A, Patel S, Burden D, Tillman D, Barker JN, Trembath RC. Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am J Hum Genet.* 2002;71(3):554-64.
209. Vierra-Green C, Roe D, Hou L, Hurley CK, Rajalingam R, Reed E, Lebedeva T, Yu N, Stewart M, Noreen H, Hollenbach JA, Guethlein LA, Wang T, Spellman S, Maiers M. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. *PLoS One.* 2012;7(11).
210. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:217-251.
211. Vince N, Li H, Ramsuran V, Naranbhai V, Duh FM, Fairfax BP, Saleh B, Knight JC, Anderson SK, Carrington M. HLA-C level is regulated by a polymorphic binding site in the HLA-C promoter region. *Am J Hum Genet.* 2016;1:99(6):1353-1358.

212. von Bubnoff D, Andres E, Hentges F, Bieber T, Michel T. Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:60-68.
213. Waszczykowska E. Atopowe zapalenie skóry - postępowanie lecznicze. *Przegląd alergologiczny.* 2004;1(1):24-29.
214. Weidinger S, Willis-Owen SA, Kamatani Y, Baurecht H, Morar N, Liang L i in. A genome-wide association study of atopic dermatitis identifies loci with overlapping effects on asthma and psoriasis. *Hum. Mol. Genet.* 2013;22:4841-4856.
215. Wiktorowicz K, Kaszkowiak K. Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. *Funkcja antygenów zgodności tkankowej. Forum Reumatol.* 2018;4:2:87-94
216. Williams F, Meenagh A, Sleator C, Cook D, Fernandez-Vina M, Bowcock AM, Middleton D. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis. *Hum. Immunol.* 2005;66(7):836-41.
217. Wiśniewski A, Matusiak Ł, Szczerkowska-Dobosz A, Nowak I, Kuśnierczyk P. HLA -C\*06:02-independent, gender-related association of PSORS1C3 and PSORS1C1/CDSN single-nucleotide polymorphisms with risk and severity of psoriasis. *Mol Genet Genomics.* 2018;293(4):957-966.
218. Wiśniewski A, Wilczyńska K, Wagner M, Jasek M, Niepiekło-Miniewska W, Nowak I, Matusiak Ł, Szczerkowska-Dobosz A, Kuśnierczyk P. Is the TAP2 single nucleotide polymorphism rs241447 truly associated with psoriasis in Poles? *Hum Immunol.* 2020;81(2-3):85-90.
219. Yang L, Ji Y, Chen L, Li M, Wu F, Hu J, Jiang J, Cui X, Chen Y, Pang L, Wei Y, Li F. Genetic variability in LMP2 and LMP7 is associated with the risk of esophageal squamous cell carcinoma in the Kazakh population but is not associated with HPV infection. *PLoS One* 2017;26;12(10).
220. Yao Y, Wiśniewski A, Ma Q, Kowal A, Porębska I, Pawełczyk K, Yu J, Dubis J, Żuk N, Li Y, Shi L, Kuśnierczyk P. Single nucleotide polymorphisms of the ERAP1 gene and risk of NSCLC: A comparison of genetically distant populations, Chinese and Caucasian. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016;64:117-122.
221. Ye CJ, Chen J, Villani A-C, Gate RE, Subramaniam M, Bhangale T, Lee MN, Raj T, Raychowdhury R, Li W, Rogel N, Simmons S, Imboywa SH, Chipendo PI, McCabe C, Lee MH, Frohlich IY, Stranger BE, De Jager PL, Regev A, Behrens T, Hacohen N. Genetic analysis of isoform usage in the human anti-viral response reveals

- influenza-specific regulation of ERAP2 transcripts under balancing selection. *Genome Res.* 2018; 28:1812–1825.
222. Yewdell J, Latham C, Bacik I, Spies T, Bennink J. MHC-encoded proteasome subunits LMP2 and LMP7 are not required for efficient antigen presentation. *J Immunol.* 1994;1:152(3):1163-70.
223. Zervoudi E, Papakyriakou A, Georgiadou D, Evnouchidou I, Gajda A, Poreba M, Salvesen GS, Drag M, Hattori A, Swevers L, Vourloumis D, Stratikos E. Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides. *Biochem J.* 2011;435:411-420.
224. Zhou F, Cao H, Zuo X, Zhang T, Zhang X, Liu X i in.. Deep sequencing of the MHC region in the Chinese population contributes to studies of complex disease. *Nature Genet.* 2016;48:740-746.
225. Zhou F, Zhang X. Major Histocompatibility Complex and Psoriasis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2018;19(2):79-80.

**8. SPIS TABEL**

Tabela 1. Kryteria rozpoznania atopowego zapalenia skóry .....	19
Tabela 2. Podsumowanie badań przeszukiwania genomu w atopowym zapaleniu skóry.....	24
Tabela 3. Receptory KIR i ich ligandy.....	37
Tabela 4. Zmienność antygenów HLA klasy I.....	40
Tabela 5. Charakterystyka pacjentów z atopowym zapaleniem skóry.....	53
Tabela 6. Startery stosowane w reakcji PCR-SSP do oznaczania genów <i>KIR</i> .....	56
Tabela 7. Warunki amplifikacji dla genów <i>KIR</i> metodą PCR-SSP.....	57
Tabela 8. Startery stosowane do oznaczenia genów <i>KIR</i> w reakcji multiplex PCR-SSP.....	58
Tabela 9. Warunki amplifikacji dla reakcji multiplex-PCR-SSP.....	59
Tabela 10. Interpretacja wyniku typowania genów <i>KIR</i> z zastosowaniem techniki multiplex PCR-SSP.....	60
Tabela 11. Specyficzność i długość produktów reakcji PCR stosowanych do oznaczania ligandów HLA receptorów KIR.....	62
Tabela 12. Warunki amplifikacji dla ligandów genów <i>KIR</i> .....	63
Tabela 13. Specyficzność i długość produktów reakcji PCR stosowanych do oznaczania alleli <i>HLA</i> locus C.....	64
Tabela 14. Warunki amplifikacji dla alleli <i>HLA-C</i> metoda PCR-SSP.....	66
Tabela 15. Warunki amplifikacji dla HLA locus C metodą PCR-SSO.....	67
Tabela 16. Badane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) genów <i>APM</i> .....	69
Tabela 17. Warunki temperaturowe reakcji real-time PCR.....	70
Tabela 18. Rozkład częstości genów <i>KIR</i> w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.....	76
Tabela 19. Częstości haplotypów genów <i>KIR</i> w grupie kontrolnej.....	78
Tabela 20. Częstości haplotypów genów <i>KIR</i> w grupie chorych na AZS.....	79

Tabela 21. Obecność genów <i>KIR</i> a współwystępowanie astmy u pacjentów z AZS.....	80
Tabela 22. Porównanie częstości epitopów HLA-C (C1 i C2) u pacjentów z AZS i w kontroli.....	81
Tabela 23. Rozkład częstości epitopu C2 w zależności od obecności genu <i>KIR1DS1</i> .....	81
Tabela 24. Porównanie częstości epitopów HLA-B Bw4 i HLA-A Bw4 u pacjentów z AZS i w kontroli.....	82
Tabela 25. Wiek diagnozy badanych pacjentów z AZS a występowanie ligandów KIR.....	84
Tabela 26. Występowanie określonych ligandów KIR a współwystępowanie astmy u pacjentów z AZS.....	84
Tabela 27. Rozkład częstości alleli <i>HLA-C</i> u chorych na AZS i w kontroli.....	85
Tabela 28. Częstość alleli <i>HLA-C</i> u osób <i>KIR2DS1</i> <sup>+</sup> w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w kontroli.....	86
Tabela 29. Analiza częstość alleli <i>HLA-C</i> u osób <i>KIR2DS1</i> <sup>-</sup> w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej. ....	87
Tabela 30. Występowanie określonych alleli <i>HLA</i> locus C w zależności od wieku badanych pacjentów.....	88
Tabela 31. Analiza zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach <i>LMP2</i> i <i>LMP7</i> z rozkładem Hardy’ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry.....	90
Tabela 32. Częstość badanych genotypów i alleli genów <i>LMP2</i> i <i>LMP7</i> u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.....	91
Tabela 33. Wiek diagnozy w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genie <i>LMP2</i> i <i>LMP7</i> .....	91
Tabela 34. Współczynnik SCORAD a polimorfizmy w genach <i>LMP2</i> i <i>LMP7</i> .....	93
Tabela 35. Analiza zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach <i>TAP1</i> i <i>TAP2</i> z rozkładem Hardy’ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry.....	95
Tabela 36. Częstość badanych genotypów i alleli w genach <i>TAP1</i> i <i>TAP2</i> u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.....	96
Tabela 37. Wiek diagnozy w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genach <i>TAP1</i> i <i>TAP2</i> .....	98

Tabela 38. Współczynnik SCORAD w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genie <i>TAP1</i> i <i>TAP2</i> .....	99
Tabela 39. Analiza zgodności częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> z rozkładem Hardy’ego - Weinberga w grupie kontrolnej oraz w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry.....	101
Tabela 40. Częstość badanych genotypów i alleli genów <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> u chorych na atopowe zapalenie skóry i w grupie kontrolnej.....	102
Tabela 41. Rozkład genotypów w miejscu polimorficznym <i>rs26618</i> wśród pacjentów z AZS i w grupie kontrolnej w zależności od obecności genu <i>KIR2DS1</i> .....	104
Tabela 42. Rozkład genotypów w miejscu polimorficznym <i>rs26618</i> wśród pacjentów i w grupie kontrolnej negatywnych pod względem genu <i>KIR2DS1</i> .....	105
Tabela 43. Rozkład genotypów dla wariantów polimorficznych <i>ERAP2-rs2248374</i> i <i>ERAP1-rs26618</i> w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i grupie kontrolnej.....	107
Tabela 44. Rozkład genotypów <i>ERAP2-ERAP1</i> w grupie chorych na atopowe zapalenie skóry i grupie kontrolnej.....	107
Tabela 45. Wiek badanych a występowanie określonych genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genach <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> .....	108
Tabela 46. Współwystępowanie alergicznego nieżytu nosa w zależności od genotypów w badanych miejscach polimorficznych w genach <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> .....	110

## 9. SPIS RYCIN

Rycina 1. Patogeneza atopowego zapalenia skóry (Biedermann i in., 2015).....	27
Rycina 2. Struktura i organizacja receptorów KIR (Thielens i in., 2012).....	33
Rycina 3. Kompleks receptorów leukocytarnych LRC (Diaz-Pena i in., 2020).....	34
Rycina 4. Częstość haplotypów genów <i>KIR</i> (Jiang i in., 2012).....	36
Rycina 5. Schemat prezentacji antygeny przez cząsteczki MHC klasy I (D'Alicandro i in., 2019).....	41
Rycina 6. Główne cechy peptydomów ( długość i częstość w pozycjach P1, P2 i PC) cząsteczek HLA klasy I związanych z chorobami (Lopez de Castro i in., 2018)...	49
Rycina 7. Wynik typowania genów <i>KIR</i> z zastosowaniem techniki PCR-SSP.....	58
Rycina 8. Wynik typowania genów <i>KIR</i> z zastosowaniem techniki multipleks PCR-SSP.....	59
Rycina 9. Wynik typowania ligandów genów <i>KIR</i> z zastosowaniem techniki PCR-SSP.....	61
Rycina 10. Przykład typowania alleli <i>HLA-C</i> metodą SSO.....	68
Rycina 11. Przykład oznaczenia polimorfizmu SNP <i>rs26618</i> z wykorzystaniem analizy dyskryminacji alleli.....	70
Rycina 12. Niezrównoważenie sprzężeń (LD) między genami <i>KIR</i> .....	75
Rycina 13. Symulacja Monte Carlo wpływu genów <i>KIR2DS1</i> i <i>KIR2DS4</i> na podatność na AZS.....	77
Rycina 14. Występowanie epitopu HLA-C (C1) i HLA-B (Bw4-Thr80) a wiek diagnozy badanych osób.....	83
Rycina 15. Występowanie alleli <i>HLA-C*03</i> i <i>HLA-C*05</i> a wiek diagnozy badanych osób....	87
Rycina 16. Lokalizacja badanych miejsc polimorficznych w genie <i>LMP(2 i 7)</i> .....	89
Rycina 17. Wiek badanych osób a występowanie określonych genotypów w miejscu polimorficznym <i>rs1351383</i> .....	92
Rycina 18. Poziom zaawansowania choroby a występowanie określonych genotypów w miejscu <i>rs1351383</i> .....	92
Rycina 19. Lokalizacja badanych miejsc polimorficznych w genie <i>TAP(1 i 2)</i> .....	94

Rycina 20. Wiek diagnozy badanych osób a występowanie określonych genotypów w miejscu <i>rs1135216</i> .....	97
Rycina 21. Poziom zaawansowania choroby (SCORAD) a występowanie określonych genotypów w miejscu polimorficznym <i>rs1135216</i> .....	98
Rycina 22. Lokalizacja badanych miejsc polimorficznych w genie <i>ERAP1</i> i <i>ERAP2</i> .....	100
Rycina 23. Aktywność wariantu Ile276Met aminopeptydazy ERAP1. Lewy panel: N-końcowe przycinanie prekursora epitopu LIVDRPVTLV HLA-C * 05:01. Prawy panel: Przycinanie epitopu IVDRPV.....	106
Rycina 24. Synergistyczny efekt polimorfizmów <i>rs2248374ERAP2</i> i <i>rs26618ERAP1</i> w atopowym zapaleniu skóry.....	108
Rycina 25. Wiek badanych osób a występowanie określonych genotypów w miejscu <i>rs27044</i> .....	109
Rycina 26. Występowanie alergicznego nieżyty nosa (ANN) a występowanie określonych genotypów w miejscu <i>rs2287987</i> .....	111



## 10. DOROBEK NAUKOWY

**Część wyników przedstawionych w niniejszej pracy została opublikowana w artykułach:**

1. **Niepiekło-Miniewska W**, Mpakali A, Stratikos E, Matusiak Ł, Narbutt J, Lesiak A, Kuna P, Wilczyńska K, Nowak I, Wiśniewski A, Zwolińska K, Ponińska J, Płoski R, Szepietowski JC, Kuśnierczyk P. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism Ile276Met is associated with atopic dermatitis and affects the generation of an HLA-C associated antigenic epitope in vitro. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33(5):906-911. (IF=5.113)
2. **Niepiekło-Miniewska W**, Majorczyk E, Matusiak L, Gendzekhadze K, Nowak I, Narbutt J, Lesiak A, Kuna P, Ponińska J, Pietkiewicz-Sworowska A, Samoliński B, Płoski R, Szepietowski JC, Senitzer D, Kuśnierczyk P. Protective effect of the KIR2DS1 gene in atopic dermatitis. *Gene.* 2013;25:527(2):594-600. (IF=2.351)

**Pozostałe prace oryginalne opublikowane w międzynarodowych i krajowych czasopismach:**

1. Wiśniewski A, Wilczyńska K, Wagner M, Jasek M, **Niepiekło-Miniewska W**, Nowak I, Matusiak Ł, Szczerkowska-Dobosz A, Kuśnierczyk P. Is the TAP2 single nucleotide polymorphism rs241447 truly associated with psoriasis in Poles? *Hum Immunol.* 2020;81(2-3):85-90. (IF 2.412)
2. Bylińska A, Wilczyńska K, Malejczyk J, Milewski Ł, Wagner M, Jasek J, **Niepiekło-Miniewska W**, Wiśniewski A, Płoski R, Barcz E, Roszkowski P, Kamiński P, Malinowski, Wilczyński JR, Radwan P, Radwan M, Kuśnierczyk P, Nowak I. The impact of HLA-G, LILRB1 and LILRB2 gene polymorphisms on susceptibility to and severity of endometriosis. *Mol Genet Genomics.* 2018;293(3):601-613. (IF 2.734)
3. **Niepiekło-Miniewska W**, Baran W, Szepietowski JC, Nowakowska B, Kuśnierczyk P. Lack of detectable fetal microchimerism in psoriasis vulgaris lesions and in non-affected skin in spite of its presence in peripheral blood CD34-positive and CD34-negative cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:114-118. (IF 3.029)
4. **Niepiekło-Miniewska W**, Kuśnierczyk P, Havrylyuk A, Kamieniczna M, Nakonechnyy A, Chopyak V, Kurpysz M. Killer cell immunoglobulin-like receptor gene association with cryptorchidism. *Reprod Biol.* 2015 Dec;15(4):217-22. (IF 1.995)

5. **Niepiekło-Miniewska W**, Żuk N, Dubis J, Kurpisz M, Senitzer D, Havrylyuk A, Grendziak R, Witkiewicz W, Chopyak V, Kuśnierczyk P. Two new cases of KIR3DP1, KIR2DL4-negative genotypes, one of which is also lacking KIR3DL2. *Arch Immunol Ther Exp.* 2014;62(5). (IF 2.145)
6. Nowak I, Magott-Procelewska M, Kowal A, Miazga M, Wagner M, **Niepiekło-Miniewska W**, Kamińska M, Wiśniewski A, Majorczyk E, Klinger M, Łuszczek W, Pawlik A, Płoski R, Barcz E, Senitzer D, Kuśnierczyk P. Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and HLA genotypes affect the outcome of allogeneic kidney transplantation. *PLoS One.* 2012;7(9):44718. (IF 3.75)
7. Kurpisz M, Nakonechnyy A, **Niepiekło-Miniewska W**, Havrylyuk A, Kamieniczna M, Nowakowska B, Chopyak V, Kuśnierczyk P. Weak association of anti-sperm antibodies and strong association of familial cryptorchidism/infertility with HLA-DRB1 polymorphisms in prepubertal Ukrainian boys. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;28;9:129. (IF 2.045)
8. **Niepiekło W**, Baran W, Nowakowska B, Szepietowski JC. Microchimerism in psoriasis vulgaris: A preliminary report. *J Dermatol Sci.* 2010;59(2):149-50. (IF 3.817)
9. I. Kacprzak-Bergman, B. Nowakowska, I. Zalewska, **Niepiekło W**. Wpływ alleli HLA- B i DRB na wyniki leczenia interferonem alfa dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B. *Przegląd Pediatryczny.* 2009;4:75.
10. Kacprzak-Bergman I, Nowakowska B, Zaleska I., **Niepiekło W**, Pietkiewicz- Sworowska A, Wójcik M. Związek alleli HLA DRB z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B u dzieci oraz z odpowiedzią na leczenie interferonem alfa. *Pediatr Pol* 2006;81(9): 624-629.
11. Fiszer-Maliszewska Ł, Kazanowska B, Kuśnierczyk P, Mańczak M, **Niepiekło W**, Pochroń-Zeman B, Nowakowska B. Is p53 intronic variant G13964C associated with predisposition to cancer? *J Appl G.* 2003;44:547-552.

### **Doniesienia zjazdowe:**

1. Wiśniewski A, **Niepiekło-Miniewska W**, Łaczmanski Ł, Passowicz-Muszyńska E, Kowal A, Porębska I, Pawełczyk K, Dubis J, Żuk N, Kuśnierczyk P. Polymorphisms of killer cell immunoglobulin-like receptors, endoplasmic reticulum aminopeptidases and human leukocyte antigen class I genes in non-small cell lung cancer in Poles. Konferencja: Autoimmune, allergic, immunodeficiency and immunological havoc: modern diagnostic and treatment, Lwów, Ukraina, 28.11.-1.12.2018.

2. Wiśniewski A, **Niepiekło-Miniewska W**, Łaczmański Ł, Passowicz-Muszyńska E, Kowal A, Porębska I, Pawełczyk K, Dubis J, Żuk N, Kuśnierczyk P. Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR), endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 and 2 (ERAP1 and ERAP2), and HLA class I (HLA-I) genes with non-small lung cell cancer (NSCLC) and its clinical manifestations. KIR Workshop, 2018, Camogli, Włochy, 25-27.10.2018.
3. Kuśnierczyk P, Wiśniewski A, Matusiak Ł, Szczerkowska-Dobosz A, Nowak I, Łuszczek W, Jasek M, Wagner W, **Niepiekło-Miniewska W**, Wilczyńska K. Associations of elements of antigen-presenting machinery with psoriasis vulgaris in Polish population. Autoimmunity, Lizbona, Portugalia, 16-20.05.2018.
4. Bylińska A, Wilczyńska K, Wiśniewski, Malejczyk AJ, Milewski Ł, Wagner W, Jasek, M **Niepiekło-Miniewska W**, Płoski R, Barcz E, Roszkowski P, Kamiński P, Malinowski A, Wilczyński JR, Radwan P, Radwan M, Kuśnierczyk P, Nowak I. The association of KIR2DL4, LILRB haplotypes and their ligand - HLA-G with endometriosis. 32nd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Venice, Włochy, 9.05-12.05.2018.
5. Kamińska M, **Niepiekło-Miniewska W**, Nieszporek A, Gębura K, Bogunia-Kubik K. Patients awaiting kidney transplantation are more frequently carriers of the rs763780 488G allele that is associated with higher IL-17F serum levels. 32nd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Venice, Włochy, 9.05-12.05.2018.
6. Kamińska, **Niepiekło-Miniewska W**, K. Gębura, K. Bogunia-Kubik. Polimorfizm i ekspresja genów kodujących IL-17A i IL-17F u pacjentów oczekujących na przeszczep nerki. XII Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Gdańsk, 3-5.09.2015.
7. Kupczyk P, Reich A, Wysokińska E, Gajda M, Hołysz M, Hwang T, Kobuszewska A, **Niepiekło-Miniewska W**, Kamińska M, Nowakowska B, Drukała J, Szepietowski JC. Opioid receptors expression and PGP 9.5-positive epidermal nerve fiber density in psoriasis— relationship with itch., 11 Międzynarodowa Konferencja o Molekularnych Podstawach Patologii i Terapii Schorzeń Neurologicznych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, 20-21.11.2014.
8. **Niepiekło-Miniewska W**, Baran W, Nowakowska B, Szepietowski JC, Kuśnierczyk P. Fetal microchimeric cells in blood and skin of women with psoriasis. 9th International Congress on Autoimmunity, Nicea, Francja, 26-30.03.2014.
9. **Niepiekło-Miniewska W**, Majorczyk E, Matusiak Ł, Gendzekhadze K, Nowak I, Narbutt J, Lesiak A, Kuna P, Ponińska J, Pietkiewicz-Sworowska A, Samoliński B, Płoski R,

- Szepietowski JC, Senitzer D, Kuśnierczyk P. Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene association with atopic dermatitis (AD. Novi strategii v diahnostyci ta likuvanni alerhicznych, autoimmunných, imunodeficytných zachvorovań, Truskavets, Ukraina, 21-23.05.2014.
10. **Niepiekło-Miniewska W**, Majorczyk E, Matusiak Ł, Nowak I, Narbutt J, Lesiak A, Kuna P, Ponińska J, Pietkiewicz-Sworowska A, Samoliński B, Płoski R, Szepietowski JC, Senitzer D, Kuśnierczyk P. Atopic dermatitis - one more KIR-associated disease? 2013 KIR Workshop, Nisswa, Gull Lake, Minnesota, U.S.A., 17-19.06.2013.
  11. Dubis J, Żuk N, Kuśnierczyk P, **Niepiekło-Miniewska W**, Szczepańska A, Wolska K, Grendziak R, Zapotoczny N, Witkiewicz W. Związek polimorfizmu genów KIR kodujących receptory aktywujące i hamujące cytotoxycznosc komórek NK z wystapieniem chorób sercowo-naczyniowych. XVII Międzynarodowy Kongres Kardiologiczny, Wrocław, 26-28.08.2013.
  12. Nowak I, Magott-Procelewska M, Kowal A, Miazga M, Wagner M, **Niepiekło-Miniewska W**, Kamińska M, Majorczyk E, Klinger M, Kuśnierczyk P. Association of KIR and HLA genes with kidney graft rejection: a difference between recipients with and without glomerulonephritis. 6th East-West Immunogenetics Conference, Ołomuniec, Czechy, 1-2.03.2012.
  13. Kamińska M, **Niepiekło-Miniewska W**, Chelmoński A, Kamińska D, Nowakowska B. Badanie obecności mikrochimeryzmu poprzyszczepowego i przeciwciał anty-HLA u pacjenta pierwszego polskiego przeszczepu kończyny górnej. Konferencja Badania Immunogenetyczne w Transplantologii i Diagnostyce, Pałacyk Otrębusy/k Warszawy, 23-24.11.2012.
  14. Kurpisz M, Nakonechny A, **Niepiekło-Miniewska W**, Havrylyuk A, Kamieniczna M, Nowakowska B, Chopyak V, Kuśnierczyk P. HLA class II typing of cryptorchidism in prepubertal boys and strong association with DRB1\*11. XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Gdańsk, 16-18.06.2011.
  15. **Niepiekło-Miniewska W**, Baran W, Nowakowska B, Kuśnierczyk P, Szepietowski J. Is a frequency of fetomaternal microchimerism in psoriatic patients different from that in control? XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Gdańsk, 16-18.06.2011.
  16. Kamińska M, Nowak I, Maggot-Parcelewska M, **Niepiekło-Miniewska W**, Wagner M, Wisniewski A, Majorczyk E, Klinger M, Nowakowska B, Kuśnierczyk P. Do killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes, but not HLA matching, affect the acute

- rejection episodes of allogeneic kidney transplantation? XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Gdańsk, 16-18.06.2011.
17. Kurpisz M, Nakonechny, **Niepiekło-Miniewska W**, Havrylyuk A, Kamieniczna M, Nowakowska B, Chopyak V, Kuśnierczyk P. Associations of anti-sperm antibodies and familial cryptorchidism with DRB1 polymorphisms in prepubertal Ukrainians boys. 9th Congress of the European Society for Reproductive Immunology and European Society for Human Reproduction and Embryology, Early Pregnancy, Copenhagen, Denmark, 23-26.08.2011.
18. **Niepiekło-Miniewska W**. The role of fetal-maternal microchimerism in autoimmune disease. Konferencja: Immunoterapia, immunoprofilaktyka: realia i perspektywy, Lwów, Ukraina, 2-3.12.2010.
19. **Niepiekło-Miniewska W**, Kamińska M, Pietkiewicz-Sworowska A, Boratyńska M, Nowakowska B. Does the presence and fluctuation of the peripheral blood microchimerism correlate with kidney function? Donor recipient matching and cellular therapy in transplantation. Technological and clinical aspects, Wrocław, 23- 24.04 2009.
20. Wagner M, Magott-Procelewska M, Fiszer-Maliszewska Ł, Nowak I, **Niepiekło W**, Padzik J, Wiśniewski A, Nowakowska B, Kuśnierczyk P. Polymorphism of MDR1 gene in renal transplant patient and healthy controls. IX Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Kraków, 14-16.05.2009.
21. **Niepiekło W**, Chełmoński A, Kamińska M, Jabłecki J, Patrzalek D. Nowakowska B. Monitoring of microchimerism and anti-HLA antibodies In the first polish recipient of hand transplantation in the early post-transplant period. IX Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Kraków, 14-16.05.2009.
22. Kamińska M, Pietkiewicz-Sworowska A, Boratyńska M, **Niepiekło W**, Nowakowska B. Fluctuation of the peripheral blood microchimerism after kidney transplantation. XII Congress of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Kraków 14-17.05.2008.
23. **Niepiekło W**, Nowakowska B, Baran W, Kupczyk P, Szepietowski J. Detection of cellular microchimerism in psoriatic patients by polymerase chain reaction analysis of HLA-DRB antigens. XII Congress of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Kraków 14-17.05.2008.
24. **Niepiekło W**, Rybacka K, Kamińska M, Boratyńska M, Nowakowska B. Występowanie mikrochimerizmu po przeszczepie nerki. VIII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Warszawa, 11-13. 05.2007.

25. **Niepiekło W**, Pietkiewicz-Sworowska A, Nowakowska B. Long-term fetomaternal microchimerism may be beneficial in stem cell transplantation. Immunogenetics in Hematology and Stem Cell Transplantation, Wrocław, 8-10.02.2006.
26. Kacprzak-Bergman I, Nowakowska B, Zaleska I, **Niepiekło W**, Pietkiewicz-Sworowska A, Wójcik M, Banys D. Influence of HLA DQB1 alleles on Interferon Therapy in Children with Chronic Hepatitis B. 16th Europeans Congress of Immunology, Paryż, Francja, 6-9.09.2006.
27. Kacprzak-Bergman I, Nowakowska B, Zaleska I, Banys D, Wójcik M, Kamińska M, **Niepiekło W**. Association of HLA DQA1 and DQB1 Alleles with response to Interferon Alpha Therapy in Children with Chronic Hepatitis B. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, 27-30.09.2006.
28. Baran W, Nowakowska B, **Niepiekło W**, Szepietowski J. Mikrochimeryzm komórkowy w łuszczycy. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, Bydgoszcz, 1-5. 09.2004
29. **Niepiekło W**, Baran W, Szepietowski J, Nowakowska B. Cellular microchimerism of male and origin in psoriasis patients. 1st International Conference on Basic and Clinical Immunogenomics, Budapeszt, Węgry, 3-7.10.2004.
30. Pietkiewicz-Sworowska A, **Niepiekło W**, Szuszkiewicz M, Nowakowska B. Polimorfizm słabego antygeny zgodności tkankowej HA-1 w populacji polskiej. VI Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Jachranka 15-17.05.2003.
31. Nowakowska B, **Niepiekło W**, Szuszkiewicz M, Pietkiewicz A. Dobór immunologiczny dawcy-biorcy przeszczepów nerek w okresie 1991-2001 roku w doświadczeniu własnym Laboratorium Immunologii Tkankowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Etyczno - Obyczajowe, Prawne i Ekonomiczne aspekty przeszczepiania narządów, Warszawa, 26-28.09.2002.
32. **Niepiekło W**, Nowakowska B, Pietkiewicz A. Częstość występowania mikrochimeryzmu komórkowego, powstałego w okresie ciąży, w populacji zdrowych kobiet i mężczyzn. XI Zjazd PTiDiK, Olsztyn, 17-20.09 2002.
33. Fiszer-Maliszewska Ł, Wojciechowska B, Kuśnierczyk P, Mańczak M, **Niepiekło W**, Nowakowska B. Czy wariant 13964GC w intronie 6 p53 jest związany z podwyższonym ryzykiem choroby nowotworowej? XXXVIII Zjazd PT Biochem, Wrocław, 18-22.09. 2002.

34. Nowakowska B, **Niepiekło W**, Pietkiewicz A, Górski A. Czy matka jest lepszym od ojca alternatywnym dawcą szpiku dla dziecka? V Kongres polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Mikołajki, 19-21.04.2001.
35. Nowakowska B, Szuszkiewicz M, **Niepiekło W**. Identyfikacja przeciwciał w surowicy pacjentów oczekujących na kolejny przeszczep nerki. V Kongres polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Mikołajki, 19-21.04.2001.
36. Nowakowska B, **Niepiekło W**, Szuszkiewicz M, Pietkiewicz A. The frequencies of HLA-2 alleles in South-West Polish population. 14th European Immunology Meeting, Poznań , 23-27.09.2000.
37. Nowakowska B, **Niepiekło W**, Pietkiewicz A, Górski A. Hypereaktywność komórek matczynych w odpowiedzi na stymulacje haploidentycznymi komórkami dziecka w teście MLC. X Zjazd PTDiK, Poznań, 27-28.09.2000.
38. Nowakowska B, Pytel A, Kamińska M, **Niepiekło W**. Rozkład alleli genu DRB1\*04 w populacji polskiej. IV Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Wrocław, 20-22 .05.1999.
39. Nowakowska B, **Niepiekło W**, Maciejewska M. Stopień reaktywności w teście mieszanej hodowli limfocytów (MLC) dla par dawca-biorca przeszczepu szpiku o różnym stopniu zgodności w zakresie antygenów HLA. IV Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Wrocław, 20-22 .05.1999.
40. Nowakowska B, Pytel A, Kamińska M, **Niepiekło W**, Sławińska J, Lange A. Proficiency of HLA Class I antigen serological typing in 13 Polish Laboratory. 3rd European Transplant Conference, Wrocław, 15-17.12.1997.
41. **Niepiekło W**, Baldy-Chudzik K, Olszewska M, Pytel A, Nowakowska B. Związek pomiędzy wynikami badań częstości prekursorów limfocytów cytotoksycznych T (CTLp) a rezultatami innych testów określających zgodność biorcy i dawcy niespokrewnionego. III Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Zakopane, 22-25.03.1997.
42. Kamińska M, Pytel A, Mańczak M, **Niepiekło W**, Nowakowska B. Rozkład genów DRB1 i DRB5 w haplocybie DR2-DR51 w populacji polskiej. III Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Zakopane, 22-25.03.1997.
43. **Niepiekło W**, Baldy-Chudzik K, Olszewska M, Pytel A, Nowakowska B. Mieszana hodowla limfocytów (MLC) i badanie częstości prekursorów cytotoksycznych limfocytów T (CTL-p) jako testy prognostyczne przy przeszczepach narządowych od dawców żywych. Symposium Jubileuszowe z okazji XXX-lecia Pierwszego Przeszczepu Nerki w Ośrodku Wrocławskim, Wrocław, 22-23.11.1996.

44. Szuszkiewicz M, Pytel A, Lachowicz M, **Niepiekło W**, Olszewska M, Nowakowska B. Problemy zgodności tkankowej w doborze dawca-biorca przeszczepu nerki ze zwłok w latach 1985-1995. Symposium Jubileuszowe z okazji XXX-lecia Pierwszego Przeszczepu Nerki w Ośrodku Wrocławskim, Wrocław, 22-23.11.1996.
45. Olszewska M, **Niepiekło W**, Pytel A, Lachowicz M, Mańczak M, Nowakowska B. Czy możliwe jest zastąpienie Testu MLC badaniem zgodności genów klasy II-DR, -DQ, -DP metodą PCR-fingerprinting na poziomie DNA. V Spotkanie Sekcji Immunologów, Sobieszewo, 16-18.05.1996.
46. **Niepiekło W**, Baldy-Chudzik K, Olszewska M, Nowakowska B. Badania prekursorów limfocytów T (CTLp) dla potrzeb transplantacji. V Spotkanie Sekcji Immunologów, Sobieszewo, 16-18.05.1996.
47. **Niepiekło W**, Bady-Chudzik K, Olszewska M, Nowakowska B. Parametry określające odpowiedź dawcy i biorcy przeszczepu szpiku w testach mieszanej hodowli limfocytów. II Zjazd Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, Międzyzdroje, 1-3.06.1995.
48. **Niepiekło W**, Pytel A, Olszewska M, Mańczak M, Lachowicz M, Nowakowska B. Czy wyniki testów MLC oddają zgodność w zakresie genów HLA klasy II locus-DR, -DQ, -DP dla par genotypowo lub fenotypowo zgodnych, dawca-biorca przeszczepów szpiku. VIII Zjazd polskiego Towarzystwa Immunologicznego, Wrocław, 28-30.09.1995.

#### **Udział w projektach badawczych:**

1. Projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka:
  - WROVASC - Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej we Wrocławiu.
  - MultiGenBank - Utworzenie bazy danych immunogenetycznych polskiej populacji.
2. Projekty finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego:
  - NN402 374039 Czy mikrochimeryzm powstały podczas przepływu komórek w okresie ciąży może być zaangażowany w patofizjologię łuszczycy?  
Kierownik: prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk i dr Beata Nowakowska
  - N N407 193439 Projekt polsko-ukraiński: Związek polimorfizmu genów KIR i HLA z patologią gonady męskiej.  
Kierownik: prof. dr hab. Maciej Kurpisz



- N N402 254936 Badanie związku genotypu KIR i HLA z atopowym zapaleniem skóry.  
Kierownik: prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk
  - P05B10120 Badanie występowania mikrochimeryzmu wśród chorych na wybrane choroby autoimmunologiczne.  
Kierownik: dr Beata Nowakowska
  - 3PO5E03425 Związek antygenów zgodności tkankowej HLA z odpowiedzią na leczenie interferonem alfa przewlekłego zapalenia wątroby typu B u dzieci.  
Kierownik: dr Beata Nowakowska
3. Projekt finansowany przez KNOW NR 30/2017/KNOW/IITD: Związek alleli HLA-C z atopowym zapaleniem skóry.  
Kierownik: prof. dr hab. Piotr Kuśnierczyk

**Pobyty zagraniczne:**

- 2017 Protokoły NGS stosowane do typowania HLA, Uniwersytet Medyczny w Wiedniu, Austria
- 2007 Izolacja komórek z krwi obwodowej, Tubingen, Niemcy
- 2002 Szkolenie z zakresu obsługi aparatu LiCOR do sekwencjonowania DNA oraz analizy danych organizowane przez firmę MWG-Biotech AG, Ebersberg, Niemcy
- 2001 Strategie typowania HLA: połączenie metod serologicznych i biologii molekularnej, Poczdam, Niemcy