

GEN-MILJØ-INTERAKSJONER ved astma og allergi

SAMMENDRAG:

Genetisk forskning på komplekse sykdommer har vært meget vanskelig med hensyn til kontinuerlig reproduksjon av resultater i ulike befolkningsgrupper for de fleste av polymorfismene det er forsket på. Dette gjelder selv om kvaliteten på studiedesignen og statistikkene ikke har vært et problem. Den mest sannsynlige årsaken til disse inkonsekvente resultatene er at genetiske polymorfismer i de fleste tilfeller ikke direkte påvirker risikoen for astma, men modulerer effekten miljøeksponeringer har på begynnende astma og det kliniske uttrykket til astma og allergi. Dermed er en bedre forståelse for astma-genetikk avhengig av en bedre forståelse av mekanismene som gjør at miljøfaktorer øker risikoen for astma eller beskytter mot astma.

FERNANDO MARTINEZ, *Department of Pediatrics, University of Arizona*

Utviklingen av nye teknikker for å undersøke tusenvis av genetiske polymorfismer over hele genomet, har fremkalt nytt håp om at en kartlegging av genvarianter knyttet til ulike komplekse sykdommer som allergi og astma, snart vil være tilgjengelig. Forutsetningen bak dette fornyede håpet er at det finnes et utvetydig, i hvert fall delvis lineært forhold mellom alleler i genetiske varianter i genomet og risikoen for å utvikle disse sykdommene. Genetikere mener med andre ord at det finnes genvarianter i det humane genomet som disponerer for astma og allergier, og at spesifikke alleler av disse variantene har en effekt på forekomsten av astma, uavhengig av andre faktorer som miljøpåvirkning eller annen påvirkning.

Denne forutsetningen har ikke fått full støtte fra studier som er utført mange steder ved hjelp av familiebasert tilnærming (koblingsanalyser) og kandidatgentilnærming. I disse to typene studiedesign skildret forskerne innledningsvis et stort antall kromosområder (i koblingsstudiene) og dusinvis andre enkelt nukleotidpolymorfismer som, i spesifikke befolkningsgrupper, enten var knyttet til eller assosiert med astma og allergier (omtalt i (1, 2)). Når forskerne forsøkte å etterprøve disse funnene i andre befolkningsgrupper, ofte med svært store prøvevolumer, var resultatene imidlertid enten blandet eller skuffende: Når det gjelder eksempelvis astma og allergi, ble mindre enn 10% av alle rapporterte «treff» konsekvent reproduisert, og selv i disse tilfellene ble det ikke observert reproduksjon i mange av de tilstrekkelig store og godt utformede prøvevolumene.

Hvorfor er det så vanskelig å reproducere?

Det finnes to ulike typer tolkninger av denne konsekvente inkonsekvensen. De vanligste, spesielt blant kvantitative genetiskere, er tekniske. Kanskje de opprinnelige observasjonene var falske, ganske enkelt fordi forskerne bare offentliggjorde de «positive» resultatene, mens negative resultater ikke ble rapportert. De opprinnelige rapportene led derfor av feil type I, og dette blir avslørt av reproduksjonsstudier, der ingen assosiasjon ble observert.

En annen mulig teknisk forklaring er at reproduksjonsstudiene ikke var omfattende nok, og derfor led de av feil type II. Til slutt er det ofte slik at de ulike studiene ikke er utformet i den hensikt å bekrefte de andre studiene, men til andre formål. Det er derfor mulig (og sannsynlig) at de aktuelle fenotypene ikke ble definert på samme måte i de opprinnelige studiene og i reproduksjonsstudiene.

Et godt eksempel på hvordan dette kan påvirke resultatene i assosiasjonsstudier, blir gitt i den parallelle studien av assosiasjonen mellom astma og polymorfismer i vitamin D-reseptor (VDR) (3, 4). Raby et al (3) og Poon et al (4) rapporterte samtidig at enkelt nukleotidpolymorfismen (SNP), rs 7975232 i VDR kunne assosieres med astma, men det samme allelet som ble assosiert med økt risiko for astma i én av befolkningsgruppene i Raby et al-studien og i den eneste befolkningsgruppen som ble studert i Poon-studien, var beskyttende mot astma i den andre befolkningsgruppen som ble studert i Raby-studien. Forfatterne (3) mente at kanskje astma-fenotypen som ble forsket på hos barna som

KONTAKTADRESSE:

Fernando Martinez, MD
University of Arizona
Department of Pediatrics
PO Box 245073
Tucson
Arizona 85724
fernando@arc.arizona.edu



Et komplekst samspill mellom gener og miljø kan forklare hvordan genvarianter som forårsaker økt risiko for astma i en befolkningsgruppe, kan beskytte mot astma i en annen befolkningsgruppe.

deltok i studien, der C-allelet var beskyttende, var forskjellig fra fenotypen i befolkningsgruppene med flest voksne, som viste at C-allelet for rs7975232 øker risikoen for astma.

Det forblir imidlertid et ubesvart spørsmål hvordan et gen som forårsaker økt risiko for astma i én befolkningsgruppe, kan beskytte mot astma i en annen befolkningsgruppe. I tillegg antyder disse studiene et enda mer komplekst problem: Hvis forfatterne hadde studert alle deltakerne samtidig, uavhengig av alder og bosted, ville effektene i den ene retningen i én befolkningsgruppe ha kamuflert effektene i den andre retningen i den andre befolkningsgruppen, og konklusjonen ville vært at VDR ikke var en risikofaktor for astma.

Trass i betraktningene ovenfor bestriker ikke disse tekniske forklaringene den vesentlige forutsetningen at det faktisk finnes varianter i genomet der ett allel vil vise høyere risiko for komplekse sykdommer enn det andre allelet. Under denne forutsetningen er det endelige formålet med genetiske studier av komplekse sykdommer å finne genetiske varianter som, når de testes på vilkårlige personer, ville vise oss om personen har økt risiko for sykdommen, uavhengig av hvilken sammenheng sykdommen oppstår i. I dag blir dette gjort for enkelt-gensykdommer som cystisk fibrose og Tay-Sachs.

Jeg har lagt frem en alternativ forklaring

på vanskeligheten med å reprodusere resultatene av godt utformede genetiske studier av komplekse sykdommer (5): Effekten de fleste genetiske variantene har på risikoen for å utvikle astma, allergier og andre komplekse sykdommer, er oftest kontekstavhengig og denne «konteksten» kan være genetisk (gen-gen-interaksjoner eller epistase), miljømessig (gen-miljø-interaksjoner), etnisk (som omfatter både de genetiske og miljømessige faktorene som utgjør det vi kaller en etnisk gruppe) eller utviklingsmessig (som angår de kombinerte effektene som utgjør en ny fenotype).

Gen-miljø-interaksjonsparadigme

Jeg har et annet sted utfyllende forklart grunnleggende forutsetninger for gen-miljø-interaksjonsparadigmet (6) og henviser leserne til disse artiklene for mer detaljert forklaring. Kort sagt er min antakelse at astma er en sykdom der miljøfaktorer spiller en sentral rolle. Denne forutsetningen støttes ikke bare av tvillingstudier som viser at minst 50% av risikoen for å utvikle astma kan forklares av miljøeksponering, (7), men også av den enkle kliniske observasjon at sykdommens uttrykk er kraftig påvirket av miljøfaktorer som luftveisinfeksjoner, allergener, sinnsbevegelser, luftforurensning, sigarettøyk osv.

Astma er også arvelig, og det finnes sterke bevis for at sykdommen har en ar-

velig komponent, men jeg mener at majoriteten av de genetiske polymorfismene som assosieres med astma og allergier, hovedsakelig påvirker sykdomsrisikoen ved å modulere den effekten miljøfaktorer har. Med andre ord gjør genetiske polymorfismer slik at mennesker blir mer eller mindre mottakelig for miljøfaktorene som assosieres med begynnelsen på astma eller sykdommens uttrykk.

For å støtte denne påstanden har jeg gått nøye gjennom erfaringen med vår gruppe og andre med hensyn til assosiasjonen mellom en polymorfisme i CD14-genet (CD14/-159) og utviklingen av astma og allergier (8). Denne polymorfismen ble opprinnelig beskrevet av vår gruppe i 1999 (9), og på den tiden observerte vi at homozygoter for T-allelet for CD14/-159 hadde et lavere antall positive hudtester enn bærere av de andre to genotypene i en befolkningsgruppe som ble studert i Tucson i Arizona i USA. Som med mange andre assosiasjonsstudier ble dette funnet reproduisert av flere grupper, men ikke i samme antall studier.

Samtidig som disse genetiske assosiasjonsstudiene ble utført, observerte forskere som forsket på astma på landsbygda i Sentral-Europa, at barn av bønder som ble utsatt for store mengder endotoksin i husstøv, hadde betydelig sjeldnere allergisk sensitivisering og atopisk astma enn barn som bodde på den

samme landsbygda, men med lavere endotoksin-eksponering (10). Disse studiene ga derfor sterk støtte til den såkalte hygienehypotesen, fordi de antydte at eksponering for bakterier gjør at immunresponsen avviker fra dem som avgjør den allergiske fenotypen. Vi trakk den slutning at fordi CD14-genet er en avgjørende komponent i reseptor-systemet for endotoksin, kunne CD14 formidle den beskyttende effekten endotoksin har på allergisk sensitivisering. I samarbeid med gruppene i Sentral-Europa som opprinnelig rapporterte studien av bondene, undersøkte vi genotypene for CD14/-159.

Vi fant slående forskjeller i den beskyttende effekten endotoksin har på allergier hos bærere av ulike genotyper for denne polymorfismen. Homozygotene for C-allelet viste et bratt, negativt forhold mellom endotoksin-eksponering og risiko for allergier, mens det ble observert svært lite beskyttende endotoksin-effekt blant homozygoter for T-allelet. Denne motstridende følsomheten for miljøeksponering hos personer med ulike genotyper for CD14/-159, resulterte i et merkelig mønster for genetisk

assosiasjon. Ved lav endotoksin-eksponering var det CC-homozygotene som hadde høyere risiko for å utvikle allergier enn TT-homozygotene. Og ved høy endotoksin-eksponering var det TT-homozygotene som hadde høyere risiko for allergisk sensitivisering enn CC-homozygotene.

Mønsteret av motstridende effekter av samme allele i ulike miljøer/befolkningsgrupper ligner det som ble rapportert for vitamin D-reseptoren, som forklart tidligere. Det er derfor mulig at de tilsynelatende motstridende resultatene som ble oppnådd i ulike studier for genetisk assosiasjon, kan være forårsaket av ulike mønstre av gen-miljø-interaksjon på disse ulike stedene.

Våre funn av en kompleks gen-miljø-interaksjon mellom CD14 og endotoksin-eksponering som avgjørende faktorer for allergisk sensitivisering, har blitt etterprøvd i minst tre andre studier på Barbados, i Manchester og i Detroit i USA (11-13). Dette fikk oss til å legge frem hypotesen at for de fleste polymorfismer som ble assosiert med astma, vil den virkelige rollen til de ulike genotypene for den polymorfismen, kun bli full-

stendig forstått hvis de tilsvarende miljøfaktorene som påvirker den spesifikke polymorfismen, også blir forstått.

Resultater fra nylige hel-genomassosiasjonsstudier

Den siste tidens studier som har benyttet tilnæringsmåten hel-genomassosiasjon (GWA), som har blitt utgitt i alle store vitenskapelige tidsskrifter og inkluderer en studie vedrørende barneastma som ble utgitt i Nature (14), ser ut til å bestride denne konklusjonen. I alle disse studiene ble tusenvis av SNP-er undersøkt for genotyper i tusenvis av mennesker med og uten den aktuelle fenotypen, og minst en SNP ble funnet å assosiere med slike fenotyper i hver av disse studiene. I tillegg ble polymorfismen reproduisert i mellom to og tolv eller flere befolkningsgrupper. Ved første øyekast vil disse resultatene antyde at det kan være mange SNP-er som avgjør risiko for astma, uavhengig av eventuell miljøeksponering.

ORMDL3 og dets assosiasjon med barneastma er et svært overbevisende eksempel på denne nye bølgen av GWA-studier. Moffatt og hans kolleger (14)

Undersøkelser fra Sentral-Europa viser at barn som vokste opp på bondegård og utsatt for store mengder endotoksin i husstøv, utviklet sjeldnere allergisk sykdom enn barn fra de samme landbruksområdene, men som var mindre utsatt for endotoksin.



kjennetegnet flere enn 317 000 SNP-er i DNA fra 994 pasienter med barneastma og 1243 ikke-astmatikere ved hjelp av familie- og casebaserte referansepaneler. De fant flere markører på kromosom 17Q10D1 som ble kraftig assosiert med barneastma, med en kombinert p-verdi på $p < 10^{-12}$. De etterprøvde dette funnet i en kohort på 2320 tyske barn ($p=0,0003$) og i en analyse av 3301 personer fra en britisk kohort fra 1958 ($p=0,00005$). ORMDL3 er det tredje medlemmet i en ny klasse gener med ukjent funksjon som koder transmitterproteiner som er festet til endoplasmatiske retikulum. Årsaken til at et slikt gen blir assosiert med astma, er ukjent.

Selv om all informasjon som ble presentert av Moffatt og hans kolleger, sterkt antyder at ORMDL3 faktisk kan være et gen som inneholder polymorfismer som påvirker risikoen for astma, er det på dette tidspunktet fornuftig å vente på videre bekreftelse på disse funnene fra studier av andre befolkningsgrupper. Denne forsiktige tilnærmingen støttes av resultatene fra forsøk på å reprodusere resultatene som ble oppnådd med et gen som ikke er relatert til astma og allergier, INSIG2, som opprinnelig ble assosiert med kroppsmasseindeks (BMI) og fedme i en artikkel som ble gitt ut i 2006 i *Journal of Science* (15).

INSIG2 og fedme

Herbert og hans kolleger undersøkte genotyper i over 116 000 SNP-er hos 694 deltakere i studien Framingham Heart Study (15). De lette etter assosiasjoner mellom over 86 000 av disse SNP-ene og BMI. De fant en polymorfisme (rs7566605) i INSIG2-genet som viste et klart bevis på hel-genomassosiasjon med BMI i Framingham-befolkningen. Deretter forsøkte de å etterprøve funnene i forhold til BMI og klarte å reprodusere assosiasjonen i fire separate prøver som besto av personer fra Vest-Europa, afroamerikanere og barn. I én av prøvene, nemlig Nurses Health Study i USA, ble assosiasjonen ikke reprodusert, men forfatterne tilla dette til det faktum at det var færre overvektige personer i den befolkningsgruppen.

Etter denne rapporten rapporterte imidlertid tre grupper forskere fra USA, Frankrike og England, i studier med et stort antall deltakere, at de ikke klarte å reprodusere de opprinnelige resultatene fra Herbert et al (16-18). I tillegg viste

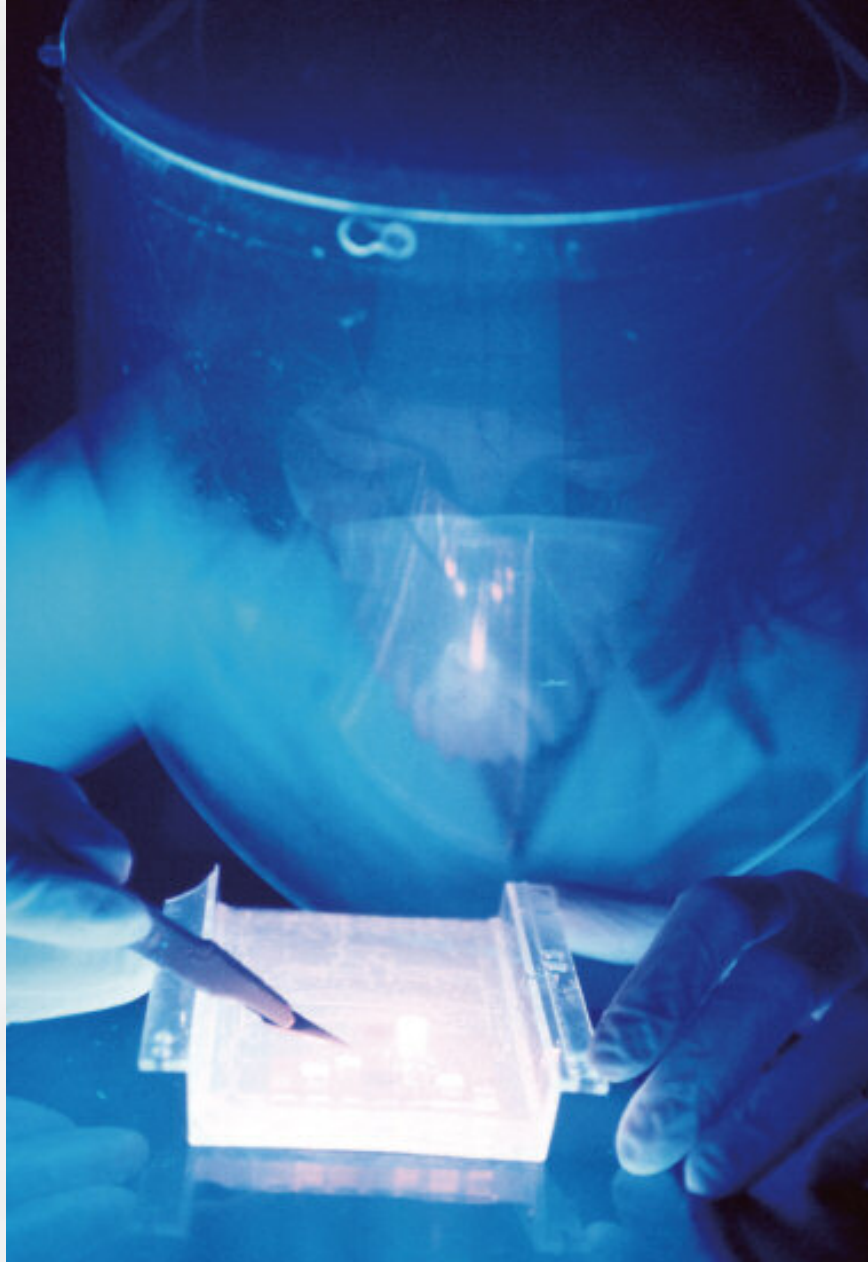


FOTO: MIKE SCHNEIDER/ANCLIS/SAMFOTO

Genetiske polymorfismer som knytter seg til astma og allergi moduleres av miljøfaktorer. Studier av polymorfismer i CD14-genet og endotoksineksponering gir eksempel på en gen-miljø-interaksjon som kan være avgjørende for allergisk sensitivisering.

to separate rapporter fra England (19) og India (20) at det ikke var noen assosiasjon mellom den samme polymorfismen i INSIG2 og fedme i prøvene deres. I et forsøk på å forklare dette avviket utga noen av forfatterne av den opprinnelige rapporten, i samarbeid med andre forskere, en omfattende analyse av assosiasjonen mellom rs 7566605 og enten BMI og en kontinuerlig variabel, eller fedme i 9 store kohorter fra 8 befolkningsgrupper med flere etnisiteter – totalt nesten 17 000 deltakere (21).

Resultatene antydte at i likhet med majoriteten av andre assosiasjonsstudier basert på kandidatgener som ble rapportert før hel-genomstudier ble benyttet, kunne assosiasjonen observeres i noen befolkningsgrupper, men ikke alle. Når forfatterne slo sammen alle resultatene i én enkelt analyse, var assosiasjonen

mellom BMI og rs 7566605 på grensen for signifikant blant deltakere som ikke var i slekt ($p=0,046$) og signifikant i familiebaserte studier ($p=0,0004$), men den kombinerte effekten rs 7566605 hadde på BMI, var svært svak.

Ikke-lineær årsak i komplekse sykdommer

Leseren får tilgi den utfyllende analysen av assosiasjonsstudier med en fenotype som ikke er helt relevant for hovedtemaet, nemlig astma- og allergi-genetikk. Erfaringen med INSIG2 og fedme er imidlertid svært relevant fordi den viser, i alle fall i dette tilfellet, at GWA-studier har samme problemer og tilsynelatende motstridende resultater som tidligere har blitt observert for assosiasjonsstudier av kandidatgener. Det beste eksemplet innen emnet allergi er kanskje Maier et al-

studien med hensyn til sirkulerende total IgE (22). Disse forfatterne forsøkte å reprodusere de samme resultatene i en enkelt stor befolkningsgruppe (4570 personer som deltok i den britiske kohorten fra 1958) som ble rapportert i forhold til allergier for SNP-er i 8 gener som tidligere ble rapportert å assosiere med mottakelighet for høye IgE-nivåer. IL13, IL4, IL4-reseptor-, reseptor med høy affinitet for IgE, IL12b og TBET. I denne meget store studien var det bare polymorfismer som vår gruppe opprinnelig rapporterte i genet for IL13 (23) som ble reprodusert i samme retning som i vår opprinnelige rapport. Ingen assosiasjon ble funnet med noen av de andre polymorfismene i de 7 andre genene, trass i det faktum at for mange av disse polymorfismene ble det opprinnelig rapportert om sterke assosiasjoner i godt utførte studier.

Det som fremkommer av alle disse stu-

diene, er et svært klart mønster. Assosiasjoner mellom allergirelaterte fenotyper og genetiske polymorfismer som ble funnet i en godt utført studie med tilstrekkelige tall, passende korrigeringer for sammenligninger og korrekt definerte fenotyper, reproduseres ofte ikke (med få unntak, og IL 13 kan være ett av unntakene) i andre gode studier. Det er likevel mulig at de nylig rapporterte studiene som bruker et svært stort antall SNP-er i GWA-studier, kan gi «treff» som er enklere å reprodusere, og dermed går det an å identifisere genetiske varianter som er sterkt assosiert med astma, uavhengig av konteksten. Juryen er imidlertid fortsatt i tenkeboksen, og det er fortsatt mulig at det som skjedde med INSIG2 for fedme, også kan oppstå i disse nye GWA-studiene. En endelig vurdering vil ikke være mulig før om noen år, når det rapporteres om forsøk på å reprodusere disse «treffene» i andre befolkningsgrupper.

Avslutning

I mellomtiden antyder den tilgjengelige informasjonen at dagens paradigme for å forstå genetikken i komplekse sykdommer, som – slik det er forklart ovenfor, forutsetter en mer eller mindre lineær assosiasjon mellom genetisk polymorfisme og fenotype – må modifieres hvis genetiske studier skal være nyttige for å forstå både patogenene til allergiske sykdommer og for å utvikle nye tilnærminger for forebygging og behandling av disse sykdommene. Interaktive effekter ser ut til å være avgjørende faktorer for effektene av genetiske polymorfismer på allergirelaterte fenotyper. Dette betyr at polymorfismer ikke står direkte i forhold til fenotypen, men at effektene moduleres av miljøeksponering, av andre polymorfismer og av tidspunktet for når både polymorfismene og miljøeksponeringer påvirker hverandre.

Referanser

1. Los H, Koppelman GH, Postma DS. The importance of genetic influences in asthma. *European Respiratory Journal*. 1999;14(5):1210–27.
2. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006 Mar;7(2):95–100.
3. Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, Lake S, Lange C, Wjst M, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Nov 15;170(10):1057–65.
4. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Nov 1;170(9):967–73.
5. Martinez FD. Gene-environment interactions in asthma: with apologies to William of Ockham. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Jan;4(1):26–31.
6. Martinez FD. Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. *Eur Respir J*. 2007 Jan;29(1):179–84.
7. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *American Review of Respiratory Disease*. 1990;142(6 Pt 1):1351–8.
8. Martinez FD. CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Jul;4(3):221–5.
9. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt P, Martinez FD. A polymorphism in the 5'-flanking region of the CD 14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum IgE. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*. 1999;20(5):976–83.
10. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19;347(12):869–77.
11. Zambelli-Weiner A, Ehrlich E, Stockton ML, Grant AV, Zhang S, Levett PN, et al. Evaluation of the CD14/-260 polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jun;115(6):1203–9.
12. Simpson A, John SL, Jury F, Niven R, Woodcock A, Ollier WE, et al. Endotoxin Exposure, CD14 and Allergic Disease: An Interaction between Genes and the Environment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 13.
13. Williams LK, McPhee RA, Ownby DR, Peterson EL, James M, Zoratti EM, et al. Gene-environment interactions with CD14 C-260T and their relationship to total serum IgE levels in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Oct;118(4):851–7.
14. Moffatt MF, Kabisch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):470–3.
15. Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A, Illig T, et al. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science*. 2006 Apr 14;312(5771):279–83.
16. Loos RJ, Barroso I, O'Rahilly S, Wareham NJ. Comment on «A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity». *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):187; author reply
17. Dina C, Meyre D, Samson C, Tichet J, Marre M, Jouret B, et al. Comment on «A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity». *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):187; author reply
18. Rosskopf D, Bornhorst A, Rimbach C, Schwahn C, Kayser A, Kruger A, et al. Comment on «A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity». *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):187; author reply
19. Smith AJ, Cooper JA, Li LK, Humphries SE. INSIG2 gene polymorphism is not associated with obesity in Caucasian, Afro-Caribbean and Indian subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2007 May 1.
20. Kumar J, Sunkishala RR, Karthikeyan G, Sengupta S. The common genetic variant upstream of INSIG2 gene is not associated with obesity in Indian population. *Clinical genetics*. 2007 May;71(5):415–8.
21. Lyon HN, Emilsson V, Hinney A, Heid IM, Lasky-Su J, Zhu X, et al. The association of a SNP upstream of INSIG2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoS genetics*. 2007 Apr 27;3(4):e61.
22. Maier LM, Howson JM, Walker N, Spickett GP, Jones RW, Ring SM, et al. Association of IL13 with total IgE: evidence against an inverse association of atopy and diabetes. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;117(6):1306–13.
23. Graves PE, Kabisch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritzsche C, et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 2000;105:506–13.