

Deteksi Variasi Gen ADAM33 Dengan Metode Sekuensing Sanger

Detection of ADAM33 Gene Variants Using Sanger Sequencing

Kencono Viyati^{1,2}, Kinasih Prayuni², Sri Hastuti Andayani³, Yenni Zulhamidah⁴, Achmad Sofwan⁴, Lilah Muflihah⁵, Ronike Yunus⁵, Junaefi⁵, Ijun Judasah⁵

¹Department of Histology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

²Genetic Research Center, YARSI Research Institute, YARSI University, Jakarta

³Department of Pediatric, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

⁴Department of Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

⁵Cibitung Regional Public Hospital, Bekasi, Jawa Barat

Corresponding author: kencono.viyati@yarsi.ac.id

KATA KUNCI asma, gen ADAM33, polimorfisme nukleotida tunggal

ABSTRAK Asma adalah penyakit pernafasan yang ditandai oleh obstruksi saluran napas yang disebabkan oleh peradangan bronkus akut dan kronis. Gen disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) merupakan gen terkait kerentanan terhadap asma dan diketahui memiliki lebih dari 300 polimorfisme. Studi meta-analisis melaporkan bahwa rs2280091, rs2787094, rs511898, rs2280089 dan rs2280090 memiliki asosiasi kuat dengan asma pada populasi Asia. Penelitian pendahuluan ini mengumpulkan 10 partisipan dengan penyakit asma dan 10 partisipan sehat untuk mengidentifikasi alel dan genotipe dari masing-masing polimorfisme menggunakan metode amplifikasi dan sekuensing Sanger. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa 60% dari sampel yang diuji memiliki genotipe heterozigot untuk rs2280090 dan rs228091 baik pada sampel kasus maupun kontrol. Varian SNP rs2280096 menunjukkan bahwa frekuensi alel homozigot wildtype sebesar 60% baik pada sampel kasus maupun kontrol. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui apakah varian SNP tersebut memiliki asosiasi yang positif dengan penyakit asma.

KEYWORDS *asthma, ADAM33 gene, single polymorphism nucleotide*

ABSTRACT *Asthma is a respiratory disease characterized by airway obstruction caused by acute and chronic bronchial inflammation. A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) is a gene associated with asthma susceptibility and is known to have more than 300 polymorphisms. Meta-analysis studies reported that rs2280091, rs2787094, rs511898, rs2280089 and rs2280090 have a strong association with asthma in Asian populations. This preliminary study collected 10 participants with asthma and 10 healthy participants to identify the alleles and genotypes of each polymorphism using PCR amplification and Sanger sequencing*

methods. Sequencing results showed that 60% of the samples had heterozygous genotypes for rs2280090 and rs228091 in both case and control samples. The SNP variant rs2280096 shows that the homozygous wildtype allele frequency is 60% in both case and control samples. Further research needs to be done to find out whether this SNP variant has a positive association with asthma.

PENDAHULUAN

Asma adalah penyakit pernafasan yang ditandai oleh obstruksi saluran napas yang disebabkan oleh peradangan bronkus akut dan kronis (Howard *et al.*, 2003). Asma masih menjadi masalah kesehatan secara global dan prevalensi di beberapa negara terus meningkat. Data tahun 2016, World Health Organization (WHO) menunjukkan sekitar 339 juta orang menderita asma secara global dengan mortalitas sebesar 417.918 (Backman *et al.*, 2017; Vos *et al.*, 2017). Berdasarkan data Riskesdas 2018, prevalensi asma di Indonesia sebesar 4.8% dengan tingkat kekambuhan 56.1% untuk laki-laki dan 58.8% untuk perempuan (Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan, 2018).

Faktor genetik (polimorfisme genetik, riwayat keluarga) dan faktor lingkungan (asap tembakau, polusi udara, alergen) berkontribusi terhadap perkembangan asma (Toskala *et al.*, 2015). Penelitian genetik sebelumnya menunjukkan bahwa kontribusi beberapa gen terlibat dalam kerentanan dan perkembangan asma (Shen *et al.*, 2017). Dengan demikian, penelitian terkait genetik dan asma menjadi menarik untuk mendapatkan data dasar hubungan antara faktor genetik dan asma.

Gen *disintegrin and metalloprotease 33* (ADAM33) merupakan gen terkait kerentanan terhadap asma yang pertama kali dilaporkan oleh Van Eederwegh *et al* (2002). ADAM33 diasosiasikan dengan asma dan hyper-responsif bronkus. Sebagian besar diekspresikan dalam sel otot polos saluran nafas dan sel fibroblast

paru namun tidak diekspresikan pada sel epitel, sel T maupun leukosit terkait inflamasi (Shen *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). Gen ADAM33 terletak pada lengan pendek kromosom 20p13 dan sangat polimorfik. Saat ini diperkirakan lebih dari 300 polimorfisme nukleotida Tunggal (SNP) pada gen ADAM 33 telah diidentifikasi pada berbagai populasi (Xue *et al.*, 2013).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa terdapat sekitar 14 SNP yang telah diinvestigasi dan memiliki asosiasi terhadap asma pada populasi Asia, Amerika dan Eropa, yaitu rs2280091, rs2787094, rs528557, rs2280090, rs511898, rs44707, rs3918396, rs543749, rs574174, rs597980, rs2853209, rs2280089, rs612709, dan rs3746631. Studi meta-analisis melaporkan bahwa rs2280091, rs2787094, rs511898, rs2280089 memiliki asosiasi kuat dengan asma pada keseluruhan populasi studi. rs2280091 (OR, 2.025; 95% CI, 1.420–2.888), rs2787094 (OR, 1.777; 95% CI, 1.056–2.989), rs511898 (OR, 1.191; 95% CI = 1.059–1.339), rs2280089 (OR, 3.760; 95% CI, 1.331–10.620) dan rs2280090 (OR, 1.458; 95% CI, 1.009–2.105) memiliki asosiasi yang kuat pada populasi Asia namun tidak pada populasi Amerika dan Eropa (Liang *et al.*, 2013).

Penelitian sebelumnya di Indonesia pada gen ADAM33 menunjukkan tidak terdapat asosiasi kuat antara rs2787094 dan asma (Viyati *et al.*, 2023), namun demikian ditemukan hubungan yang kuat pada populasi China dan India (Shen *et al.*, 2017; Tripathi *et al.*, 2011). Hal ini mungkin terjadi karena

perbedaan etnik dan jumlah sampel yang berbeda. Dalam penelitian ini akan dilaporkan hasil studi pendahuluan untuk rs2280089, rs2280090, dan rs2280091 yang merupakan varian dengan asosiasi kuat pada populasi Asia menggunakan metode amplifikasi dan sekuensing Sanger. Pada penelitian pendahuluan ini diharapkan dapat mengidentifikasi alel dan genotipe yang terdapat pada rs2280089, rs2280090, dan rs2280091 untuk dijadikan rujukan positif pada penelitian lanjutan menggunakan metode amplifikasi PCR.

METODE PENELITIAN

Pengumpulan sampel

Penelitian pendahuluan ini melibatkan 10 orang yang didiagnosis menderita asma dan 10 orang kontrol sehat pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran YARSI. Pada penelitian ini kami hanya mengumpulkan sampel pada orang dengan asma herediter dan tidak menilai kapasitas paru-paru mereka. Sampel kontrol normal tidak memiliki gejala asma, alergi, autoimun, atau penyakit inflamasi. Negatif untuk penyakit parasit. Payung penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Universitas YARSI (No. 156/KEP-UY/EA.10/VII/2023), dan para peserta telah mendapat penjelasan dan telah menandatangani form persetujuan penelitian.

Ekstraksi DNA dan Identifikasi SNP

Darah dari peserta penelitian dikumpulkan sebanyak 3mL dalam tabung anti-koagulan EDTA. DNA

kemudian diekstraksi dari sampel darah menggunakan Kit Isolasi DNA (Quick DNA Kits, Zymo Research, Irvine, CA, USA) sesuai protokol yang dianjurkan oleh produsen kit. DNA yang telah diekstraksi dari darah kemudian disimpan dalam lemari es -20°C . DNA ini kemudian diukur kualitas dan kuantitasnya menggunakan spektrofotometer (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Identifikasi SNP menggunakan metode amplifikasi PCR yang dilanjutkan dengan sekuensing. Primer yang digunakan untuk amplifikasi rs2280089, rs2280090, dan rs2280091 dapat dilihat pada Tabel 1. Kami mendesain sendiri primer untuk amplifikasi rs2280089 dan rs2280090, sedangkan untuk amplifikasi rs2280091 berdasarkan artikel ilmiah sebelumnya (Zeinaly *et al.*, 2017). Proses amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR konvensional (T100, BioRad, California, USA). Sebanyak 20 ng DNA dimasukkan dalam larutan mix PCR yang terdiri dari 1x GoTaq Green (Promega, Wisconsin, USA), 0.1 uM primer *forward* dan *reverse* (IDT, Singapore). Profil amplifikasi adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, 35 siklus berulang tahap denaturasi pada suhu 95°C 30 detik, annealing pada suhu 60°C selama 30 detik dan polimerisasi pada suhu 72°C selama 1 menit, diakhiri dengan polimerisasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dan suhu penyimpanan di 4°C . Hasil amplifikasi kemudian dilakukan *direct sekuensing* oleh perusahaan jasa sekuensing MacroGen Inc., Singapura.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi daerah varian gen ADAM33

Nama SNP	Sekuen Primer	PCR Product (pb)
rs2280089	Forward: 5'-TCCAGGTCCCTGCCTACCTTGGGGGTCA-3' Reverse: 5'-ACGTTGCTCAGCCCCAAAGATGGCCAC-3'	368
rs2280090	Forward: 5'-TCAGGGTCTGGGAGAAATGGTG-3' Reverse: 5'-GCAGAACTCCCTGGGCTGGACACCATGC-3'	330
rs2280091	Forward: 5'-ACTCAAGGTGACTGGGTGCT-3' Reverse: 5'-GAGGGCATGAGGCTCACTTG-3' (Zeinaly <i>et al.</i> , 2017)	400

Analisis Data

Jumlah alel dan genotipe varian gen ADAM33 pada kelompok kasus dan kelompok kontrol dikumpulkan dalam *spreadsheets* excel (Microsoft, Washington, USA). Distribusi alel dan genotipe kemudian dihitung secara langsung menggunakan bantuan *tools spreadsheets* excel. Dalam penelitian ini tidak dilakukan analisis statistik dikarenakan jumlah sampel yang terlalu kecil.

Pencarian varian SNP gen ADAM33 dari hasil sekuensing pada penelitian ini menggunakan perangkat lunak NovoSNP (Weckx *et al.*, 2005). Visualisasi grafik hasil sekuensing menggunakan perangkat lunak BioEdit (Hall, 1999).

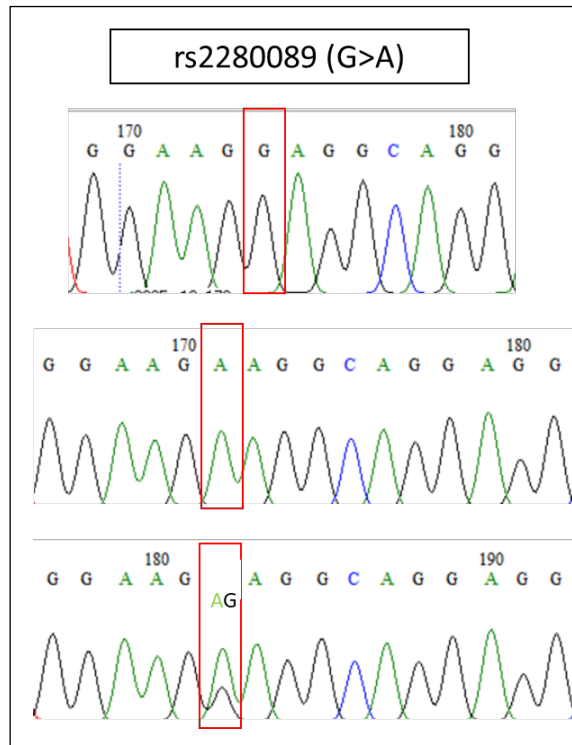
HASIL

Penelitian pendahuluan ini diikuti oleh 20 orang partisipan yang terdiri dari 10 orang dengan asma dan 10 orang kontrol sehat pada Mahasiswa tingkat 3

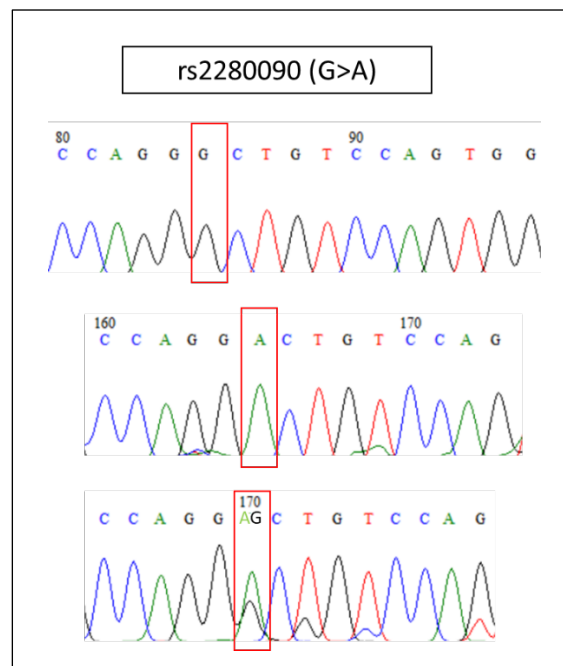
FK Universitas YARSI. Proporsi jenis kelamin dari masing-masing kelompok adalah 90% perempuan dan 10% laki-laki. Umur rata-rata dari partisipan pada penelitian ini adalah 22.37 tahun.

Hasil sekuensing menunjukkan genotipe dari masing-masing varian gen ADAM33 pada penelitian ini. Gambar 1-3. secara jelas menunjukkan perbedaan antar masing-masing alel homozigot *wildtype*, homozigot mutan dan heterozigot berdasarkan grafik elektroferogram yang terbentuk.

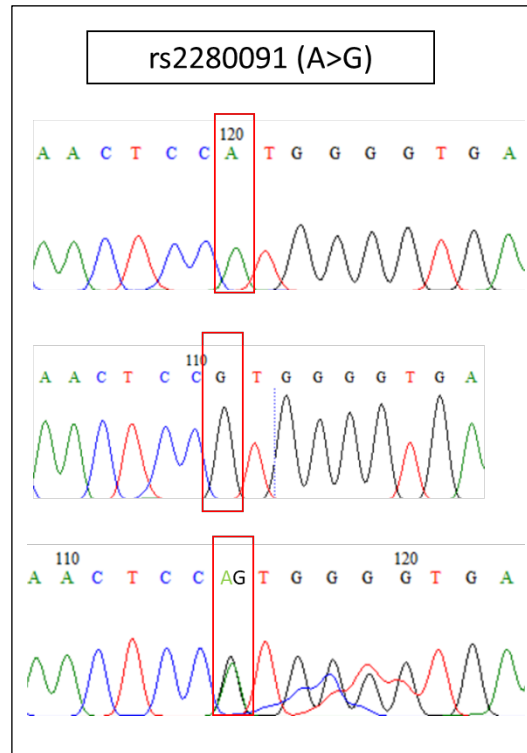
Tabel 2 menunjukkan distribusi alel dan genotipe pada rs2280089, rs2280090, dan rs2280091. Distribusi alel dan genotipe untuk SNP-SNP tersebut konsisten dengan Hardy-Weinberg equilibrium dengan nilai $P > 0.05$. Pada sampel yang diuji ditemukan bahwa alel heterozigot pada masing-masing varian SNP menunjukkan frekuensi paling besar dibandingkan dengan alel homozigot *wildtype* maupun alel homozigot mutan.



Gambar 1. Pola elektroferogram hasil sekuensing sanger pada varian gen ADAM33 rs2280089



Gambar 2. Pola elektroferogram hasil sekuensing sanger pada varian gen ADAM33 rs2280090



Gambar 3. Pola elektroferogram hasil sekuensing sanger pada varian gen ADAM33 rs2280091

Tabel 2. Distribusi Alel dan Genotipe pada varian gen ADAM33

SNP & Genotipe	Perubahan Basa	Wildtype Allele	Risk allele	Alel & Genotipe	Kasus Asma (n=10)		Kontrol Sehat (n=10)	
					Jumlah	Frekuensi (%)	Jumlah	Frekuensi (%)
rs2280089	G>A	G	A	G	15	75	16	80
				A	5	25	4	20
				GG	6	60	6	60
				GA	3	30	4	40
				AA	1	10	0	0
rs2280090	G>A	G	A	G	10	50	12	60
				A	10	50	8	40
				GG	2	20	3	30
				GA	6	60	6	60
				AA	2	20	1	10
rs2280091	A>G	A	G	A	11	55	14	70
				G	9	45	6	30
				AA	2	20	4	40
				AG	7	70	6	60
				GG	1	10	0	0

PEMBAHASAN

Asma merupakan penyakit multifaktorial yang disebabkan karena faktor genetik dan paparan lingkungan.

Gen ADAM33 diketahui berasosiasi positif dengan penyakit asma. ADAM33 diekspresikan secara terbatas pada fibroblas manusia dan otot polos.

Polimorfisme ADAM33 dapat mempercepat proliferasi pada otot polos dan fibroblas, yang menyebabkan fibrosis sub-epitel dan peningkatan respons bronkus. Gen ADAM33, dengan polimorfisme tertentu meningkatkan peradangan atau respons imun yang dimediasi oleh sel T-helper 2 (Karimi *et al.*, 2014; Van Eerdewegh *et al.*, 2002; Howard *et al.*, 2003).

Studi meta-analisis pada varian gen ADAM33 melaporkan bahwa rs2280091, rs2787094, rs511898, rs2280089 dan rs2280090 berkorelasi positif dengan penyakit asma pada populasi di Asia (Siqiao *et al.*, 2013). Studi lain dari Deng *et al.*, (2017) melaporkan bahwa polimorfisme rs2280091 mungkin berpotensi menjadi prediktor asma yang rentan pada anak-anak di populasi Asia. Studi sun *et al.*, (2017) menunjukkan bahwa beberapa polimorfisme ADAM33 rs2280091, rs2280090, rs2787094, rs44707 and rs528557 secara signifikan dikaitkan dengan risiko tinggi asma pada masa kanak-kanak.

Studi meta-analisis Li *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa genotipe AA pada SNP rs2280089 meningkatkan risiko asma dibandingkan dengan genotipe GG (AAvsGG: OR=1,55, 95% CI=1,01–2,38, P=0,04). Alel A dan genotipe AA+AG pada rs2280090 meningkatkan risiko asma pada populasi Asia (AvsG: OR=1.44, 95% CI=1.13–1.85, P=0.004; AA+AGvsGG: OR=1.45, 95% CI=1.11–1.88, P=0.006) dibandingkan pada populasi Kaukasia. Subgrup analisis juga menunjukkan bahwa alel A dan genotipe AA+AG meningkatkan risiko asma pada anak-anak (AvsG: OR=1.45, 95% CI=1.11–1.89, P=0.006; AA+AGvsGG: OR=1.43, 95% CI=1.07–1.92, P=0.02) dan tidak pada orang dewasa. Namun demikian untuk rs2280091 tidak ditemukan asosiasi signifikan antara alel dan genotipe pada rs tersebut dengan asma (Li *et al.*, 2019). Penelitian lain

menunjukkan bahwa alel G berasosiasi dengan penyakit asma yang parah dibandingkan alel A (P=0.006) (Zand Karimi *et al.*, 2014). Studi di Indonesia dilakukan oleh Viyati *et al.* (2023) yang melaporkan bahwa tidak terdapat asosiasi signifikan antara rs2787094 dengan penyakit asma. Hal ini mungkin disebabkan karena jumlah sampel yang tidak adekuat untuk menunjukkan signifikansi. Hal ini bertolak belakang dengan Studi Zheng *et al.*, (2015) yang menunjukkan bahwa polimorfisme ADAM33 rs2787094 dapat digunakan sebagai biomarker untuk diagnosis dini asma. Penelitian pendahuluan ini menginvestigasi varian lainnya pada gen ADAM33 yaitu rs2280091, rs2280089 dan rs2280090 menggunakan metode PCR dan *direct sequencing*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui data dasar alel dan genotipe dari variasi gen tersebut untuk selanjutnya SNP akan dideteksi dengan metode PCR alel spesifik yang lebih sensitive dan lebih murah.

Hasil sekuensing pada penelitian ini menunjukkan bahwa alel homozigot *wildtype*, homozigot mutan, dan heterozigot dapat diidentifikasi secara jelas. Gambar 1-3 menunjukkan elektroferogram grafik sekuensing. Setiap puncak pada elektroferogram mewakili satu nukleotida dalam rangkaian DNA, dan setiap nukleotida memiliki warna berbeda; A berwarna hijau, T berwarna merah, C berwarna biru, dan G berwarna hitam. Sekuensing Sanger merupakan metode *gold standart* yang digunakan untuk deteksi mutasi pada suatu gen, yang dapat berupa mutasi titik, delesi, insersi maupun duplikasi. Namun demikian metode ini cukup mahal untuk mengurutkan keseluruhan genom. Sanger sekuensing banyak digunakan untuk deteksi beberapa mutasi pada ukuran panjang basa yang tidak lebih dari 1000 pasang basa (Gomes & Korf, 2018).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 60% dari sampel yang diuji memiliki genotipe heterozigot untuk

rs2280090 dan rs228091 baik pada sampel kasus maupun kontrol. Varian SNP rs2280096 menunjukkan bahwa frekuensi alel homozigot wildtype sebesar 60% baik pada sampel kasus maupun kontrol. Hasil ini menjadi data dasar untuk mengembangkan metode deteksi SNP lain yang lebih terjangkau pada ADAM33 untuk rs2280091, rs2280089 dan rs2280090. Penelitian lanjutan dengan jumlah sampel minimal 30 sampel pada sampel kasus dan kontrol untuk SNP-SNP tersebut perlu dilakukan. Hal ini sejalan dengan Fung & Keenan (2014) bahwa ukuran sampel yang diperlukan untuk setidaknya mendeteksi 95% kemungkinan alel yang muncul pada frekuensi 0,05 adalah 30 individu diploid (Fung & Keenan, 2014).

KESIMPULAN

Varian SNP pada gen ADAM33 berhasil dideteksi dengan metode amplifikasi PCR dan *direct sanger sequencing*. Metode Sekuensing Sanger dapat mengidentifikasi alel homozigot *wildtype*, homozigot mutan, dan heterozigot pada varian SNP gen ADAM33 rs2280089, rs2280090, dan rs2280091.

SARAN

Penelitian lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih besar harus dilakukan untuk mengetahui apakah varian SNP gen ADAM33 rs2280089, rs2280090, dan rs2280091 memiliki asosiasi yang positif dengan penyakit asma.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada partisipan yang berpartisipasi dalam penelitian ini serta untuk Yayasan dan Universitas YARSI untuk dukungan peralatan laboratorium. Penelitian ini didanai oleh Penelitian Dosen Pemula (PDP), DIKTI (No. Hibah 118/WRII/PN.00/VII/2023).

DAFTAR PUSTAKA

Backman H, Raisanen P, Hedman L, Stridsman C, Andersson M,

Lindberg A, *et al.*, 2017. Increased prevalence of allergic asthma from 1996 to 2006 and further to 2016—results from three population surveys. *Clinical and Experimental Allergy*, 47, 1426–1435.

Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan 2019. Laporan Nasional RISKESDAS 2018. Available from:

<https://repository.badankebijakan.kemkes.go.id/id/eprint/3514/1/Laporan%20Riskasdas%202018%20Nasional.pdf> [Diakses pada 28 Oktober 2023].

Deng R, Zhao F, Zhong X 2017. T1 polymorphism in a disintegrin and metalloproteinase 33 (ADAM33) gene may contribute to the risk of childhood asthma in Asians. *Inflamm Res.*, 66, 1–12.

Fung T & Keenan K 2014. Confidence Intervals for Population Allele Frequencies: The General Case of Sampling from a Finite Diploid Population of Any Size. *Plos One*, 9(1), e85925.

Gomes A & Korf B 2018. Chapter 5 – Genetic Testing Techniques. Robin NH, Farmer MB, Editors. In *Pediatrics Cancer Genetics* (pp 47-64).

Hall T 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Howard TD, Postma DS, Jongepier H, Moore WC, Koppelman GH, Zheng SL, Xu J, *et al.*, 2003. Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(4), 717-722.

Li HF, Yan LP, Wang K, Li XT, Liu HX, Tan W 2019. Association between ADAM33 polymorphisms and asthma risk: a systematic review

- and meta-analysis. *Respiratory Research*, 20:38.
- Shen Bo, Lin R, Wang CC, Rei J, Sun Y, Yang YL, Lin YY 2017. ADAM33 gene polymorphism identified to be associated with asthma in a Chinese Li Population. *Biomedical Reports*, 6, 323-328.
- Siqiao L, Wei X, Gong C, Jinmei W, Zhangrong C, Jingmin D 2013. A disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM 33) gene polymorphism and the risk of asthma: A meta-analysis. *Human Immunology*. 74(5), 648-657.
- Sun FJ, Zou LY, Tong DM, Lu XY, Li J, Deng CB 2017. Association between ADAM metallopeptidase domain 33 gene polymorphism and risk of childhood asthma: a meta-analysis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 50(10), e6148.
- Toskala E & Kennedy DW 2015. Asthma risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol*, 5, S11–6.
- Tripathi P, Awasthi S, Prasad R, Husain N, Ganesh S 2011. Association of ADAM33 gene polymorphisms with adult-onset asthma and its severity in an Indian adult population. *J Genet*, 90, 265–273.
- Xue W, Han W, Zhou Z 2013. ADAM33 Polymorphisms are associated with asthma and a distinctive palm dermatoglyphic pattern. *Molecular Medicine Reports*, 8(6), 1795-1800.
- Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, *et al.*, 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, 418: 426-430.
- Viyati K, Prayuni K, Zulhamidah Y, Razari I, Yuliwulandari R 2023. Association between rs2787094 Genetic Variants in ADAM33 Gene and Asthma in Indonesian Population: Preliminary study. *Makara Journal of Health*, 27(2), 149-153.
- Vos T, Abajobir AA, Abbafati C, Abbas KM, Abate KH, Abd-Allah F, Abdulle AM, Abebo TA, Abera SF, Aboyans V, *et al.*, 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1211–1259.
- Weckx S, Del-Favero J, Rademakers R, Claes L, Cruts M, De Jonghe P, Van Broeckhoven, De Eijk P 2005. novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. *Genome Research*, 15(3), 436-442.
- Zand Karimi MR, Faridhosseini R, Abbaszadegan MR, Jabbari azad F, Shirkani A, Riyahi A, Montazar M, Gholamin M 2014. Association of ADAM33 gene single nucleotide polymorphisms with allergic asthma in northeastern Iranian population. *Iran J Basic Med Sci*, 17:716-721.
- Zeinaly I, Sadeghi-Shabestari, Razavi A, Sajay-Asbaghi, Sadigh-Eteghad, Kazemi T 2017. Investigating the Association of ADAM33 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) with Susceptibility to Allergic Asthma in Azerbaijan Population of Iran: A Case-control Study. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 16(05), 378-385.
- Zheng W, Wang L, Su X, Hu XF 2015. Association between V4 polymorphism in the ADAM33 gene and asthma risk: a meta-analysis. *Genet Mol Res Gmr.*, 14, 989–99.