
PREZENȚA POLIMORFISMULUI IL4 C-590T ÎNTR-O POPULAȚIE DIN ROMÂNIA

IOANA ROTAR¹, DANIEL MUREȘAN¹, SORANA D. BOLBOACĂ²,
RADU POPP³, FELICIA PETRIȘOR³, MARIUS FĂRCAȘ³, TANIA CRIȘAN³,
ADRIAN TRIFA³, CRISTINA BUTUZA⁴, IOAN VICTOR POP³,
FLORIN STAMATIAN¹

¹Catedra Obstetrică Ginecologie I, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

²Catedra de Informatică Medicală și Biostatistică, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

³Catedra de Genetică Medicală, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

⁴Clinica Obstetrică Ginecologie I, Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj-Napoca

Rezumat

Obiectiv. Studiul de față își propune să studieze existența polimorfismului IL-4 C-590T pe o populație din România.

Material și metodă. Au fost incluse 241 de paciente de sex feminin, rasă caucaziană, provenind majoritar din Transilvania. Pentru fiecare pacientă s-a prelevat o probă de sânge, din care s-a extras ADN din leucocitele periferice și ulterior s-a aplicat un protocol de tip PCR-RFLP pentru evidențierea polimorfismului IL-4 C-590T.

Rezultate. Alela comună a fost mai frecvent întâlnită decât alela variantă (C- 81.74% - T 18.26%). Aplicând testul Z pentru alela T nu au fost constatate diferențe semnificative din punct de vedere statistic între clasele de vârstă ($Z = 0.489$, $p > 0.05$). Genotipul C/C a fost cel mai frecvent întâlnit, urmat de cel heterozigot C/T și respectiv T/T (66.39 %, 30.71% și respectiv 2.9%)

Concluzii. Polimorfismul -590 C>T este prezent în populația luată în studiu. Repartiția genotipurilor și alelelor este asemănătoare altor populații caucaziene.

Cuvinte cheie: interleukina 4, polimorfism genetic, PCR-RFLP.

THE PRESENCE OF IL4 C-590T POLYMORPHISM IN A ROMANIAN POPULATION

Abstract

Objective. The present study aim to determine the existence of IL-4 C-590T polymorphism on a Romanian population.

Material and method. Two hundred and forty one patients have been enrolled in the study. All were native Romanian, especially from Transylvania, Caucasian race. For each patient a blood sample has been obtained. The DNA extracted using a specific extraction kit from peripheral leukocytes was used in order to determine IL-4-590 C>T polymorphism using a PCR-RFLP based protocol.

Results. The common allele was encountered more frequent than the variant allele (C- 81.74% - T 18.26%). Z test calculated for T allele failed to demonstrate statistical significant differences between different age classes ($Z = 0.489$, $p > 0.05$). C/C genotype was more frequently seen, followed by the heterozygous C/T genotype and respectively T/T genotype (66.39 %, 30.71% and respectively 2.9%)

Conclusions. IL 4 -590 C>T polymorphism is present in the study population. Genotypes and alleles repartition has a similar pattern with other studies performed on Caucasian population.

Keywords: interleukin 4, genetic polymorphism, PCR-RFLP.

Introducere

Interleukinele reprezintă molecule de semnal ce permit comunicarea între diversele componente ale sistemului imun [1].

Gena interleukinei 4 (IL 4) este localizată la nivelul cromozomului 5, 5q31.1 [2]. Produsul rezultat în urma transcripției și respectiv translației, IL-4 este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 15-19 KD [3]. Gena conține patru exoni și are o lungime de 10kb. IL4 este caracteristică răspunsului T helper 2, fiind secretată predominant de acest tip de limfocite, dar poate fi secretată și de către mastocite, bazofile, eozinofile și celulele Natural Killers [4]. IL-4 are un rol major asupra limfocitelor B, determinând shift-ul de la Ig M spre Ig E [5], ceea ce explică implicarea acesteia în afecțiunile autoimune, mecanism imunomodulator în patologia tractului digestiv [6], respectiv un anumit tip de răspuns inflamator poate avea un rol predictiv prognostic în unele neoplazii [7].

Polimorfismele genetice reprezintă variații în structura ADN-ului, fiind întâlnite cu o frecvență ce depășește 1% din populație [8]. Prezența acestora conferă diversitate și individualitate fenotipică. Odată cu progresele tehnicilor de biologie moleculară a fost posibilă detectarea acestor polimorfisme, descrise atât la nivelul ADN-ului, cât și la nivelul proteinelor [8]. În literatura de specialitate sunt prezente numeroase asocieri între diverse patologii, inclusiv neoplazii și prezența unor polimorfisme genetice.

Polimorfismul genetic în funcție de tipul acestuia sau de localizarea la nivelul regiunilor codante sau noncodante poate influența structura proteinei rezultate și, prin aceasta, fie doar activitatea sau chiar nivelul seric sau local al acesteia.

La nivelul IL-4 au fost descrise mai multe polimorfisme. Pentru acest studiu am ales polimorfismul C-590T localizat la nivelul promoterului, regiune cheie în transcripție. Am căutat frecvența acestui polimorfism pe un lot de pacienți exclusiv de sex feminin, majoritatea din Transilvania.

Material și metodă

În prezentul studiu au fost incluse 241 de persoane de sex feminin care s-au prezentat în perioada 1 februarie 2008 - 30 iunie 2009 în Clinica Obstetrică Ginecologie I, Cluj-Napoca. S-a obținut consimțământul informat privind participarea la studiu. În fiecare caz au fost recoltați 2 ml sânge periferic pe anticoagulant [EDTA].

Probele de sânge au fost stocate imediat la frigider și păstrate pentru câteva zile la temperaturi cuprinse între 4-8°C. ADN-ul genomic a fost extras din leucocitele periferice conținute în 300 µl de sânge utilizând un kit comercial (Wizzard Genomic DNA Purification Kit, Promega®) conform instrucțiunilor producătorului. ADN-ul astfel extras a fost stocat în congelator la -20°C.

Adresa pentru corespondență: ioanab@yahoo.com

Pentru analiza polimorfismului promoterului IL4 C-590T s-a utilizat tehnica PCR - RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) după un protocol descris de Wallney și Cookson și ulterior Pontes [9,10]. Pentru reacția PCR s-a utilizat același mix de PCR, adăugând însă primerii descriși în Tabelul 1 (după Pontes CC [9,10]). Condițiile de amplificare sunt prezentate în Tabelul 2 (după Pontes CC [9,10]).

Tabelul 1. Structura primerilor utilizați în reacția de PCR IL4 C-590T.

IL-4 590 Fwd	5'-ACT AGG CCT CAC CTG ATA CG- 3'
IL-4 590 Rev	5'-GTT GTA ATG CAG TCC TCC TG- 3'

după Pontes CC [9,10]

Tabelul 2. Condiții de amplificare IL4 C-590T (după Pontes CC [9,10]).

Nr	Descriere	Temperatura	Durata
1.	Denaturare inițială	95°C	15 min
2.	Denaturare	94°C	60 sec
3.	Annealing (fixarea primerilor)	57°C	60 sec
4.	Elongare	72°C	60 sec
Se repetă pașii de la 2 la 4 de 40 ori			
5.	Elongare finală	72°C	10 min

Prođușii de amplificare rezultați au fost supuși digestiei enzimatice utilizând 3 U enzima Fag I® (Fermentas) 12 ore la 37°C. Prezența alelei T abolește situsul de restricție al enzimei Fag I, lăsând nedigerat ampliconul de 252 bp obținut în urma reacției PCR. Spre exemplificare, în figura 1 prezentăm un fragment de gel de agaroză după digestia enzimatică.

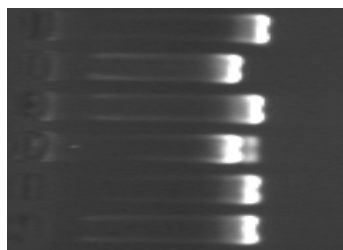


Fig. 1. Fragment de gel examinat în lumină ultravioletă polimorfismul -590 C>T al IL4: CC - 1,2,4,6, CT 3; TT - 5.

Datele obținute au fost introduse într-un fișier de tip Excel® în vederea prelucrării acestora. Reprezentarea grafică a rezultatelor s-a realizat prin utilizarea programului Microsoft Excel. Frecvența alelelor și a genotipurilor au fost exprimate prin numărul de cazuri și intervalul de încredere de 95% asociat (intervalul de încredere s-a calculat pe baza unei metode binomiale). Intervalele de confidență 95% au fost calculate utilizând un calculator online [11]. Sumarizarea variabilei vârstă s-a realizat prin calcularea parametrilor statistici descriptivi. Coeficientul de corelație al rangurilor Spearman s-a utilizat pentru a identifica relația dintre cele două alele (s-a utilizat un prag de semnificație de 5%). Compararea a două proporții s-a realizat prin

aplicarea testului Z la un prag de semnificație de 5%.

Rezultate

Vârsta medie a pacienților incluse în studiu a fost de 36.87 ± 9.96 ani, cu un interval de încredere de 95% [35,60 – 38,13]. Reprezentarea grafică a lotului în funcție de clasele de vârstă este redată în Figura 2. Vârsta minimă a fost de 18 ani, în timp ce cea maximă 69 ani, mediana fiind de 34 ani, modulul având valoarea de 28 ani.

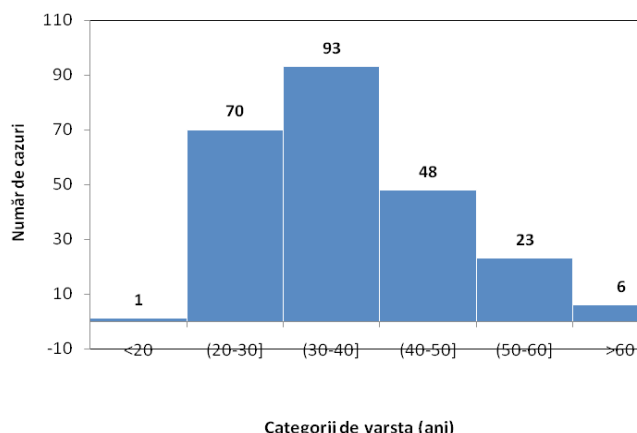


Fig. 2. Repartiția pe clase de vârstă.

Repartiția pacienților în funcție de prezența alelei comune sau variante este reprezentată în tabelul 3. Datele sunt exprimate în valori absolute și relative, precum și prin intervalele de încredere 95% asociate.

Tabelul 3. Frecvența alelică polimorfismul -590 C>T al IL4.

Alela	Frecvență absolută (%)	Interval de confidență 95%	
		Limita inferioară (%)	Limita superioară (%)
C	394 (81.74)	376 (78.00)	410 (85.06)
T	88 (18.26)	72 (14.93)	106 (21.99)
TOTAL	482		

Coeficientul de corelație Spearman calculat între cele două alele identifică o relație slabă ($p = 0.243$), dar semnificativă statistic ($p = 0.000014$) la un prag de semnificație de 5%.

Distribuția genotipului IL4 -590 în eșantionul studiat este prezentată în tabelul 4.

Tabelul 4. Frecvența genotipurilor IL4 în populația studiată.

Genotip	Frecvență absolută (%)	Interval de confidență 95%	
		Limita inferioară (%)	Limita superioară (%)
C/C	160 (66.39)	145 (60.16)	174 (72.19)
C/T	74 (30.71)	60 (24.89)	89 (36.92)
T/T	7 (2.90)	3 (1.24)	14 (5.80)

Discuții

După cum era de așteptat, alela comună a fost întâlnită mai frecvent în populația luată în studiu, compa-

rativ cu alela variantă (394 cazuri versus 88). Au fost descrise populații în care IL-4 -590 nu a avut un aspect polimorfic, cum ar fi lotul studiat prin secvențare de către Nagarkatti și colaboratorii din India de Nord [12]. Cel mai frecvent întâlnit genotip este genotipul homozigot comun, urmat de cel heterozigot, respectiv homozigot variant (160, 74, respectiv 7 cazuri).

În literatura de specialitate nu am găsit studii care să analizeze la nivel populațional frecvența genotipurilor IL-4, majoritatea datelor privind acest polimorfism fiind obținute pe studii de tip caz martor, care analizau comparativ frecvențele alelice, respectiv frecvențele de apariție ale genotipurilor în raport cu o anumită patologie [13]. Studiul realizat de Trajkov și colab., pe un eșantion de 301 indivizi macedonieni sănătoși, a arătat o frecvență alelică de 65.9% pentru alela C, respectiv 34.1% pentru alela T [14]. În studiul nostru mult mai frecvent am întâlnit alela comună C – 81.74% și mai rar alela variantă T – doar 18.26%.

În ceea ce privește frecvența genotipurilor, cel mai frecvent a fost întâlnit genotipul heterozigot C/T – 65.4%, urmat de genotipul homozigot comun C/C – 33.2% și respectiv homozigot variant T/T – 1.4%. În populația luată de noi în studiu am detectat cel mai frecvent genotipul homozigot comun C/C – 66.39%, urmat de genotipul heterozigot C/T – 30.71%, frecvența genotipului T/T fiind comparabilă 2.90% [14]. Date asemănătoare cu cele obținute în studiul de față au fost semnalate de Kaur și colaboratorii pe un lot de 130 subiecți sănătoși din India de Nord: frecvență alelică C – 85.8%, T – 14.1% [15].

Implicarea IL-4 în răspunsul T helper 2 și sinteza de imunoglobuline [16] a orientat cercetările anterioare în direcția examinării relației dintre acest polimorfism și afecțiunile terenului atopic și respectiv afecțiunile inflamatorii. Astfel relația dintre prezența acestui polimorfism și afecțiunile autoimune, teren atopic sau afecțiuni cu etiologie neelucidată încă cu posibilă etiopatogenie autoimună a fost documentată deja pe unele populații: astm bronșic [17], artrită reumatoidă [18,19], lichen plan [20], intestin iritabil [21], scleroză multiplă [22], tiroidită autoimună [23], respectiv reject de grefă renală [24].

În ceea ce privește afecțiunile ginecologice, prezența genotipului C/C asociază un risc crescut de leiomiom uterin [25].

Determinarea profilului de interleukine la nivel populațional poate avea un impact deosebit asupra fiecărui pacient; prezența unui anumit genotip permițând o cuantificare individuală a riscului, cu realizarea pentru diversele afecțiuni a unor tratamente mai mult sau mai puțin agresive, în funcție de prognosticul fiecărui genotip în parte. Desigur sunt necesare studii pe loturi mai mari, ideal pe eșantioane reprezentative pentru populațiile din care provin. În prezent, medicina este orientată din ce în ce mai mult pe realizarea unui diagnostic și terapii centrate pe particularitățile individuale, care trebuie să țină cont de diversele susceptibilități genetice. În acest context, markerii

genetici își vor găsi o aplicabilitate în viitorul apropiat în ghidurile de diagnostic și tratament. Polimorfismele genelor interleukinelor pot juca un rol important, în special în răspunsul la infecții, afecțiuni autoimune și neoplazie, răspunsul imun individual având un rol esențial în autolimitarea sau progresia acestor afecțiuni.

Concluzii

1. Cel mai frecvent a fost întâlnită alela comună C 81.74%, în timp ce alela variantă a fost întâlnită în doar 18.26%.
2. Există o corelație slabă între prezența celor două alele ($p = 0.243$, $p = 0.000014$).
3. Cel mai frecvent a fost întâlnit genotipul C/C (66.39%), urmat de genotipul heterozigot C/T (30.71 %), genotipul homozigot variant fiind cel mai rar întâlnit (2.9%).

Bibliografie

1. Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunology. 6th edition. Mosby, 2001:126
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=5>, downloaded at 10/06/2010
3. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28il4\[gene\]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens\[orgn\]%29%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&term=%28il4[gene]%29%20AND%20%28Homo%20sapiens[orgn]%29%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight) (accesat în 9.04.2010)
4. Clot J. Introduction à l'immunologie. EMC. [14-012-A-10]
5. Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Paré PD. Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 1):135-40.
6. Holtmann G, Liebrechts T, Siffert W. Molecular basis of functional gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004 Aug;18(4):633-40.
7. Sharma R, Zucknick M, London R, Kacevska M, Liddle C, Clarke SJ. Systemic inflammatory response predicts prognosis in patients with advanced-stage colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2008 Sep;7(5):331-7.
8. Covic M., Stefanescu D, Sandovici I. *Genetica medicala*, Ed. Polirom 2004.
9. Walley AJ, Cookson WO. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet* 1996;33(8):689-692.
10. Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB Jr, Taba Júnior M, Grisi MF, Michel J, Meyle J, de Souza SL. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a Brazilian population of African heritage. *J Dent* 2004; 32(3): 241-246.
11. http://www.dimensionresearch.com/resources/calculators/conf_prop.html accesat la 15.01.2011
12. Nagarkatti R, Kumar R, Sharma SK, Ghosh B. Association of IL4 gene polymorphisms with asthma in North Indians. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Jul;134(3):206-12.
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, accesat în 15.01.2011
14. Trajkov D, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Gogusev J, Spiroski M. Distribution of the 22 cytokine gene polymorphisms in healthy Macedonian population. *Bratisl Lek Listy*. 2009;110(1):7-17.
15. Kaur G, Raptap CC, Kumar N, Kumar S, Neolia S, Mehra NK. Frequency distribution of cytokine gene polymorphisms in the healthy North Indian population. *Tissue Antigens*. 2007 Feb;69(2):113-20.
16. Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP, Geha RS. IL-4 inhibits the synthesis of IFN-gamma and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. *J Immunol* 1990;144:570-3
17. Amirzargar AA, Movahedi M, Rezaei N, Moradi B, Dorkhosh S, Mahloji M, Mahdavian SA. Polymorphisms in IL4 and IL4RA confer susceptibility to asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2009;19(6):433-8.
18. Trajkov D, Mishevska-Perchinkova S, Karadzova-Stojanoska A, Petlichkovski A, Strezova A, Spiroski M. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. *Clin Rheumatol*. 2009 Nov;28(11):1291-300.
19. Moreno O, González CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martín J, Ramírez G. Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2007 Jan;34(1):36-42.
20. Bai J, Lin M, Zeng X, Zhang Y, Wang Z, Shen J, Jiang L, Gao F, Chen Q. Association of polymorphisms in the human IFN-gamma and IL-4 gene with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *J Interferon Cytokine Res*. 2008 Jun;28(6):351-8.
21. Barkhordari E, Rezaei N, Mahmoudi M, Larki P, Ahmadi-Ashtiani HR, Ansari-pour B, Alighardashi M, Bashashati M, Amirzargar AA, Ebrahimi-Daryani N. T-helper 1, T-helper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation*. 2010 Oct;33(5):281-6.
22. Urcelay E, Santiago JL, Mas A, Martínez A, de Las Heras V, Arroyo R, de la Concha EG. Role of interleukin 4 in Spanish multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2005 Nov;168(1-2):164-7.
23. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 May;85(5):1984-8.
24. Poole KL, Gibbs PJ, Evans PR, Sadek SA, Howell WM. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transpl Immunol*. 2001 Feb;8(4):259-65.
25. Sosna O, Kolesár L, Slavčev A, Skibová J, Fait T, Mara M, Stržň I, Kužel D. TH1/TH2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid. *Folia Biol (Praha)*. 2010;56(5):206-10.