

## ANALIZA POLIMORFIZMA -590 C/T IL-4 GENA U BOSANSKOHERCEGOVAČKOJ POPULACIJI

*Amela Hercegovac<sup>1</sup>, Rifet Terzić<sup>1</sup>, Snježana Hodžić<sup>1</sup>, Aldijana Tursunović<sup>1</sup>, Danijel Petrović<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Odsjek za biologiju, prirodno – matematički fakultet, Univerzitet u Tuzli

<sup>2</sup>Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani

### Sažetak

Jedan od niza problema koji se javljaju prilikom pokušaja da se utvrdi moguća veza između određene bolesti i genskog polimorfizma je svakako i nedostatak podataka o učestalosti tih polimorfizama u opštim populacijama. Bilo koje varijacije frekvencije alela između različitih populacija mogu imati klinički značaj. Faktore koji mogu uticati na povezanost alela sa bolešću, kao što su etnički ili uticaj spola, nije moguće utvrditi bez frekvencija alela u opštim populacijama. Cilj istraživanja bio je analizirati polimorfizam -590 C/T IL-4 gena u opštoj bosansko-hercegovačkoj populaciji. Od ukupno 528 ispitanika analiziranih za polimorfizam IL-4 -590 C/T, 22 osobe su imale genotip TT, 150 TC i 356 osobe genotip CC. Genotipizacija je izvršena metodom PCR – RFLP. Komparacijom frekvencije genotipova po spolu nije utvrđena statistički značajna razlika. Distribucija genotipova u ukupnom ispitivanom uzorku bila je u skladu sa Hardy–Wainberg–ovim ekvilibrijem ( $p = 0,2251$ ). Analizom -590 C/T polimorfizma utvrđene su frekvencije alela T 0,18 i alela C 0,82 u ukupnom ispitivanom uzorku. Komparacijom alelogenskih frekvencija sa frekvencijama utvrđenim u drugim opštim evropskim populacijama nije utvrđena statistički značajna razlika. Dalja istraživanja koja bi se odnosila na povezanost pojedinih genotipova i određenog imunološkog fenomena bila bi značajna za objašnjenje osnovnih bioloških procesa i za ukazivanje načina predviđanja, preveniranja ili popravljanja štetnih situacija kod imunoloških bolesti.

**Cljučne riječi:** polimorfizam, genotip, alel, frekvencije

### UVOD

Interleukini spadaju u grupu citokina, medijatora inflamacije, koji aktiviraju leukocite i indukuju njihovu proliferaciju i diferencijaciju (Carpenter et al., 1998). Najnoviji rezultati pokazuju da polimorfizmi u regulatornim slijedovima gena za citokine utiču na razinu ekspresije gena i razinu citokina u tjelesnim tekućinama i tkivima, kao i njihovu povezanost s različitim bolestima (Mantovani et al., 1997; Bidwell et al., 1999). Gen za interleukin 4, IL-4 gen, lociran je na hromosomu 5 (5q31.1). Nalazi se u neposrednoj blizini gena za IL-3, IL-5 i IL-13 (Sutherland et al., 1988; Smirnov et al., 1995) Sadrži 4 egzona i tri introna (Arai et al., 1989). Opisano je nekoliko polimorfnih mjesta IL-4 gena od kojih najčešće istraživani je SNP promotorski polimorfizam na poziciji 590 gdje dolazi do supstitucije C/T (Walley, Cookson, 1996). Hunt et al., 2000, istražio je navedeni polimorfizam kod autoimunog hipotiroidizma. Analize su pokazale nižu frekvenciju alela T kod pacijenata u odnosu na kontrolnu skupinu. Opisani su takođe VNTR polimorfizam u intronu 2 (70 bp) i polimorfizam GT tandemskog ponavljanja u intronu 2 (Mout et al., 1991). Genski produkt je interleukin 4, citokin kojeg primarno stvaraju aktivirani limfociti T, limfociti T4 (Th2), monociti i makrofazi, neutrofili, limfociti B i stromalne stanice koštane srži (Chomarat,

Banchereau, 1997). IL-4 podržava humoralni imuni odgovor regulirajući diferencijaciju prekursora subpopulacije limfocita T4 u tip 2 (Th2), koji određuje humoralnu imunost i modulira stvaranje antitijela. Sudjeluje u diferencijaciji i rastu B limfocita. Inhibira stvaranje IL-6 i IL-8 (Suzuki et al., 1993). Može potaknuti nastanak autoimunih bolesti kao što je sistemski lupus eritematosus (SLE). Poznato je da IL-4 potiče stvaranje IgE, a genetske studije povezuju patogenezu astme s genom za IL-4. Dosadašnja istraživanja ukazuju da polimorfizam u IL-4 C590T utiče na pojavu astme (Noguchi et al., 1998), sudjeluje u diferencijaciji i rastu B limfocita. Genski polimorfizmi citokina istraživani su u mnogim svjetskim populacijama. U dostupnoj literaturi međutim, nismo našli podatke o učestalosti bilo kojeg primjera polimorfizma inflamatornih gena u bosanskohercegovačkoj populaciji. Cilj istraživanja bio je analizirati polimorfizam -590 C/T IL-4 gena u opštoj bosanskohercegovačkoj populaciji.

## MATERIJAL I METODE

Istraživanje je obuhvatilo ispitanike iz Bosne i Hercegovine, dobrovoljce, čiji su uzorci krvi prikupljeni u periodu 2000. – 2010. godine. Krv je sa antikoagulansom (5% EDTA) bila zamrznuta i pohranjena na  $-20^{\circ}\text{C}$  do daljeg istraživanja. Identiteti ispitanika, starost i njihovo moguće ispoljavanje kliničkih znakova bolesti nisu bili poznati, poznat je bio samo njihov spol. Izolacija DNK rađena je standardnom metodom. Za svaki ispitivani uzorak izvršili smo polimeraznu lančanu reakciju (engl. polimerase chain reaction - PCR). Nakon uspješne PCR reakcije slijedila je restrikcija odgovarajućim enzimom i analiza polimorfizma dužine fragmenata restrikcije (restriction fragment length polymorphism - RFLP). PCR reakcijska smjesa svakog uzorka u svom konačnom volumenu od 15 ml sadržavala je: 0,5 ml uzorka DNK, 3 ml 5 x PCR pufera, 0,6 ml 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,15 ml 10 mM dNTP, 0,45 ml 10mM začetnog oligonukleotida (prajmer), 0,45 ml 10 mM začetnog oligonukleotida (prajmer), 0,1 ml (5E/ml) enzima Taq polimeraze i 9,75 ml bidestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ .

Slijed baza začetnog oligonukleotida: 5'-3': TAAACTTGGGAGAACATGGT, 3'5':TGGGGAAAGATAGAGTAATA proizvođača Promega. Program PCR reakcije bio je slijedeći: početna denaturacija  $95^{\circ}\text{C}$  5 min 1x; denaturacija  $94^{\circ}\text{C}$  55 sek, vezivanje začetnih oligonukleotida  $51^{\circ}\text{C}$  60 sek, elongacija  $72^{\circ}\text{C}$  50 sek 30x; završna sinteza  $72^{\circ}\text{C}$  5 min 1x. Produkte PCR reakcije provjerili smo gel elektroforezom. Elektroforeza je vršena u kadici na 1% agaroznom gelu koji je sadržao 0,4  $\mu\text{l}$  Syber green boje, u 1x TBE puferu 30 minuta pri 80 V. U džepove gela smo nanosili po 0,35 ml PCR produkta prethodno obojenih sa 0,4 ml boje BPB (blue phenol blue) na parafilmu. Produkte smo posmatrali i analizirali na gelu pod UV svjetlosti. Veličinu produkta smo odredili primjenom standardnog DNA markera V ona je iznosila 195 bp. Preostalih 10 ml PCR produkta, nakon uspjele PCR reakcije, podvrgli smo reakciji restrikcije. Restrikcijska smjesa sadržavala je: 8,5 ml PCR produkta, 1 ml pufera C, 0,5 ml enzima restrikcijske endonukleaze Eco 471 (Fermentas). Restrikcijsku smještu smo inkubirali 2 sata na vodenoj kupelji pri temperaturi  $37^{\circ}\text{C}$ . Elektroforeza produkata restrikcije je vršena u kadici na 3% agaroznom gelu koji je sadržao 0,4 ml Syber green, u 1x TBE puferu 1 – 2 sata pri 80 V. U džepove gela smo nanosili po 10 ml produkta restrikcije prethodno obojenih sa 5 ml boje BPB na parafilmu. Produkte smo posmatrali i analizirali na gelu pod UV svjetlosti. Veličinu produkta smo odredili primjenom standardnog DNA - marker V. Očekivanu veličinu produkata restrikcije prikazuje Tabela 1.

**Tabela 1.** Veličina produkta PCR reakcije i veličina produkata restrikcije (bp) pri analizi polimorfizma IL-4 -C590T

**Table 1.** Size of PCR product and product restrictions (bp) in the analysis of polymorphism of IL-4 -C590T

Genotip	Produkt PCR (bp)	Produkti restrikcije (bp)		
CC	195		177	18
CT		195	177	18
TT		195		

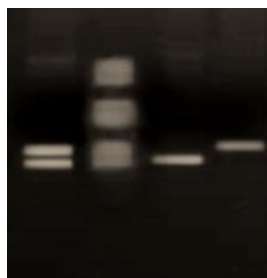
## REZULTATI

Od ukupno 528 ispitanika 22 osobe su imale genotip TT, 150 TC i 356 osobe genotip CC. Komparacijom frekvencije genotipova muškaraca i žena nije utvrđena statistički značajna razlika. Distribucija genotipova u ukupnom ispitivanom uzorku bila je u skladu sa Hardy – Wainberg – ovim ekvilibrijem ( $p = 0,2251$ ).

**Tabela 2.** Frekvencije alelogena i genotipova istraživanog polimorfizma u ukupnom ispitivanom uzorku.

**Table 2.** Allelogenes and genotype frequencies of the investigated polymorphism in the total sample tested.

Polimorfizam	Alel	N	%	Genotip	N	%	HWE – p
IL-4 -590 C→T	T	194	18,0	TT	22	4,17	0,2251
	C	862	82,0	TC	150	28,41	
				CC	356	67,42	



**Slika 1.** Produkti restrikcije pri analizi IL-4 –C590T polimorfizma gel elektroforezom  
**Picture 1.** Products restrictions in analyzing IL-4 -C590T polymorphism gel electrophoresis

Za analizu distribucije apsolutnih genotipskih frekvencija pojedinih polimorfizama, i odstupanje od Hardy – Wainberg – ovog ekvilibrija (HWE), upotrijebljen je  $\chi^2$  – test jednog stupnja slobode, pri čemu se vrijednost  $p < 0,05$  smatrala statistički značajnom.  $\chi^2$  – test uz Yates' korekciju upotrijebljen je i za komparaciju rezultata dobivenih u skupini muškaraca i u skupini žena za pojedine polimorfizme, kao i za komparaciju rezultata u ukupnom uzorku sa drugim evropskim populacijama.

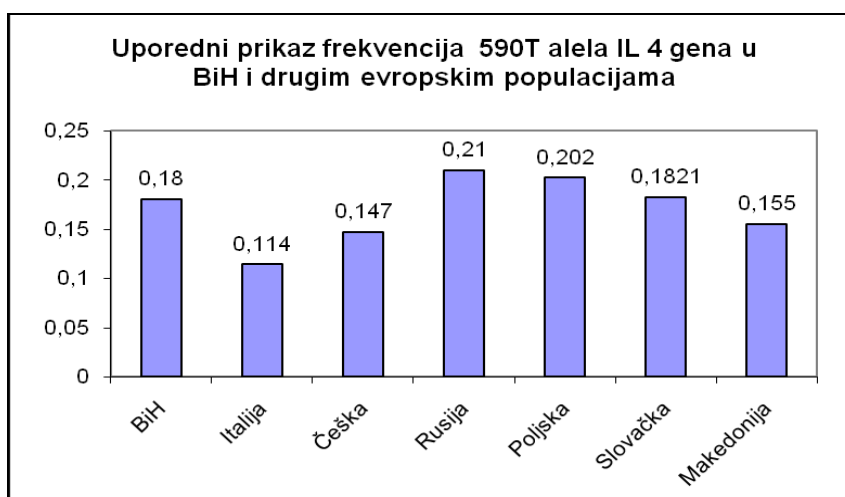
**Tabela 3.** Apsolutne i relativne frekvencije alela T i C muškaraca i žena u bosanskohercegovačkoj populaciji

**Table 3.** Absolute and relative frequencies of alleles T and C men and women in the Bosnian and Herzegovinian population

Alel	Apsolutne (relativne)	
	Muškarci	Žene
T	92 (0,17)	92 (0,2)
C	444 (0,83)	418 (0,8)

## DISKUSIJA

Jedan od niza problema koji se javljaju prilikom pokušaja da se utvrdi moguća veza između određene bolesti i genskog polimorfizma je svakako i nedostatak podataka o učestalosti tih polimorfizama u opštim, ciljanim populacijama. Bilo koje varijacije alelogenskih frekvencija između različitih populacija mogu imati klinički značaj. Istraživanja kojima se žele ustanoviti mogući geni kandidati za određenu bolest, obavezno uz genotipizaciju bolesnika podrazumijevaju i genotipizaciju kontrolnih ispitanika, ali su to uglavnom mali uzorci. Istraživanja polimorfizma C590T IL 4 gena u različitim evropskim populacijama pokazala su da je glavni alel tog polimorfizma alel C čije frekvencije variraju od 70 – 90 %. U našem ispitivanom uzorku utvrđena frekvencija tog alela iznosi 82 % što pokazuje da se BiH uklapa u evropski populacijski gradijent. Rezultate utvrđene u bosanskohercegovačkoj populaciji komparirali smo sa rezultatima utvrđenim u populacijama Italije (Uboldi et al., 2003), Češke (Kubistova et al., 2006), Rusije (Konenkov, Smolnikova 2002), Poljske (Kurzawski et al., 2005), i Slovačke (Javor et al., 2007), što je prikazano na grafikonu 1. Komparacijom frekvencije genotipova muškaraca i žena nije utvrđena statistički značajna razlika. Distribucija genotipova u ukupnom ispitivanom uzorku bila je u skladu sa Hardy – Wainberg – ovim ekvilibrijem ( $p = 0,2251$ ).



**Grafikon 1.** Relativne frekvencija alela 590T IL-4 gena utvrđene u pojedinim evropskim populacijama zdravih ispitanika

**Graph 1.** The relative frequency of alleles 590T IL-4 gene identified in several European populations of healthy subjects

Utvrđene relativne frekvencije alela T i C polimorfizma na 590 poziciji gena IL-4 u bosanskohercegovačkoj populaciji statistički se značajno ne razlikuju od vrijednosti utvrđenih u drugim evropskim populacijama.

## LITERATURA

- Arai N, Nomura D, Villaret D, DeWaal Malefijt R, Seiki M, Yoshida M, Minoshima S, Fukuyama R, Maekawa M, Kudoh J, Shimizu N, Yokota K, Abe E, Yokota T, Takebe Y, Arai K. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression. *J Immunol.* 1989; 142:274-282.
- Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* 1999; 1:3-19.
- Carpenter LR, Yancopoulos GD, Stahl N. General mechanisms of cytokine receptor signaling. *Adv Protein Chem.* 1998; 52: 109-140.
- Chomarat P, Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw.* 1997; 8:333-44.
- Javor J, Bucova M, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Buc M. Single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in the healthy Slovak population Blackwell Publishing Ltd. *International Journal of Immunogenetics.* 2007; 34:273-280.
- Konenkov VI, Smolnikova MV. Polymorphism of promotor sites of interleukins-4 and -10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  genes in HIV-infected patients. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2002; 133:389.
- Kubistova Z, Mrazek F, Tudos Z, Kriegova E, Ambruzova Z, Mytilineos J, Petrek M. Distribution of 22 cytokine gene polymorphisms in the healthy Czech population Blackwell Publishing Ltd. *International Journal of Immunogenetics.* 2006; 33:261-267.
- Kurzawski M, Pawlik A, Czerny B, Domanski L, Rozanski J, Drozdziak M. Frequencies of the common promoter polymorphisms in cytokine genes in a Polish population. *International Journal of Immunogenetics.* 2005; 32:285-291.
- Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today.* 1997; 18:231-40.
- Mout R, Willemze R, Landegent JE. Repeat polymorphisms in the interleukin-4 gene (IL4). *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:3763.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28:449-453.
- Smirnov DV, Smirnova MG, Korobko VG, Frolova EI. Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization. *Gene.* 1995; 155:277-281.
- Sutherland GR, Baker E, Callen DF, Hyland VJ, Wong G, Clark S, Jones SS, Eglinton LK, Shannon MF, Lopez AF, Vadas MA. Interleukin 4 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15. *HumGenet.* 1988; 79:335-337.
- Suzuki H, Sugiyama E, Tunru IS, Yamashita N, Matsuno H, Hamazaki T et al. Suppressive effect of interleukin-4 (IL-4) on IL-6 production adherent rheumatoid synovial cells. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993; 66:67-72.
- Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtoni ES. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *European Journal of Immunogenetics.* 2003; 30:5.
- Walley AJ, Cookson WO. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet.* 1996; 33:689-692.

## **ANALYSIS OF THE POLYMORPHISM -590 C/T OF IL-4 GENE IN BOSNIAN-HERZEGOVINIAN POPULATION**

*Amela Hercegovac, Rifet Terzić, Snježana Hodžić, Aldijana Tursunović, Danijel Petrovič*

### **Abstract**

One from a number of problems that occur when attempting to establish a possible link between certain diseases and genetic polymorphisms is certainly the absence of data on the frequency of these polymorphisms in general populations. Any variation in allele frequencies between different populations may have clinical significance. Factors that may influence the association of alleles with disease, such as ethnic or gender effect, is not possible to determine without allele frequencies in the general population. Aim of the research was to analyze the polymorphism -590 C/T of IL-4 gene in general bosnian-herzegovinian population. From a total of 528 patients analyzed for the polymorphism of IL-4 -590 C/T, 22 had the TT genotype, 150 TC and 356 CC genotype. Genotyping was performed by PCR – RFLP method. Comparing the frequencies of genotypes by gender did not determine statistically significant difference. The distribution of genotypes in the total sample was consistent with Hardy-Wainberg's equilibrium ( $p = 0.2251$ ). Analysis of the -590 C/T polymorphism determined the allele frequencies T 0.18 and C 0.82 in the total sample. Comparing the allele frequency with the frequencies determined in other European general populations found no statistically significant difference. Further investigations that would be in relation to the association of certain genotypes and specific immune phenomena would be important for explaining the basic biological processes and indicating ways of prediction, prevention or repair of adverse situations in immunological diseases.

**Keywords:** polymorphism, genotype, allele frequencies