

Aus dem  
Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Neu identifizierte genetische Variationen im HLX1-Gen beeinflussen die Entstehung von  
Asthma bronchiale im Kindesalter**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Isabell Ruoff  
aus  
Tübingen

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. M. Kabesch

Mitberichterstatter: PD Dr. Elke Holinski-Feder  
PD Dr. Rainald Fischer

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2008

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Asthma und Allergien bei Kindern und Jugendlichen .....	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie .....	1
1.1.2	Symptomatik .....	3
1.1.3	Ätiologie des Asthma bronchiale .....	5
1.2	Asthma bronchiale - Ein Ungleichgewicht der T-Helferzell-Differenzierung.....	7
1.2.1	Die T-Zellaktivierung.....	8
1.2.2	Die Th <sub>1</sub> -Zell-Differenzierung und ihre wichtigsten Transkriptionsfaktoren .....	11
1.2.2.1	Der Einfluss des Transkriptionsfaktors T-bet auf die Th <sub>1</sub> -Zelldifferenzierung ...	13
1.2.2.2	HLX1 (H2.0-Like Homeobox 1) interagiert mit T-bet .....	16
1.2.3	Die Rolle der Th <sub>2</sub> -Zell-Differenzierung bei der Entstehung von Asthma .....	19
1.3	Gene und Umwelt tragen zur Entstehung atopischer Erkrankungen bei .....	21
1.3.1	Die Einflüsse von bestimmten Umweltfaktoren .....	22
1.3.2	Asthmagenetik.....	23
1.3.2.1	Methoden zur Identifikation asthmarelevanter Gene .....	24
1.3.2.2	Ergebnisse genetischer Analysen des GATA-3-Gens.....	25
1.3.2.3	Ergebnisse genetischer Analysen des T-bet-Gens .....	27
1.3.2.4	HLX1 (H2.0-Like Homeobox 1) ein weiterer Schlüsseltranskriptionsfaktor .....	29
1.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	29
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
2.1	Die Studienpopulationen .....	30
2.1.1	Population für das Mutationenscreening.....	30
2.1.2	Die Studienpopulation für die Assoziationsanalyse.....	30
2.1.2.1	Fragebogen .....	31
2.1.2.2	Skin-Prick-Test.....	31
2.1.2.3	Bestimmung des Gesamt-Serum-IgE-Spiegels .....	32
2.2	Material .....	32
2.2.1	Geräte .....	32
2.2.2	Computerprogramme .....	33
2.2.3	Puffer, Lösungen, Reagenzien .....	34
2.2.4	Reaktionskits .....	35
2.2.5	Enzyme.....	36
2.2.6	Primer .....	36
2.2.7	Sonstige Materialien.....	36
2.3	Methoden.....	37
2.3.1	DNA-Extraktion .....	37
2.3.2	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen .....	37
2.3.2.1	Theoretische Grundlagen .....	37
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) <sup>98</sup> .....	38
2.3.3.1	Theoretische Grundlagen .....	38
2.3.3.2	Praktische Durchführung.....	39
2.3.4	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen .....	41
2.3.4.1	Theoretische Grundlagen .....	41
2.3.4.2	Praktische Durchführung.....	42
2.3.5	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	42

2.3.5.1	Praktische Durchführung.....	42
2.3.6	Sequenzierung .....	43
2.3.6.1	Theoretische Grundlagen .....	43
2.3.6.2	Praktische Durchführung.....	44
2.3.7	Fällung und Aufreinigung der Sequenzierreaktion .....	46
2.3.7.1	Praktische Durchführung.....	46
2.3.8	Maschinelle Sequenzierung mit ABI Prism 3100 .....	46
2.3.9	Auswertung der Sequenzen.....	47
2.3.10	Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS.....	48
2.3.10.1	Theoretische Grundlagen .....	48
2.3.10.2	Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF MS .....	50
2.3.10.3	Der Versuchsablauf im Rahmen der hME-Reaktion.....	52
2.3.10.3.1	Primer Design.....	52
2.3.10.3.2	PCR-Reaktion.....	54
2.3.10.3.3	Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) Reaktion .....	55
2.3.10.3.4	Primer-Extensionsreaktion .....	55
2.3.10.3.5	Aufreinigung der Extensions-Produkte .....	56
2.3.10.3.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	57
2.3.11	Statistische Analysen.....	57
2.3.11.1	Assoziationsanalysen .....	57
2.3.11.1.1	Qualitative Phänotypen (kategorische Variablen).....	57
2.3.11.1.2	Quantitative Phänotypen (kontinuierliche Variablen).....	59
2.3.11.2	Haplotypanalyse .....	59
2.3.11.3	Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) .....	60
2.3.12	<i>In silico</i> Analysen.....	61
2.3.12.1	Phylogenetische Analysen (VISTA Browser).....	61
2.3.12.2	Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (MAT-Inspector) .....	62
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
3.1	Ergebnisse des Mutationenscreenings.....	65
3.1.1	Amplifikation und Sequenzierung .....	65
3.1.2	Identifizierung der Polymorphismen des HLX1-Gens.....	66
3.1.3	Analyse des Kopplungsverhaltens (Linkage Disequilibrium) .....	72
3.2	Genotypisierung .....	73
3.2.1	Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	74
3.3	Ergebnisse der Assoziationsstudie .....	75
3.3.1	HLX1 und Asthma bronchiale .....	76
3.3.2	HLX1 und atopisches Asthma.....	77
3.3.3	HLX1 und nicht-atopisches Asthma .....	78
3.3.4	HLX1 und Atopie.....	79
3.3.5	Weitere Ergebnisse der Genotypisierung des HLX1-Gens.....	80
3.3.6	Haplotypanalyse .....	80
3.4	<i>In silico</i> Analysen.....	85
3.4.1	Phylogenetische Analyse.....	85
3.4.1.1	Phylogenetischer Vergleich von Mensch – Schimpanse – Hund – Maus.....	85
3.4.2	Untersuchung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (MAT-Inspector) .....	87

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>HLX1-GENKARTE .....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>119</b>
<b>11</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>120</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>123</b>
<b>13</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>124</b>



## **1 EINLEITUNG**

### 1.1 Asthma und Allergien bei Kindern und Jugendlichen

#### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Weltweit stellen atopische Erkrankungen eines der größten gesundheitlichen Probleme der modernen Gesellschaft dar. Waren Asthma und andere allergische Erkrankungen zu Beginn des letzten Jahrhunderts noch vergleichsweise selten, ist die Prävalenz in den letzten Jahrzehnten sprunghaft angestiegen. Vor allem in industriell hoch entwickelten Ländern hat sich die Zahl der Kinder mit einer atopischen Erkrankung in den letzten 20 Jahren verdoppelt<sup>1</sup>.

Asthma bronchiale ist mit 8-10% eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter in Deutschland<sup>2</sup>, wobei in der frühen Adoleszenz die Asthma-Inzidenz bei Jungen und Mädchen vergleichbar ist<sup>3</sup>. Bis zum Ende der Pubertät ist das männliche Geschlecht etwa doppelt so häufig betroffen wie das weibliche. Im Allgemeinen ist die Prävalenz der Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen bis zum 19. Lebensjahr höher, als die von Erwachsenen. So kann angenommen werden, dass Kinder ihre Erkrankung wieder verlieren können. In einer Untersuchung gaben 30% der Kinder, bei denen bis zum 7. Lebensjahr Asthma diagnostiziert worden war, nach 28 Jahren keinerlei Symptome einer asthmatischen Erkrankung mehr an<sup>4</sup>.

Zudem scheint die Asthmaprävalenz von sozioökonomischen Faktoren und ethnischer Herkunft beeinflusst zu werden<sup>5</sup>. Mittels epidemiologischer Studien konnte die Prävalenz atopischer Erkrankungen an Kindern und Erwachsenen eingehend untersucht werden. So leiden z.B. in Bayern und Nordrhein-Westfalen etwa ein Drittel aller Schulanfänger an einer allergischen Sensibilisierung gegenüber Allergenen in Luft- und Nahrungsmitteln<sup>6</sup>. Im Raum

München weisen allein 33% der neun- bis elfjährigen Schulkinder eine allergische Erkrankung (Rhinitis allergica, allergisches Asthma, atopische Dermatitis) auf<sup>7</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass beim Auftreten von Asthma erhebliche regionale Unterschiede bestehen und Allergien vor allem in westlichen Ländern besonders häufig sind<sup>8</sup>. Allerdings sind bis heute keine Ursachen für die länderabhängige Variation der Prävalenz von Allergien bekannt.

Allergien entstehen durch „eine verstärkte, spezifische Abwehrreaktion gegenüber harmlosen Substanzen im Sinne einer krank machenden Überempfindlichkeit<sup>9</sup> (eine das normale Maß übersteigende Reizbeantwortung)“. Dies kann an verschiedenen Organsystemen auftreten, wobei vor allem Haut und Schleimhäute betroffen sind, da sie als Grenzfläche zwischen Individuum und Umwelt fungieren. Die wichtigsten allergischen Erkrankungen umfassen verschiedene Zustandsbilder, wie die saisonale oder ganzjährige Rhinokonjunktivitis, das Kontaktekzem, das atopische Ekzem (Neurodermitis) und das atopische Asthma bronchiale.

Asthma bronchiale wiederum definiert sich als eine entzündliche Erkrankung der unteren Atemwege. Diese ist charakterisiert durch eine rezidivierende, weitgehend generalisierte und reversible Bronchialobstruktion<sup>10</sup>, verursacht durch eine Hypertrophie und Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur sowie eine Hyper- und Dyskrinie der Bronchialdrüsen und ein entzündliches Ödem der Bronchialwand.

Wie beim Erwachsenen handelt es sich auch bei Kindern um eine episodisch auftretende Atemwegsobstruktion, beruhend auf einer bronchialen Entzündung. Vor allem im Kleinkindalter besteht die Schwierigkeit, die Ursache für eine Atemwegsobstruktion<sup>11-13</sup> richtig zu diagnostizieren. So können unter anderem eine passive Zigarettenrauchexposition



oder eine Viruserkrankung in Zusammenhang gebracht werden. Aus diesem Grund bezeichnet man bei Kindern das Asthma bronchiale auch als episodisch auftretendes „Giemen“ oder Husten, wenn in einem klinischen Zusammenhang Asthma wahrscheinlich ist und eine andere Erkrankung ausgeschlossen werden kann. Zur Abgrenzung einer vorübergehenden obstruktiven Bronchitis von einem beginnenden Asthma bronchiale, kann die Familienanamnese (Asthma oder Atopie in der Familie) hilfreich sein. Besteht eine positive Familienanamnese, kann das Risiko an Asthma zu erkranken, um 75% erhöht sein<sup>14</sup>. Genauso wichtig sind Hinweise auf eine atopische Vorerkrankung, z.B. ein atopisches Ekzem, als mögliche Vorläuferphase einer allergischen Atemwegserkrankung. Vor allem frühzeitig positive Allergietests sind für die langfristige Risikoabschätzung von großer Bedeutung<sup>9</sup>.

### 1.1.2 Symptomatik

Bei einem Asthmaanfall weisen die Bronchien von Asthmatikern eine spezifische Reaktion auf, d.h. sie verengen sich auf bestimmte Reize hin weit mehr als die Atemwege gesunder Kinder. Diese Reaktion beruht auf einer Entzündung der Bronchialschleimhaut, an der unter anderem eosinophile Granulozyten und Lymphozyten beteiligt sind<sup>15</sup>. Durch eine zunehmende Entzündung schwillt die Bronchialschleimhaut weiter an, und verkleinert das Bronchiallumen, wodurch der Luftdurchfluß verkleinert wird. Aufgrund der Dehnungsbewegung des Thorax kann Atemluft die verengten Bronchien passieren. Bei der Expiration wird der Brustkorb allerdings komprimiert, die Bronchien noch weiter zusammengedrückt und das Abatmen erschwert. Daher wird Asthma oft als „Unfähigkeit ausatmen zu können“ beschrieben. Es entsteht eine forcierte und verlängerte Expiration, die sich bis zur Dyspnoe oder in schweren Fällen zur Tachypnoe steigern kann. Der Thorax erscheint überbläht und verhartet bei starken asthmatischen Patienten beinahe in der

Inspirationsstellung (*Volumen pulmonum auctum*). Die bronchiale Hyper- und Dyskrie führt zu zähglasigem Auswurf und auskultatorisch kann deswegen bei Asthmatikern ein massives „Brummen“, „Giemen“ und „Pfeifen“ über beiden Lungenfeldern wahrgenommen werden. Perkutorisch ist aufgrund der starken Überblähung des Thorax ein hypersonorer bis tympaner Klopfeschall hörbar.

Daraus ergeben sich die typischen Asthma-Symptome: Reizhusten, Atemnot während bzw. nach körperlicher Anstrengung, Engegefühl in der Brust und eine pfeifende Atmung (wheezing). Um die Atmung zu erleichtern, verwenden viele Asthmatiker die sogenannte Lippenbremse: Atmet man gegen den Widerstand gespitzter Lippen aus, steigt der Luftdruck in den Bronchien und verhindert dadurch den expiratorischen Bronchialkollaps. Diese Bronchialobstruktion kann sich entweder spontan oder durch den Einsatz von Medikamenten ganz oder teilweise zurückbilden. In den meisten Fällen dauert ein Asthmanfall mehrere Minuten bis Stunden und der Patient erscheint anschließend wieder klinisch gesund. Diese Asthmaanfälle treten vor allem in den frühen Morgenstunden zwischen 3 und 5 Uhr auf, da sie zirkadianen vagalen Einflüssen unterliegen. Dauert eine akute Dyspnoe allerdings länger als 24 Stunden und spricht auf keine adäquate Therapie an, handelt es sich definitionsgemäß um einen „*Status asthmaticus*“.

Die Therapie bei einem Asthmapatienten hat zum Ziel, dass die Betroffenen weitgehend beschwerdefrei werden und ein normales Leben führen können<sup>15</sup>. Da davon ausgegangen werden muss, dass es zu keiner vollständigen Ausheilung kommt, gehört zur Therapie eine stark reduzierte Anfallshäufigkeit, normale Aktivitäten in Beruf und Freizeit, eine seltene Notwendigkeit einer „Bedarfsmedikation“ und den bestmöglichen Erhalt einer normalen Lungenfunktion<sup>16</sup>.

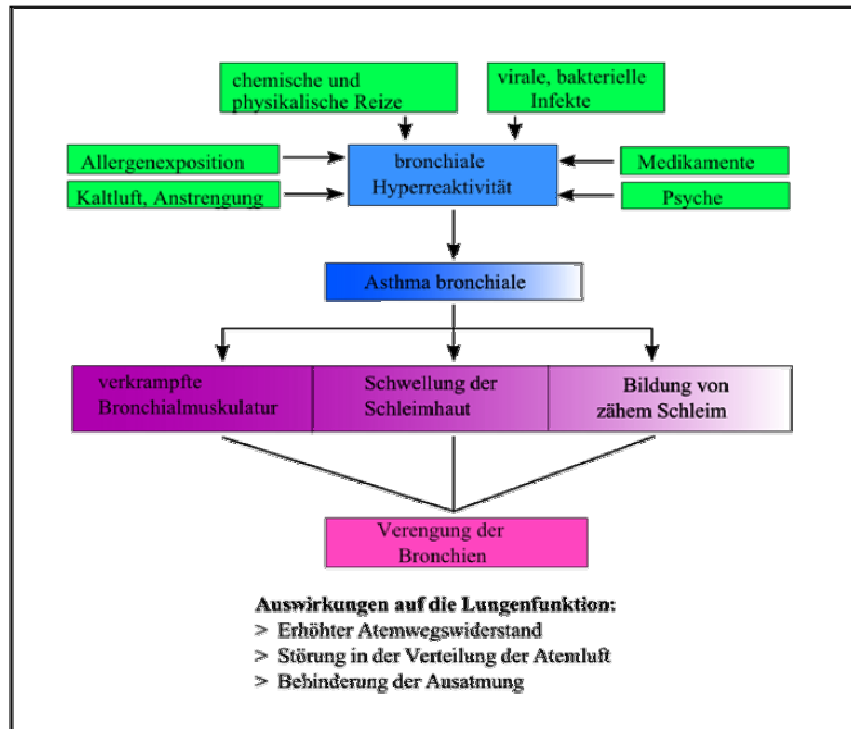
### 1.1.3 Ätiologie des Asthma bronchiale

Allein durch die Symptomatik kann nicht auf die zugrunde liegende Form des Asthma bronchiale geschlossen werden, wobei verschiedene Formen unterschieden werden können: Mischformen, das intrinsische nicht-atopische und das extrinsische-atopische Asthma.

Die häufigste Asthmaform bei Kindern sind Mischformen. Beim gemischtförmigen Asthma kommt es zu einer Kombination von atopischem und nicht-atopischem Asthma<sup>17</sup>. Häufig entwickelt sich diese Form schon in der Kindheit. So kann sich z.B. durch die entzündlichen Veränderungen der Atemwege, wie sie für ein atopisches Asthma typisch sind, dazu führen, dass die Empfindlichkeit gegenüber unspezifischen Reizen wie Kälte, Feuchte oder körperliche Belastung zunehmen.

Lässt sich bei einem Asthmapatienten keine Allergie nachweisen, so handelt es sich um ein intrinsisches nicht-atopisches Asthma bronchiale. Die Ätiologie hierfür ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch liegt dem intrinsischen Asthma keine atopische Diathese zugrunde, es existiert aber durchaus eine Hyperreagibilität des Bronchialsystems. Es besteht überwiegend eine negative Eigen- oder Familienanamnese, kein positiver Hauttest, der so genannten Skin-Prick-Test und kein erhöhter IgE-Spiegel. Virusinfektionen sind besonders bei Säuglingen und Kleinkindern unter zwei Jahren der Grund für die Entwicklung einer Überempfindlichkeit der Atemwege. Weitere auslösende Faktoren sind vor allem emotionale Reize, wie Angstzustände oder körperliche Anstrengung. Aber auch Umweltnoxen, wie Zigarettenrauch im frühen Kindesalter, Pharmaka, wie Acetylsalicylsäure und Betablocker, und Kälte können ursächlich sein.

Bei etwa einem Drittel der kindlichen Asthmatiker lassen sich Typ-I-Allergien (ImmunglobulinE-vermittelt) eindeutig als Auslöser nachweisen und sind für die klinische Symptomatik maßgeblich verantwortlich. Ist dies der Fall, handelt es sich um ein extrinsisches-atopisches Asthma bronchiale. Der frühe Kontakt mit Allergenen aus Nahrung und Umwelt, ist maßgeblich für die Entwicklung einer Allergie von Bedeutung. Die wichtigsten Allergene in Mitteleuropa stammen von Hausstaubmilben, Katzenepithelien (ganzjährige Allergene) sowie Hasel-, Birken- und Gräserpollen (Inhalationsallergen)<sup>18</sup>. Ausschlaggebend für die Diagnostik ist neben dem typischen klinischen Erscheinungsbild und der Lungenfunktionsanalyse eine positive Eigen- oder Familienanamnese. Ausserdem zeigen 80% der kindlichen Asthmatiker in der Allergiediagnostik einen positiven Hauttest und/oder erhöhte Werte an spezifischem IgE<sup>19,20</sup>. Diese Sensibilisierung findet auf der Ebene der T-Lymphozyten statt<sup>15</sup>. Immunologisch finden sich beim extrinsischen-atopischen Asthma passagere, mit der Allergenexposition zeitlich im Zusammenhang stehende aktivierte Lymphozyten<sup>21</sup>. Diese T-Lymphozyten sowie T-Helferzell-assoziierte Zytokine in den Atemwegen kindlicher Asthmatiker steigern die Synthese allergenspezifischer Immunglobuline und fördern die bronchiale Entzündung. (Abbildung 1)



**Abbildung 1: Pathomechanismen des Asthma bronchiale.** Diese Grafik zeigt, welche Faktoren einen Asthmaanfall auslösen können und welche Pathomechanismen einem Anfall zugrunde liegen. (in veränderter Form aus Asthmaformen und Auslöser; <http://www.medizininfo.de/allergie/images/asthma.jpg>)

## 1.2 Asthma bronchiale - Ein Ungleichgewicht der T-Helferzell-Differenzierung

Das atopische Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegserkrankung, an der zahlreiche Zellen wie Mastzellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Epithelzellen, aber vor allem T-Lymphozyten beteiligt sind<sup>9</sup>. Durch die Interaktion zwischen Allergenen, antigenpräsentierenden Zellen und naiven T-Lymphozyten kommt es zur Aktivierung und Differenzierung dieser Lymphozyten zu sogenannten T-Helferzellen (Th-Zellen) vom Typ 1 (Th<sub>1</sub>) oder Typ 2 (Th<sub>2</sub>). Heute geht man davon aus<sup>22</sup>, dass bei Asthmatikern ein Ungleichgewicht innerhalb der T-Helferzellen besteht: Es überwiegen die Th<sub>2</sub>-Zellen, bei einer gleichzeitig abgeschwächten Immunreaktion der Th<sub>1</sub>-Zellen.

Bei der Differenzierung der naiven T-Lymphozyten zu T-Helferzellen spielen Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle. Der Schlüsseltranskriptionsfaktor der Th<sub>2</sub>-

Differenzierung ist GATA-3 (GATA binding protein-3), der die Zytokinexpression in Th<sub>2</sub>-Zellen stimuliert. Durch das resultierende spezifische Zytokinmuster werden B-Lymphozyten aktiviert, die zu Plasmazellen ausreifen und Immunglobulin E (IgE-Antikörper) freisetzen. Auf diesem Weg wird eine allergische Reaktion aktiviert.

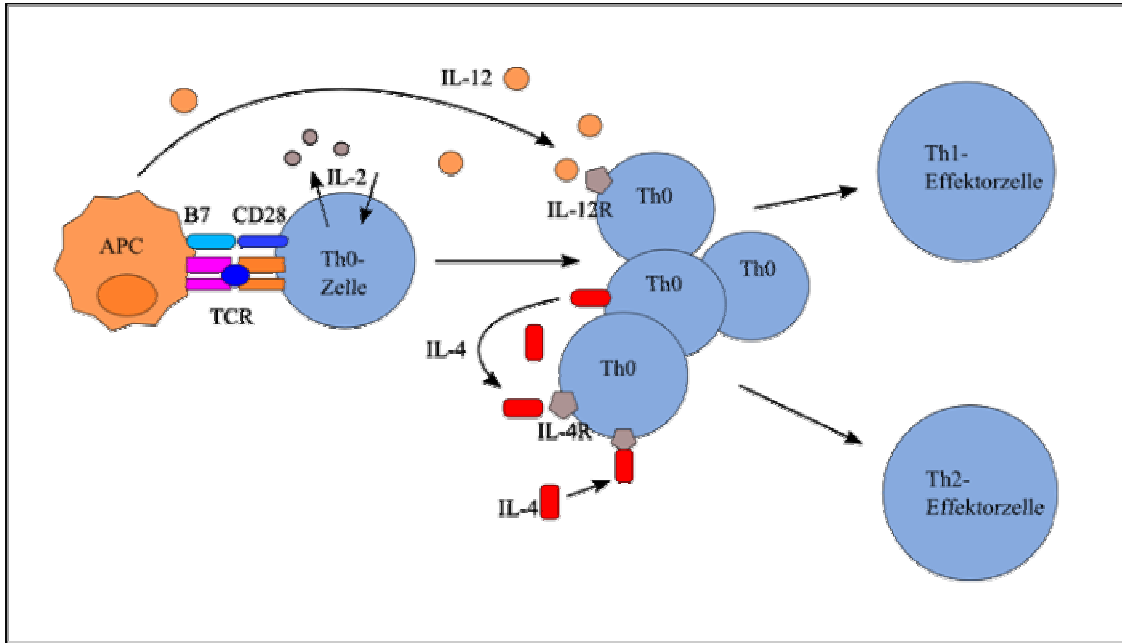
Bei Ausbildung einer chronischen Entzündung kommt es zur Differenzierung der T-Lymphozyten zu Th<sub>1</sub>-Zellen. Hierbei sind T-bet (T-box expressed in T cells) und HLX1 (H2.0-Like Homeobox 1) die wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die die Expression Th<sub>1</sub>-spezifischer Zytokine regulieren. Abhängig davon werden Makrophagen aktiviert, die eine Entzündungsreaktion starten. Besteht ein Ungleichgewicht zwischen Th<sub>1</sub>- (zu wenig) und Th<sub>2</sub>-Zellen (zu viel) bildet sich eine allergische Reaktion aus, auf deren Grundlage Asthma entstehen kann.

### 1.2.1 Die T-Zellaktivierung

Die zelluläre Immunantwort gegen Allergene wird durch die Aktivierung von naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen initiiert<sup>23</sup>. Naive Lymphozyten sind nicht fähig, Effektorfunktionen auszuüben, die zur Beseitigung des Krankheitserregers führen. Dafür müssen sie aktiviert werden und sich zu Effektorzellen ausdifferenzieren.

Unreife Th<sub>0</sub>-Zellen (naive CD4<sup>+</sup>-Zellen) erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) und spezielle Corezeptoren (z.B. Integrine (LFA-1) zusammen mit einem Liganden (ICAM-1)) die entsprechenden, infizierten Zellen. CD4<sup>+</sup>-Zellen interagieren dabei mit dem MHC-II-Komplex (major histocompatibility complex) auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC). APC werden zu den dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen gezählt, die vor allem in epitheliale Gewebe zu finden sind.

Über den MHC-II-Komplex präsentieren sie naiven T-Zellen vorwiegend exogene Antigene (z.B. Allergene)<sup>23</sup>. Nachdem die T-Zellen das Antigen erkannt haben, kommt es durch spezifische Adhäsionsmoleküle und costimulierende Moleküle zur Aktivierung der naiven T-Zellen, wobei zwei Signale essentiell sind: Das erste Signal kommt durch die Bindung von Antigen an den TCR-Komplex; das zweite Signal ist gegeben, wenn T-Zellen die costimulierenden Moleküle (z.B. B7.1 (CD80)- und die B7.2 (CD86) -Proteine) auf APC erkennen und eine Bindung eingehen. Nach Antigenkontakt sezernieren naive T-Zellen das Zytokin Interleukin-2 (IL-2), das durch eine autokrine Bindung an einen IL-2-Rezeptor (IL-2R) zu einer ausgeprägten Proliferation der T-Zellen führt, die man auch klonale Expansion nennt. Die expandierten Klone sind in der Regel spezifisch für einige wenige immundominante Peptide des Erregers. Antigen-stimulierte proliferierende T-Zellen beginnen zu Effektorzellen zu differenzieren, um den Erreger eliminieren zu können. Dabei induzieren T-Helfer-Zellen über Zytokine entweder organspezifische entzündliche Immunantworten (Th<sub>1</sub>-Antwort) oder sie bremsen diese Reaktionen und stimulieren stattdessen die IgE-Produktion in B-Lymphozyten (Th<sub>2</sub>-Antwort).



**Abbildung 2: Die T-Helferzell-Differenzierung.** Die Entwicklung naiver  $CD4^+$ -Zellen ( $Th_0$ -Zellen) wird durch Zytokine gesteuert: Nach Aktivierung der T-Zellen durch Antigenerkennung und Costimulation kommt es unter dem Einfluss von IL-12 zur Ausdifferenzierung von  $Th_1$ -Zellen. IL-12 wird von aktivierten APC (Makrophagen oder dendritischen Zellen) freigesetzt. Ist kein IL-12 vorhanden, produzieren T-Zellen IL-4, welches die Ausdifferenzierung der Zellen zu  $Th_2$ -Effektorzellen steuert. (aus Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe, Angelika Vollmer und Theodor Dingermann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart)

Ein wichtiger Faktor, der die Differenzierung von  $CD4^+$ -T-Zellen beeinflusst, ist die Dichte der präsentierenden Liganden und die Menge des Antigens, das von den APC präsentiert wird, wodurch die  $CD4^+$ -Zellen ihren funktionellen Phänotyp festlegen.  $CD4^+$ -Zellen, denen Liganden und damit Antigen in geringer Dichte präsentiert wird, entwickeln sich bevorzugt zu  $Th_2$ -Zellen, die dann wiederum IL-4/ IL-13 freisetzen und B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen<sup>24-26</sup>. Liegen Liganden dagegen in hoher Dichte vor, so differenzieren sie zu  $Th_1$ -Zellen, die IL-2 und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) ausschütten und Makrophagen aktivieren.

Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Allergien: Antigene, die eine IgE-vermittelte Allergie hervorrufen, liegen meist in verschwindend kleinen Mengen vor und fördern somit die Entstehung von  $Th_2$ -Zellen, die IL-4, jedoch kein INF- $\gamma$  freisetzen. In



Gegenwart von  $\text{INF-}\gamma$  findet keine IgE-Produktion statt, da dieses Zytokin ein wirksamer Inhibitor des IL-4-abhängigen Klassenwechsels zu IgE ist.

### 1.2.2 Die $\text{Th}_1$ -Zell-Differenzierung und ihre wichtigsten Transkriptionsfaktoren

Die Differenzierung naiver T-Zellen zu  $\text{Th}_1$ -Zellen, die vor intrazellulären Erregern schützen sollen, erfolgt nicht zufällig<sup>23</sup>. Die aktivierten  $\text{CD4}^+$ -Zellen werden von Zytokinen stimuliert, die sie aus ihrer Umgebung empfangen, sobald Antigen präsentiert wurde.  $\text{Th}_0$ -Zellen, die dem Einfluss von IL-12 ausgesetzt sind, differenzieren zu  $\text{Th}_1$ -Zellen. Antigenpräsentierende Zellen sezernieren IL-12, als eine Reaktion auf die Aufnahme von Antigen. Bleibt jedoch die Produktion von IL-12 aus, so entwickeln sich unter dem Einfluß von IL-4  $\text{Th}_2$ -Zellen.

Durch die Bindung von IL-12 an einem speziellen IL-12-Rezeptor ( $\text{IL-12R}\beta 2$ ) auf naiven T-Zellen, kommt es durch eine veränderte Genexpression zur Einleitung der T-Zelldifferenzierung. Durch IL-12 wird über STAT-4 (signal of transducer and activator of transcription) die Expression des  $\text{Th}_1$ -spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet (T-box expressed in T-cells) aktiviert. T-bet ist ein „master regulator“ der  $\text{Th}_1$ -Differenzierung<sup>27</sup>. Zum einen hemmt T-bet die Expression  $\text{Th}_2$ -spezifischer Zytokine, wie IL-4 (indirekt GATA-3), und unterdrückt dadurch eine Differenzierung der  $\text{Th}_0$ -Zellen zu  $\text{Th}_2$ -Zellen. Zum anderen wird durch die vermehrte Expression von T-bet die  $\text{Th}_1$ -Zelle zur Sekretion von  $\text{INF-}\gamma$  angeregt.

Dafür induziert T-bet selbst die Expression eines weiteren wichtigen  $\text{Th}_1$ -spezifischen Transkriptionsfaktors, dem homeobox Transkriptionsfaktor HLX1<sup>28</sup>. Nur durch die Interaktion von T-bet mit HLX1 kommt es in der  $\text{Th}_1$ -Zelle zu einer maximalen  $\text{INF-}\gamma$ -Produktion. Dies spielt eine bedeutende Rolle in der weiteren  $\text{Th}_1$ -Differenzierung und

Aufrechterhaltung der Identität der Zelle.  $\text{IFN-}\gamma$  reguliert die IL-4-Synthese der  $\text{Th}_2$ -Zellen herunter, hemmt die  $\text{Th}_2$ -Zelldifferenzierung und hält andererseits die  $\text{Th}_1$ -Identität aufrecht. Außerdem werden Makrophagen aktiviert, die die eigentlichen Effektormechanismen ausführen: Beseitigung des Erregers und Amplifikation der Immunantwort. Aktivierte Makrophagen sezernieren zum einen proinflammatorische Zytokine, wie IL-2, IL-15, Lymphotoxin $\alpha$  und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die für die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen wichtig sind. Zum anderen werden IL-12 und  $\text{IFN-}\gamma$  ausgeschüttet, die wiederum, über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Bereitstellung von  $\text{Th}_1$ -Zellen sichern.

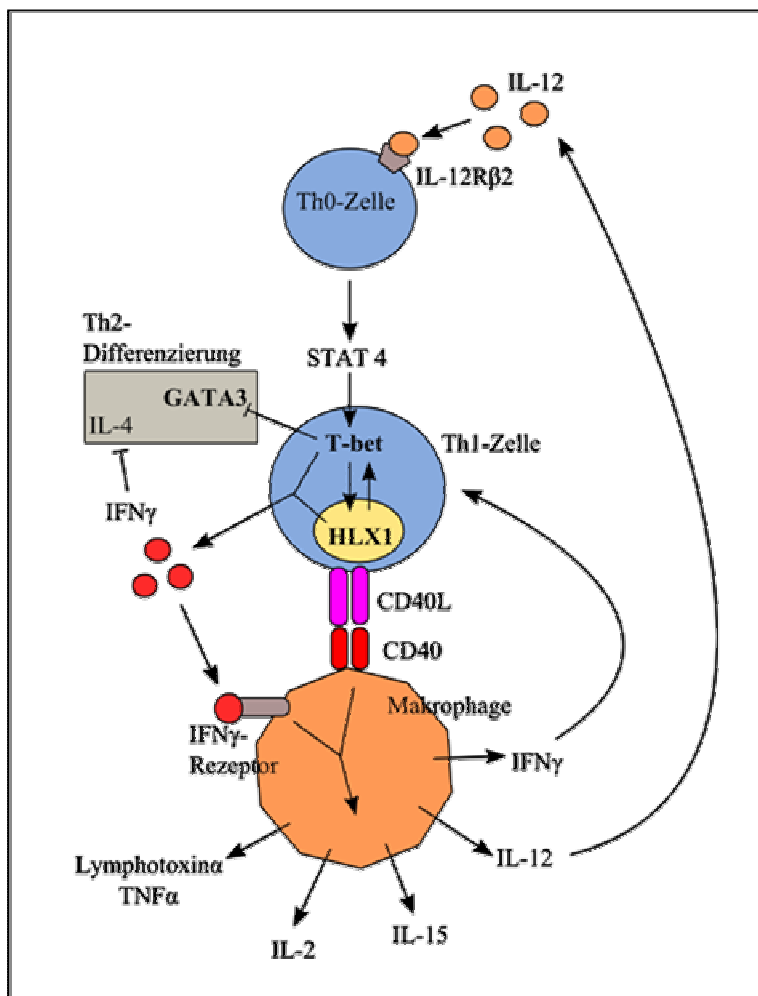


Abbildung 3: Die  $\text{Th}_1$ -Zelldifferenzierung. Durch die Bindung von IL-12 an einen speziellen IL-12-Rezeptor ( $\text{IL-12R}\beta 2$ ) auf naiven T-Zellen kommt es über STAT4 zur Expression des  $\text{Th}_1$ -spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet. T-bet interagiert mit HLX1 und initiiert dadurch eine optimale  $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion. Durch die Costimulation von CD40-L und  $\text{IFN-}\gamma$  werden die Makrophagen aktiviert. Diese sezernieren zum einen pro-inflammatorische Zytokine, die für die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen wichtig sind. Zum anderen IL-12 und  $\text{IFN-}\gamma$ , die wiederum über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Bereitstellung von  $\text{Th}_1$ -Zellen sichern.

1.2.2.1 Der Einfluss des Transkriptionsfaktors T-bet auf die Th<sub>1</sub>-Zelldifferenzierung

Bereits Mitte der 90er Jahre identifizierte L. Glimcher<sup>29</sup> T-bet, einen Transkriptionsfaktor der T-box-Familie. Sie fand heraus, dass T-bet nur in Th<sub>1</sub>-, aber nicht in Th<sub>2</sub>-Zellen exprimiert wird. Damit identifizierte sich T-bet als ein überaus wichtiger Th<sub>1</sub>-spezifischer Transkriptionsfaktor. Die Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion und die gleichzeitige Hemmung der Expression Th<sub>2</sub>-assoziierter Zytokine (IL-4) und Transkriptionfaktoren (GATA-3) sind die wichtigsten Funktionen von T-bet.

Es besteht der Verdacht, dass die Expression von T-bet durch den TCR und die IFN- $\gamma$ R/STAT1-Signalkaskade reguliert wird<sup>30,31</sup>: Über einen positiven Rückkopplungsmechanismus, der Signale von IFN- $\gamma$ R (über STAT1) beinhaltet, wird eine T-bet-Expression in reifenden Th<sub>1</sub>-Zellen aufrechterhalten. T-bet selbst induziert anschließend eine hohe IL-12R $\beta$ 2-Expression<sup>31,32</sup>, die wiederum über die IL-12-/STAT4-Signalkaskade eine optimale IFN- $\gamma$ -Produktion begünstigt und damit die Th<sub>1</sub>-Zell-Differenzierung komplettiert. Es wird vermutet, dass die optimale Produktion von IFN- $\gamma$  von Th<sub>1</sub>-Zellen einen Schutz vor allergischen Reaktionen bietet, da durch IFN- $\gamma$  gleichzeitig die Aktivität der Th<sub>2</sub>-Zellen gehemmt<sup>33</sup> und die Identität der Th<sub>1</sub>-Zelle aufrechterhalten wird.

Mullen *et al.*<sup>28</sup> untersuchte 2002 in einer umfassenden Studie den Transkriptionsfaktor T-bet in Hinblick auf die Fähigkeit zur Autoinduktion, Chromatin Umstrukturierung des IFN- $\gamma$ -Lokus und der Induktion jener Gene, die den IL-12R $\beta$ 2 kodieren. Diese Untersuchung ergab, dass eine stetige T-bet Aktivität für die Erhaltung der Th<sub>1</sub>-spezifischen Genexpression erforderlich ist sowie für die Chromatin Umstrukturierung des IFN- $\gamma$  in den reifenden Th<sub>1</sub>-Zellen. Durch diese Initiierung zur Umstrukturierung während der ersten Zellteilung wird eine angemessene IFN- $\gamma$  Produktion hervorgerufen, was wiederum, wie bereits erwähnt, nur durch

die enge Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor HLX1 erreicht werden kann. Allerdings erscheint die T-bet-Aktivität nur während der Entwicklung der Th<sub>1</sub>-Zelle essentiell zu sein. Der neu geformte IFN- $\gamma$ -Lokus wird in ausgereiften Th<sub>1</sub>-Zellen T-bet-unabhängig.

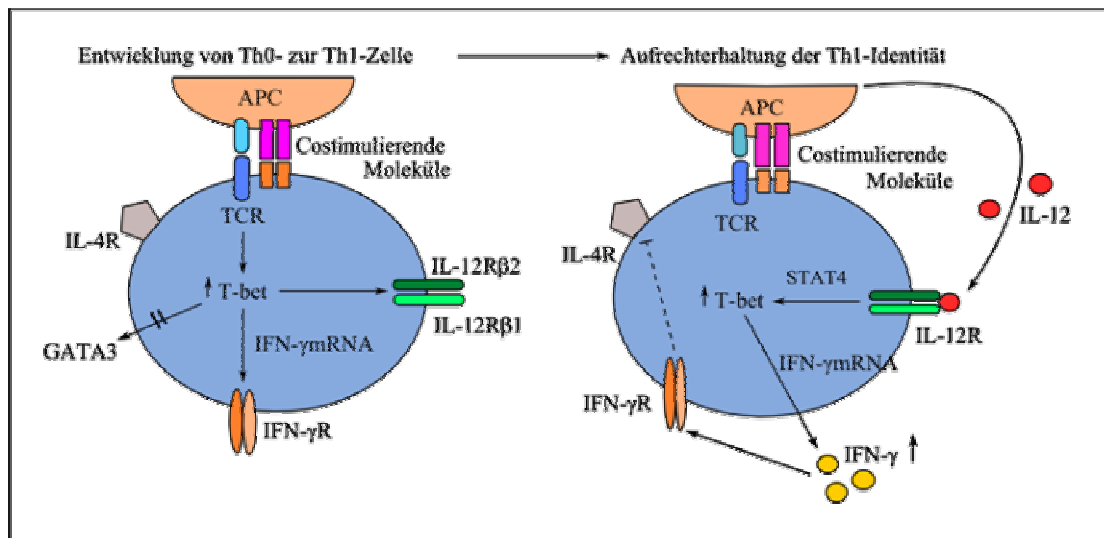


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Funktionen von T-bet. Links: Durch Kontakt zum T-Zell-Rezeptor und Aktivierung von T-bet beginnt die Entwicklung von der Th<sub>0</sub>- zur Th<sub>1</sub>-Zelle. T-bet erhöht seine Auto-Induktion, die IL-12R $\beta$ 2-Induktion und die erste Umstrukturierung des IFN- $\gamma$ -Lokus. Die GATA-3 Expression wird unterdrückt. Rechts: Die aktivierte CD4<sup>+</sup>-Zelle produziert IFN- $\gamma$ , jedoch nicht IL-4. Dadurch kommt es zu einer weiteren Steigerung der T-bet-Expression über eine STAT-1-Aktivierung, was zu einer Hochregulierung des IL-12R $\beta$ 2 und Beendigung der IL-4 Signaltransduktion führt. Das von APC produzierte IL-12 hält die T-bet- und IFN- $\gamma$ -Expression über eine STAT-4-Aktivierung aufrecht (Ariga *et al.*, 2007<sup>27</sup>).

T-bet spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Th<sub>1</sub>-Identität, durch die Expression von IL-12R $\beta$ 2 in ausgereiften Zellen und nachkommenden Zellreihen. So scheint die Erhaltung der Th<sub>1</sub>-Identität T-bet-abhängig zu bleiben (IL-12R $\beta$ 2), während die Funktion der Th<sub>1</sub>-Zelle, nämlich die Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , T-bet-unabhängig wird.

Glimcher *et al.*<sup>29</sup> transfizierte zudem differenzierte T-Zellen mit T-bet-kodierenden Retroviren, die anschließend eine hohe IFN- $\gamma$ -Produktion und eine Ausschaltung der IL-2-Produktion durch eine Stilllegung der Expression jener Gene, die die Th<sub>2</sub>-spezifischen Zytokine kodieren, zeigten. Durch diese Methode konnte nachgewiesen werden, dass T-bet

außerdem in der Lage ist, ausdifferenzierte Th<sub>2</sub>-Zellen zu Th<sub>1</sub>-Zellen zu repolarisieren. Diese Funktion konnte *in vivo* an Mausmodellen bestätigt werden und lässt damit auch einen Zusammenhang von T-bet mit humanen Krankheiten vermuten. Und tatsächlich zeigte sich, dass T-bet erforderlich ist bei der Bekämpfung von Pathogenen<sup>34,35</sup> und Tumorzellen<sup>36</sup>, und an der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen<sup>37-39</sup> beteiligt ist. Außerdem spielt T-bet eine protektive Rolle bei asthmatischen Erkrankungen<sup>40</sup>.

Bereits während den letzten 20 Jahren konnte durch *in vitro* und *in vivo* Experimente gezeigt werden, dass sich die Th<sub>1</sub>- und die Th<sub>2</sub>-Immunreaktionen gegenseitig regulieren. Diesen Prozess bezeichnet man als „re-direction“ oder „immune deviation“. IL-12, IL-18, IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  fördern nicht nur die Entwicklung der Th<sub>1</sub>-Zellen, sondern inhibieren zusätzlich die Entwicklung von Th<sub>2</sub>-Zellen<sup>41-46</sup>. Genauso fördert die Anwesenheit von IL-4 die Entwicklung von Th<sub>2</sub>-Zellen und hemmt gleichzeitig die Entwicklung von Th<sub>1</sub>-Zellen.

Auch die T-Helferzellen-spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 scheinen gegenseitig den Prozess der Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Polarisation zu regulieren, indem sie die Entwicklung des entgegengesetzten Th-Zelltyps unterdrücken<sup>47</sup>. Anfangs wurde angenommen, dass die Differenzierung zur Th<sub>1</sub>- oder zur Th<sub>2</sub>-Zelle ein irreversibler Prozess ist<sup>48,49</sup>. Jedoch konnte beobachtet werden, dass verschiedene Bakterien, bakterielle Produkte, aber auch synthetische Adjuvantien, die die Produktion von IL-12 und/oder IFNs und damit die Immunabwehr in Zellen initiieren können, in der Lage sind, die Verschiebung von Th<sub>2</sub>-Zellen zu Th<sub>0</sub>- oder sogar Th<sub>1</sub>-Zellen zu fördern<sup>50-63</sup>. Auch wird angenommen, dass T-bet bereits polarisierte Th<sub>2</sub>-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion aktivieren kann, vergleichbar in Th<sub>1</sub>-Zellen<sup>28,64</sup>.

### 1.2.2.2 HLX1 (H2.0-Like Homeobox 1) interagiert mit T-bet

Neuere Untersuchungen zeigen, dass das humane HLX1, das auf Chromosom 1q41-q42 (6kb) lokalisiert ist, in engem Zusammenhang mit dem Th<sub>1</sub>-spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet steht und an der Differenzierung von Th<sub>1</sub>-Zellen beteiligt ist. HLX1 identifizierte sich damit als ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor der Th<sub>1</sub>-Differenzierung.

Das HLX1-Gen ist bislang sehr wenig erforscht, und es sind nur wenige Veröffentlichungen über die Funktion von HLX1 bekannt. Der homeobox Transkriptionsfaktor HLX1 wurde ursprünglich aus einer prä-B-Lymphozyten-Zelllinie der Maus isoliert<sup>65</sup>. Die HLX1-Proteine der Maus und des Menschen sind sich sehr ähnlich und ihre Homeodomänen sind bis zu 100% identisch<sup>66</sup>. In erwachsenen Mäusen konnte eine HLX1 Expression in grossen Mengen vor allem in Lunge, Herz, Skelettmuskel und hämatopoetischen Geweben und -Zellen nachgewiesen werden. In kleineren Mengen in Leber, Uterus, Ovarien und Spuren von HLX1 im Magen, Gehirn, Nieren und Hoden. In Mausembryonen hingegen zeigte sich durch *in situ* Hybridisierung HLX1 deutlich auffallend im mesenchymalen Gewebe der Leber, Gallenblase und im Darmtrakt<sup>67</sup>.

Mullen, A.C. *et al.*<sup>28</sup> untersuchte die Interaktion von T-bet und HLX1 und die Auswirkungen auf die daraus resultierende IFN- $\gamma$ -Produktion. Es konnte in naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen, welche durch ein Th<sub>1</sub>-spezifisches Milieu stimuliert wurden, eine hohe, aber verzögerte Expression an HLX1 gefunden werden, wobei die Induktion erst nach dem zweiten Zellzyklus aufzutreten scheint. HLX1 wird sowohl in reifenden als auch in bereits ausgereiften Th<sub>1</sub>-Zellen exprimiert und stellt somit ebenfalls einen Th<sub>1</sub>-spezifischen Transkriptionsfaktor dar. Eine HLX1- Expression konnte aber nicht nur in Th<sub>1</sub>-Zellen beobachtet werden, sondern auch

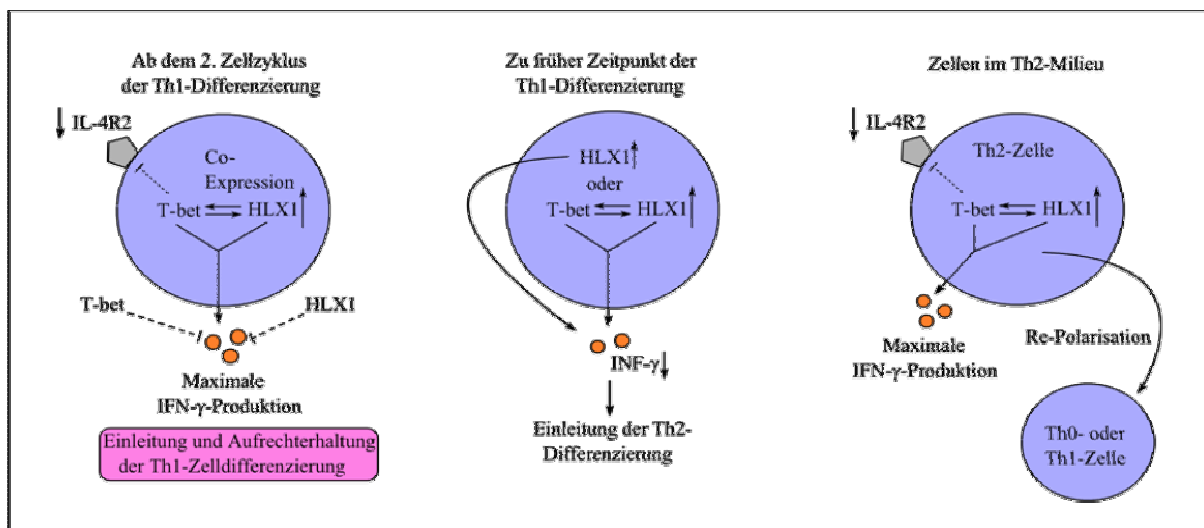
in anderen lymphatischen Zelllinien, wie CD8<sup>+</sup>-Zellen, natürlichen Killer-Zellen und B-Lymphozyten.

Wie die Interaktion zwischen T-bet und HLX1 genau funktioniert, ist noch nicht ausreichend untersucht. Allerdings zeigte die Arbeitsgruppe um Mullen, dass T-bet die Expression von HLX1 selbst induziert und nur in Kooperation mit HLX1 in der Lage ist, eine maximale IFN- $\gamma$ -Freisetzung hervorzurufen. Eine isolierte Expression von HLX1 zeigte keine adäquate IFN- $\gamma$ -Expression und auch bei einer isolierten T-bet-Expression konnte nur eine minimale IFN- $\gamma$ -Expression beobachtet werden. Die Kombination von T-bet und HLX1 kann in Th<sub>2</sub>-Zellen eine IFN- $\gamma$ -Expression initiieren, die der von Th<sub>1</sub>-Zellen ähnlich ist. Daraus folgt, dass HLX1 die T-bet induzierte IFN- $\gamma$ -Expression über eine sogenannte Co-Expression maximiert und indirekt die IFN- $\gamma$ -Produktion verstärkt, noch bevor eine eventuelle Unabhängigkeit von T-bet in der Zelldifferenzierung eintritt. Wie bereits erwähnt, unterdrücken HLX1 und T-bet gemeinsam die Ausreifung der Th<sub>2</sub>-Zelllinie, indem sie die Expression von IL-4R $\alpha$  nach unten regulieren und können damit ausgereifte Th<sub>2</sub>-Zellen zu Th<sub>0</sub>- oder sogar Th<sub>1</sub>-Zellen repolarisieren.

Eine jüngere Studie von Zheng W. *et al.*<sup>68</sup> untersuchte die HLX1-Expression im zeitlichen Verlauf der Th<sub>1</sub>-Differenzierung und die Induktion von IFN- $\gamma$  durch HLX1 in unreifen Th-Zellen. Auch Zheng konnte eine hohe HLX1-Expression in Th<sub>1</sub>-Zellen nachweisen. Zusätzlich beobachteten sie einen kinetischen Verlauf der HLX1-Expression während der Zelldifferenzierung, der aus drei Phasen bestand: Eine konstant zunehmende Expression in naiven CD4<sup>+</sup>-Zellen, eine anfängliche Herunterregulation während der Th<sub>1</sub>-/Th<sub>2</sub>-Differenzierung und eine Hochregulation während der Reifung zur Th<sub>1</sub>-Zelle. Im Gegensatz zu der Studie von Mullen konnte Zheng zeigen, dass die Expression von HLX1 alleine

ausreicht, um eine IFN- $\gamma$ -Expression hervorzurufen. Allerdings nur, wenn HLX1 zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Zelldifferenzierung überexprimiert wird und in Abhängigkeit von dem natürlichen Verlauf der Hochregulation während der Th<sub>1</sub>-Differenzierung.

Zudem konnte Folgendes beobachtet werden: Wenn es zu einer Überexpression von HLX1 zu einem zu frühen Zeitpunkt im natürlichen Verlauf der Hochregulation kommt, findet zwar eine IFN- $\gamma$ -Induktion statt, die CD4<sup>+</sup>-Zellen unterziehen sich allerdings einer Th<sub>2</sub>-Differenzierung. Es scheint, dass während der frühen Th-Zelldifferenzierung ein Zeitfenster besteht, in dem HLX1 eine IFN- $\gamma$ -Expression hervorrufen kann. Diese Studie zeigt die Wichtigkeit einer frühen und rechtzeitigen HLX1-Expression für eine optimale Induktion der IFN- $\gamma$ -Expression in CD4<sup>+</sup>-Zellen.



**Abbildung 5: Grafische Darstellung der HLX1-Funktionen.** Links: Durch eine Co-Expression von HLX1 mit T-bet kommt es in der frühen Phase der Th<sub>1</sub>-Zelldifferenzierung zu einer maximalen IFN- $\gamma$ -Produktion und somit zur Einleitung und anschließend zur Aufrechterhaltung der Th<sub>1</sub>-Differenzierung. Eine isolierte T-bet- oder HLX1-Expression führt zu keiner optimalen IFN- $\gamma$ -Produktion. Die Th<sub>2</sub>-Differenzierung wird durch Reduktion der IL-4R2-Expression gehemmt. Mitte: Kommt es in einer zu frühen Phase der Th<sub>1</sub>-Differenzierung zu einer Überexpression von HLX1 (allein oder in Kombination mit T-bet), wird vermindert IFN- $\gamma$  ausgeschüttet und eine Th<sub>2</sub>-Differenzierung wird eingeleitet. Rechts: Durch Co-Expression von HLX1 mit T-bet können Zellen im Th<sub>2</sub>-Milieu durch maximale IFN- $\gamma$ -Produktion in Th<sub>0</sub>- oder Th<sub>1</sub>-Zellen repolarisiert werden.



Diese Untersuchungen der Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Differenzierung identifizierten den homeobox Transkriptionsfaktor HLX1 als einen wichtigen Regulator der Th<sub>1</sub>-Differenzierung. Aufgrund des starken Einflusses von HLX1 auf T-bet besteht die Wahrscheinlichkeit, dass genetische Variationen im HLX1-Gen das Gleichgewicht der Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Differenzierung beeinflussen und die Ausbildung eines Asthmas bronchiale initiieren können.

### 1.2.3 Die Rolle der Th<sub>2</sub>-Zell-Differenzierung bei der Entstehung von Asthma

Bleibt der Kontakt der naiven T-Zelle zu IL-12 aus, wird durch die Anwesenheit von IL-4 die Th<sub>2</sub>-Zelldifferenzierung eingeleitet. Nach einem erneuten Antigenkontakt wird unter dem Einfluss von STAT-6 (signal transducer and activator of transcription) die Aktivität des Th<sub>2</sub>-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA-3 angeregt. GATA-3 ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor der Th<sub>2</sub>-Differenzierung. Er steuert die Produktion der spezifischen B-Zell-Zytokine IL-4 und IL-13, indem er die Umstrukturierung des IL-4-Chromatinlokus induziert und dadurch die IL-4-Expression steigert. Ausserdem bindet GATA-3 an der Promotorregion der IL-5 und IL-13-Gene und reguliert direkt die mRNA-Produktion von IL-5 und IL-13<sup>69</sup>.

IL-4 und IL-13 binden nach Expression an ihre Rezeptoren (IL-4R/IL-13R), die sich in der Zellmembran der B-Lymphozyten befinden. Über so genannte Janus-Thyrosin-Kinasen (JAK) JAK1 und JAK3 wird das Signal von IL-4 an das intrazelluläre STAT-6 weitergeleitet, das den Isotypenswitch zu IgE im Zellkern initiiert<sup>70</sup>. Freigesetztes IgE wird an spezifischen Rezeptoren an der Oberfläche von Mastzellen gebunden. Die Vernetzung zweier benachbarter IgE-Aggregate führt zur Aktivierung der Zelle und zur Freisetzung spezieller Mediatoren. Dazu gehören an Proteoglykan gebundenes Histamin, Bradykinin und eine Reihe verschiedener Enzyme, wie Tryptase, Hydrolase und Metalloproteinasen<sup>21</sup>. Daneben

synthetisieren Mastzellen nach Aktivierung verschiedene Lipidmediatoren, zu denen das Prostaglandin D<sub>2</sub>, das Thromboxan A<sub>2</sub>, Leukotrien B<sub>4</sub> und C<sub>4</sub> sowie der Plättchenfaktor (PAF) gehören.

IL-13 dagegen hemmt die proinflammatorische Zytokinproduktion von Makrophagen und wirkt organ- und zellspezifisch vor allem auf die glatte Muskulatur, Endothelzellen und Fibroblasten der Atemwege und ist damit mitverantwortlich für die Entstehung einer bronchialen Hyperreagibilität<sup>71-73</sup>.

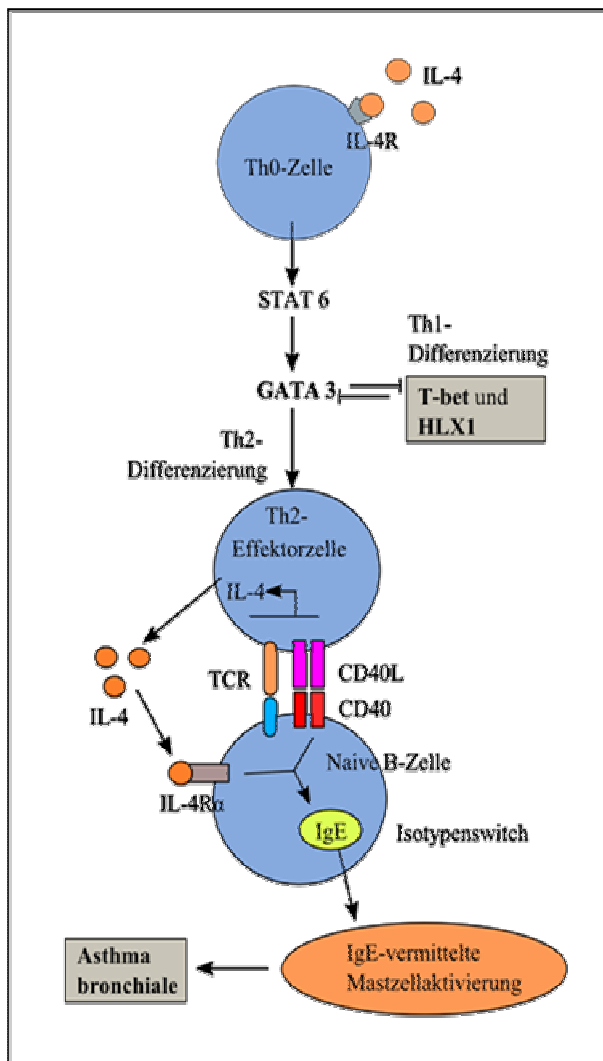


Abbildung 6: Die Th<sub>2</sub>-Zelldifferenzierung. Durch den Einfluss von IL-4 kommt es durch STAT-6 zur Aktivierung von GATA-3. GATA-3 leitet die Differenzierung zur Th<sub>2</sub>-Zelle ein und unterdrückt gleichzeitig die Differenzierung der Th<sub>1</sub>-Zellen. Nach einem erneuten Antigenkontakt sezernieren Th<sub>2</sub>-Zellen die Zellwachstumsfaktoren IL-4 und IL-13. Durch Bindung von IL-4 an einen spezifischen Rezeptor (IL-4R $\alpha$ ) wird in naiven B-Zellen der Isotypenswitch zu IgE initiiert.

Durch die Th<sub>2</sub>-Kaskade führt ein Allergenkontakt bei Asthmapatienten zu einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I und symptomatisch zu einem entzündlichen Ödem der Bronchialwand, einer Vasodilatation und einer gesteigerten Gefäßpermeabilität. Neben einer verdickten Basalmembran und einer Hypertrophie der Bronchialdrüsen, die gemeinsam mit den vermehrt auftretenden Becherzellen große Mengen eines zähen Sekrets sezernieren (Hyper- und Dyskrinie), findet sich als ein weiteres histomorphologisches Merkmal ein Epithelschaden mit entsprechender Störung der mukoziliären Clearance.

Während Zytokine und auch Chemokine die Zelldifferenzierung von Th<sub>1</sub>-/Th<sub>2</sub>-Zellen zu einem weniger differenzierten oder sogar entgegengesetzten Phänotyp verändern können, werden zusätzlich beide Zelltypen von einer heterogenen Zellfamilie reguliert, den so genannten regulatorischen T-Zellen (Tregs)<sup>74</sup>, die als eine weitere funktionelle Klasse von T-Zellen identifiziert wurden. Sie sind CD4<sup>+</sup>-positiv und tragen zusätzlich CD25 als Oberflächenmarker. Treg-Zellen spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen. Ein Ungleichgewicht zwischen beiden Th-Zelltypen kann somit zur Ausbildung von Krankheiten führen. So prädisponiert ein Überwiegen von Th<sub>1</sub>-Zellen zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen, Sarkoidose oder Morbus Crohn, wohingegen ein Überwiegen von Th<sub>2</sub>-Zellen zu Allergien und damit zu Asthma und einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel führen kann<sup>75-77</sup>.

### 1.3 Gene und Umwelt tragen zur Entstehung atopischer Erkrankungen bei

Die klinische Manifestation allergischer Erkrankungen ist sehr komplex und die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind bislang noch nicht alle bekannt. Es besteht mittlerweile jedoch kein Zweifel mehr, dass an der Expression von Allergien, sowohl Umwelteinflüsse als auch eine genetische Prädisposition beteiligt sind. Andererseits kann angenommen werden,

dass bestimmte Umweltfaktoren und genetische Veränderungen ein Ungleichgewicht der T-Helferzellendifferenzierung zugunsten der Th<sub>1</sub>-Antwort hervorrufen könnten, welche das Risiko der Entstehung eines allergischen Asthmas bronchiale senkt oder sich sogar protektiv auf die Entstehung auswirkt.

### 1.3.1 Die Einflüsse von bestimmten Umweltfaktoren

In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz atopischer Erkrankungen in der westlichen Welt viel höher ist im Vergleich zu Entwicklungsländern. In den letzten Jahrzehnten war eine drastische Zunahme von atopischen Erkrankungen in industrialisierten Ländern zu vermerken. So stieg die Inzidenz von infantilem Asthma z.B. in den Vereinigten Staaten von 3,9% im Jahr 1980 auf 5,8% im Jahr 2003<sup>78</sup>. Zudem konnten Unterschiede im Auftreten von Asthma zwischen verschiedenen Populationen und verschiedenen Ländern festgestellt werden. Steigt die Prävalenz in einigen europäischen und asiatischen Ländern stetig an, berichten andere Länder von einer Stagnation oder sogar einer leichten Abnahme<sup>78</sup>.

In einer deutschen Studie zeigte sich, dass bei Kindern aus Westdeutschland (München) eine höhere Prävalenz von Asthma (6,0%) besteht im Vergleich zu Kindern aus Ostdeutschland (Dresden) mit 4,3%<sup>79</sup>. Kinder aus Dresden waren, im Gegensatz zu den Kindern aus München, in ihrem früheren Leben mehr infektiösen Reizen ausgesetzt. Dies führte vermutlich zu einer Stimulation des Immunsystems und zur Ausbildung einer Toleranz gegen bestimmte Allergene<sup>80</sup>.

Verschiedene andere Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von atopischen Erkrankungen und der Exposition spezifischer Stimuli, welche in einer

bäuerlichen Umgebung gegeben sind. Die Daten zeigten, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen, eine signifikante Abnahme des Risikos zur Ausbildung einer Atopie und Heuschnupfen aufwiesen<sup>81-83</sup>. Diese Ergebnisse konnten bei Kindern, die zwar in einer ländlichen Umgebung, jedoch nicht auf einem Bauernhof aufwachsen, nicht bestätigt werden. Somit vermeiden wohl spezielle Faktoren, die auf einem Bauernhof gegeben sind, die Entwicklung von Asthma und atopischer Sensibilisierung.

Zudem wurde untersucht, welcher Zusammenhang zwischen bestimmten Umweltfaktoren und genetischen Veränderungen besteht. Es wurde vermutet, dass eine genetische Prädisposition erst nachweisbar ist, wenn bestimmte Umweltfaktoren gegeben sind und dass beide Einflüsse bei der Entstehung von Asthma und Allergien eine Rolle spielen. Dies konnte an genetischen Variationen im Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2) und deren eventuelle Auswirkungen auf Asthma demonstriert werden. TLR2 ist wichtig für die Abwehr gegen bakterielle Zellwandbestandteile, so genannte Lipopolysaccharide (LPS)<sup>84</sup>. Wie bereits erwähnt, zeigen Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind, eine niedrigere Prävalenz, aufgrund eines frühzeitigen Kontakts mit Infektionserregern viraler, bakterieller und mykobakterieller Herkunft. Es wird vermutet, dass zum Beispiel Polymorphismen im TLR2 diesen Effekt beeinflussen können<sup>85</sup>.

### 1.3.2 Asthmagenetik

Neben den umweltbedingten Faktoren spielt, wie bereits erwähnt, eine genetische Prädisposition eine ausschlaggebende Rolle. Schon lange zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von Asthma in Familien (positive Familienanamnese). Zwillingsstudien belegten, dass die Erbllichkeit von Asthma bei monozygoten (teilen sich 100% des Erbgutes) Zwillingen zwischen 60 und 70% höher ist als bei dizygoten Zwillingen<sup>86</sup> (teilen sich 50% des Erbgutes).

Mittlerweile konnte bereits eine Anzahl von Kandidatengen, die für die Entwicklung von atopischen Erkrankungen verantwortlich sind, an mehreren Stellen des Genoms durch Kopplungsanalysen identifiziert werden. Eine Alternative dazu bietet die auf Hypothesen basierende Auswahl an Kandidatengen (Kandidatengenanalyse).

### 1.3.2.1 Methoden zur Identifikation asthmarelevanter Gene

Bis heute konnten schon einige Gene, die mit der Entstehung von allergischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, identifiziert werden. Die so genannten Kandidatengene werden dabei in der *Kandidatengenanalyse* systematisch auf vorhandene Mutationen untersucht<sup>87</sup>. Bei Mutationen handelt es sich meist um einen Basenaustausch an einer einzigen Position, welche im Genom ca. alle 1000bp vorkommen (SNP = single nucleotide polymorphism). Tritt eine solche Mutation mit einer Häufigkeit >3% auf, handelt es sich um einen Polymorphismus. Identifizierte Polymorphismen werden anschließend in einer großen Population von nicht-verwandten Probanden mittels Assoziationsstudien getestet. Bei einer signifikanten Häufung einer Mutation bei betroffenen Individuen, kann man davon ausgehen, dass das Gen und die Mutation an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind.

So wird in Assoziationsstudien geprüft, ob ein identifiziertes Allel eines Kandidatengens, mit dem dazugehörenden Phänotyp in der Probanden-Gruppe signifikant häufiger vorkommt als in der Kontrollpopulation. Der entscheidende Unterschied zwischen Kopplung und Assoziation besteht darin, dass die Kopplung eine Beziehung zu einem Locus und die Assoziation eine Beziehung zu einem spezifischen Allel darstellt. Eine signifikante Assoziation zwischen einem Polymorphismus und dem Phänotyp kann auf verschiedene Arten ausgelegt werden: Der Polymorphismus ist funktionell relevant und steht in Zusammenhang mit der Krankheitsursache, der Polymorphismus ist in einem

Kopplungsgleichgewicht (Linkage Disequilibrium) mit einem anderen krankheitsauslösenden Polymorphismus (der sich allerdings in einem anderen Locus befindet), oder die resultierende Assoziation entsteht aus einem falsch-positiven Ergebnis aufgrund einer zufälligen Akkumulation des untersuchten Polymorphismus innerhalb der Studienpopulation<sup>88</sup>. Da diese Methode auf Hypothesen basiert, ist ein tiefgreifendes Verständnis der beteiligten Mechanismen im Rahmen der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung von großer Bedeutung, um eine aussichtsreiche Auswahl an Kandidatengenomen treffen zu können.

### 1.3.2.2 Ergebnisse genetischer Analysen des GATA-3-Gens

Wie bereits beschrieben, ist GATA-3 der Schlüsseltranskriptionsfaktor in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Th<sub>2</sub>-Zellen. Er identifiziert sich damit als ein entscheidender Faktor des Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Gleichgewichts und ist infolgedessen ein interessanter Bestandteil der Asthma-Forschung<sup>89</sup>.

Die Arbeitsgruppe Pykäläinen *et al.*<sup>90</sup> untersuchte in einer umfangreichen Assoziationsstudie die Zusammenhänge zwischen Polymorphismen des GATA-3-Lokus und den Phänotypen Asthma und erhöhtem Serum-IgE.

Die Screening-Population bestand aus 22 unverwandten finnischen Individuen. Bei 14 jungen atopischen Erwachsenen bestand Asthma oder Atopie, eine klinisch diagnostizierte reversible Bronchokonstriktion und ein positiver RAST (**R**adio-**A**llergo-**S**orbent-**T**est) und/oder Skin-Prick-Test. 10 Probanden litten an asthmatischen Symptomen. Die Kontrollpopulation bestand aus 7 nicht-atopischen Individuen, die in ihrer Anamnese kein Asthma oder eine andere atopische Erkrankung aufwiesen. Zudem zeigten sie eine normale pulmonale Funktion und einen negativen RAST und Skin-Prick-Test.

In der Screeningpopulation konnte die Arbeitsgruppe 9 Polymorphismen in dem GATA-3-Lokus identifizieren, wovon 5 SNPs zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der SNP-Datenbank (dbSNP/NCBI) veröffentlicht waren. Die in der Screeningpopulation identifizierten SNPs wurden anschließend in 120 finnischen Familien genotypisiert und die Assoziation zwischen SNPs und Asthma sowie dem Gesamt-IgE-Serum-Spiegel und dem Blut-Eosinophilen-Spiegel untersucht. Durch die anschließende Haplotyp-Assoziationsanalyse konnten drei Haplotypen identifiziert werden, die eine Assoziation zeigten. Einer der Haplotypen (CGTAGCTCC) war mit einem hohen Gesamt-IgE-Serum-Spiegel assoziiert und wurde in einer weiteren Studie untersucht.

Die potenziell auffälligen Assoziationen wurden in einer nachfolgenden Fall-Kontroll-Studie, basierend auf 245 finnischen asthmatischen Patienten und 405 Kontrollindividuen, repliziert. Untersuchte Phänotypen dieser Kohorte waren Asthma, der Gesamt-IgE-Serum-Spiegel, Skin-Prick-Test und der Blut-Eosinophilen-Spiegel. Die finnische Fall-Kontroll-Studie zeigte im Vergleich zur Familienpopulation sehr ähnliche klinische Charakteristika. Interessanterweise zeigte einer der drei Haplotypen in der Familienpopulation und auch in der Fall-Kontroll-Studie die gleiche Assoziation mit den Asthmaphänotypen. Da allerdings kein SNP des GATA-3-Lokus in einer codierenden Region liegt und aus diesem Grund keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz nimmt, ist es schwer zu beurteilen, inwieweit die identifizierten SNPs eine funktionelle Rolle spielen.

Diese Assoziationsstudie von GATA-3, die den Zusammenhang zwischen genetischen Variationen und der Ausprägung des Phänotyps Asthma bronchiale untersuchte, zeigte keinen signifikanten Effekt.



### 1.3.2.3 Ergebnisse genetischer Analysen des T-bet-Gens

T-bet ist ein Th<sub>1</sub>-spezifischer Transkriptionsfaktor, der die Th<sub>1</sub>-Differenzierung fördert, die IFN- $\gamma$ -Synthese steigert und eine protektive Wirkung auf asthmatische Erkrankungen aufweist. Basierend auf diesen Erkenntnissen ist es denkbar, dass genetische Veränderungen des T-bet-Lokus, in Form eines oder mehrerer Polymorphismen zu einer Ausbildung von Asthma, einer bronchialen Hyperreagibilität oder einer Atopie führen könnten.

Eine Deletion im Kandidatengen TBX21 des T-bet-Gens, zeigte bereits im Mausmodell eine Atemwegs-Eosinophilie, eine Th<sub>2</sub>-Zytokinproduktion, eine bronchiale Hyperreagibilität und pulmonale Umbauprozesse. Folglich bilden Mäuse mit einem Mangel an T-bet multiple physiologische und inflammatorische Merkmale aus, die dem humanen Asthma ähnlich sind<sup>91</sup>.

B.A. Raby *et al.*<sup>92</sup> gelang es zum ersten Mal, einen Zusammenhang zwischen T-bet und einer bronchialen Pathophysiologie darzustellen. Im Anschluss an ein Mutationenscreening an 30 weißen Erwachsenen (22 Asthmatiker, 8 gesunde Probanden) das insgesamt 24 SNPs identifizieren konnte, wurden zwei Assoziationsanalysen durchgeführt.

Die erste Assoziationsstudie an 580 Familien zeigte bei Polymorphismus C-7947 eine schwache Assoziation mit Asthma. Weitere vier Polymorphismen, die über den Genlocus verteilt liegen (C-7949, C2122, C21126 und C56983), zeigten eine signifikante Assoziation mit einer bronchialen Hyperreagibilität bei Kindern mit Asthma.

Die zweite Assoziationsstudie wurde an 2280 Männern im Alter zwischen 21 und 80 Jahren durchgeführt. Für die Genotypisierung wurden 200 Probanden ausgewählt, die im

Methacholintest einen Abfall der FEV<sub>1</sub> (Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde) von mehr als 20% zeigten. Und 436 Probanden, bei denen die FEV<sub>1</sub> weniger als 20% abfiel. In dieser Gruppe konnte die Assoziation von SNP C-7949 und einer bronchialen Hyperreagibilität belegt werden. Jedoch zeigte sich kein Zusammenhang mit einem erniedrigten FEV<sub>1</sub>, einem erhöhten Serum-IgE-Spiegel oder einer Bluteosinophilie in einer der oben beschriebenen Studien.

Die Arbeitsgruppe um Chang testete 7 Polymorphismen und den bedeutendsten Haplotyp an einer Krankenhaus-basierenden Kohortengruppe in Korea. Diese Gruppe bestand aus 550 Patienten mit Asthma und 170 Kontrollindividuen. Die Studie zeigte keine Assoziation mit Asthma, einem erhöhten IgE-Spiegel oder einem positiven Hauttest<sup>93</sup>.

Ylikoski und Kollegen untersuchten 15 SNPs in 120 Familien mit Asthma in einer finnischen Population und konnten ebenso keine Beweise für eine Assoziation mit Asthma oder mit einem erhöhten IgE-Spiegel finden<sup>94</sup>.

Akahoshi *et al.* demonstrierte Assoziationen des -1993C Allels mit Aspirin-induzierem Asthma in einer japanischen Fallkontrollstudie. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen diesem SNP oder anderen vorkommenden Polymorphismen und einer anderen Form von Asthma bei Erwachsenen oder Kindern hergestellt werden<sup>95</sup>.

Lediglich die Arbeitsgruppe um B.A. Raby konnte einen schwach signifikanten Zusammenhang zwischen Polymorphismen des T-bet-Gens und Asthma beobachten. Alle weiteren Studien zeigten keine Verbindung zwischen genetischen Variationen von T-bet und einem erhöhten Risiko, ein Asthma bronchiale auszubilden.

### 1.3.2.4 HLX1 (H2.0-Like Homeobox 1) ein weiterer Schlüsseltranskriptionsfaktor

Die Assoziationsstudien der Schlüsseltranskriptionsfaktoren der T-Zelldifferenzierung zeigten, dass Polymorphismen im GATA-3-Gen keinen und im T-bet-Gen nur einen schwachen Effekt bezüglich der Ausbildung eines Asthma bronchiale aufweisen. Da HLX1 durch eine enge Interaktion mit T-bet als ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor der Th<sub>1</sub>-Differenzierung identifiziert wurde, ist es von besonderem Interesse, inwieweit sich genetische Veränderungen im HLX1-Gen auf die Entstehung von Asthma auswirken könnten. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist keine genetische Untersuchung in Form einer Assoziationsstudie von HLX1 veröffentlicht worden. Es sind lediglich funktionelle Studien bekannt. Die vorliegende Arbeit beschreibt das erste Mutationenscreening und die erste Assoziationsstudie von HLX1 bezüglich Asthma bronchiale.

### 1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines Mutationsscreenings mittels direkter Sequenzierung sämtliche Polymorphismen im HLX1-Gen, bestehend aus der proteinkodierenden Region (4 Exons), der gesamten intronischen Region, der 5'- und 3'-UTR und dem Promotorbereich, identifiziert. In einer anschließenden Assoziationsstudie wurde der Zusammenhang zwischen den vorhandenen Polymorphismen und atopischen Phänotypen (Asthma bronchiale, atopische Dermatitis, Rhinitis allergica und IgE-Spiegel) untersucht. Zusätzlich wurden funktionelle *In-silico*-Analysen durchgeführt, inklusive phylogenetischer Analyse mittels VISTA-Browser (für Schimpanse-Hund-Maus-Mensch) und eine Analyse der Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen mittels MAT-Inspektor.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Die Studienpopulationen

Die Screeningpopulation, mit dem für jeden Probanden zugehörigen Phänotyp sowie die Studienpopulation, welche auf allgemeingültigen SOPs basiert, lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits vor und werden hier beschrieben.

#### 2.1.1 Population für das Mutationenscreening

Insgesamt wurden 40 deutsche erwachsene Probanden, bestehend aus einer Zufallsstichprobe für das Mutationenscreening des HLX1-Gen eingesetzt. Dabei wurde weder nach Geschlecht noch nach dem Befund Atopiker/Nicht-Atopiker ausgewählt. Jedem Probanden wurde Blut entnommen und die DNA nach der Standard-Aussalzmethode nach Miller<sup>96</sup> bzw. der DNA-Extraktion nach dem Protokoll der Firma Qiagen isoliert (2.3.1). Anschließend wurde die DNA-Konzentration und -Reinheit photometrisch bestimmt (2.3.2). Die so gewonnene genomische DNA dieser Probanden, wurde für alle PCR- und Sequenzier-Reaktionen im Rahmen des Mutationenscreenings des HLX1-Gens eingesetzt.

#### 2.1.2 Die Studienpopulation für die Assoziationsanalyse

Im Rahmen der „International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase II“ (ISAAC II), einer internationalen Querschnittsstudie zur Erforschung von Asthma und Allergien, wurden in den Jahren 1995/96 unter anderem in den deutschen Städten München und Dresden Kinder der 4. Schulklasse (Altersstufe 9-11 Jahre) rekrutiert. Entsprechend dem ISAAC II-Studienprotokoll wurden ein standardisierter Elternfragebogen, eine Hautuntersuchung, ein Skin-Prick-Test, eine Spirometrie und ein bronchialer Provokationstest sowie eine venöse Blutentnahme durchgeführt<sup>97</sup>. Für die vorliegende Assoziationsstudie bildeten insgesamt 1.940 Kinder deutscher Abstammung aus der Stadt Dresden die Gesamtpopulation.

Für diese Querschnittspopulation wurden sämtliche rekrutierten Kinder mit verfügbarer DNA und IgE-Werten unabhängig von möglichen asthmatischen oder atopischen Erkrankungen erfasst. Die DNA dieser Population wurde zur Genotypisierung in der MALDI-TOF MS (2.3.10) eingesetzt.

### 2.1.2.1 Fragebogen

Die standardisierten Fragebögen wurden über die Schulen an die Eltern der Kinder ausgeteilt und beinhalteten detaillierte Fragen zum Auftreten und dem Schweregrad atopischer Symptome. In der anschließenden Analyse wurden die Phänotypen pfeifende oder keuchende Atmung, Luftnot, atopisches Ekzem, allergische Rhinitis, Neurodermitis und Atopie ausgewertet. Neben diesen Angaben wurden weitere Informationen über zusätzliche Erkrankungen im Kindesalter, Impfungen, Schwangerschaftsverlauf, Geburt mit anschließender Ernährung, Familienanamnese und Fragen zum früheren und jetzigen sozioökonomischen Status und Lebensstil erhoben.

### 2.1.2.2 Skin-Prick-Test

Für den Haut-Prick-Test wurden sechs der häufigsten Aeroallergene sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle (10 mg/ml Histamin bzw. NaCl) eingesetzt. Dabei sah das ISAAC II-Protokoll für die Kinder aus München und Dresden das Testen auf *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, Katzenhaar, *Alternaria tenuis*, Baum- und Gräserpollen unter Verwendung von Extrakten der Firma ALK (Horsholm, Dänemark) vor. Für die Auswertung des Prick-Tests war die Größe der jeweils entstandenen Quaddel an der Auftragsstelle, verglichen mit der Negativkontrolle, ausschlaggebend. Eine positive allergische Reaktion entsprach einem Hautquaddeldurchmesser von > 3mm (nach Abzug der Negativ-Kontrolle).

2.1.2.3 Bestimmung des Gesamt-Serum-IgE-Spiegels

Für die Bestimmung des Immunglobulin-E-Spiegels wurde eine venöse Blutentnahme durchgeführt und aus dem gewonnenen EDTA-Blut die DNA isoliert und aufgereinigt (2.3.1).

2.2 Material

2.2.1 Geräte

DNA-Sequenzierer:

ABI 3730 DNA Analyzer 63920 Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Gel-Dokumentationssystem:

KODAK Electrophoresis Documentation and Analysis System KODAK, Stuttgart (Wangen), D

Gelelektrophoreseapparatur:

BIO RAD Wide Mini-Sub Cell GT Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA  
BIO RAD Power Pac 300 Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Massenspektrometer:

BIFLEX II-TOF Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen, D

Mikrowelle:

Bosch, Stuttgart, D

PCR-System:

eppendorf Mastercycler Eppendorf AG, Hamburg, D  
PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler MJ Research, Boston, USA

Pipettierroboter:

Pipettierroboter Genesis 150 Tecan AG, Crailsheim, D  
Pipettierroboter Multimek 96 Beckmann/Sagain, Unterschleißheim, D  
Sequenom Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems Sequenom, Hamburg, D  
Pipettierroboter Te-MO Tecan AG, Crailsheim, D

Photometer:

eppendorf BioPhotometer Eppendorf AG, Hamburg, D

Pipetten:

eppendorf Research 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl Eppendorf AG, Hamburg, D

Tischzentrifuge:

Hettich Zentrifugen Mikro 20

Hettich GmbH, Tuttlingen, D

Vortexer:

Scientific Industries Vortex Genie 2

Scientific Industries, Inc., NY, USA

Waage:

Kern 440-33

Kern, Ballingen, D

Wasserbad:

Köttermann Labortechnik

Köttermann GmbH, Uelze, D

Zentrifuge:

eppendorf Centrifuge 5810 R

Eppendorf AG, Hamburg, D

2.2.2 Computerprogramme

Pipettierroboter:

Gemini 3.5

Tecan, Crailsheim, D

Bioworks

Beckmann Coulter, Fullerton, USA

MALDI-TOF Massenspektrometrie:

Spectro TYPER\_RT 2.0.0.3

SEQUENOM, San Diego, CA, USA

- Spectro-Designer
- Spectro-Importer
- Spectro-Typer

Sequenzierung:

DNA Sequencing Analysis Software

Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Version 3.6.1

3100 Data Collection Software Version

Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Primer und PCR-Bedingungen:

Netprimer

Premierbiosoft International Palo Alto,  
CA, USA

SpectroDESIGNER

SEQUENOM, San Diego, CA, USA

Analyse genomischer DNA-Sequenzen:

BioEditSequence Alignment Editor

Hall 1999,  
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Haploview

<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>

Datenbanken aus dem Internet:

National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
CHIP Bioinformatics Tools	<a href="http://snpper.chip.org/bio/">http://snpper.chip.org/bio/</a>
MAT-Inspector	<a href="http://www.genomatix.de/">http://www.genomatix.de/</a>

Statistische Programme:

SAS/ Genetics (Version 9.13)	SAS Institute Inc., NC, USA
Vista Browser	<a href="http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml">http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml</a>

2.2.3 Puffer, Lösungen, Reagenzien

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Extraktion:

Ery-Lyse-Puffer pH=7,4 (155mM NH<sub>4</sub>CL (Merck, Darmstadt, D), 10mM KHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, D), 0,5M EDTA pH=8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), ad H<sub>2</sub>O)  
Proteinase-K-Puffer (1M Tris/CL pH=7,5 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 0,5M EDTA pH=8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 5M NaCl (Sigma-Aldrich, Osterode, D)  
SDS 20% (Na-Dodecylsulfat, Serva, Heidelberg, D)  
EtOH 100% (Ethanol absolut zur Analyse, Merck, Darmstadt, D)  
TE-Puffer (10mM Tris/CL (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 1mM EDTA pH=8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D))

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die PCR:

10xPuffer S	PeqLab Erlangen, D
10xPuffer Y	PeqLab, Erlangen, D
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Promega GmbH, Mannheim, D
Betain 5M	Sigma-Aldrich, Osterode, D
H <sub>2</sub> O, Water Molecular Biology Grade	Eppendorf AG, Hamburg, D
dNTP-Set, je 100mM	PeqLab, Erlangen, D

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die Sequenzierung:

10x PCR Buffer containing 15mM MgCl <sub>2</sub>	Quiagen, Hilden, D
LiChrosolv, H <sub>2</sub> O, HPLC grade	Merck, Darmstadt, D
FG, 3100 POP6 Sequenziergel	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
ABI Sequenzierpuffer	Applied Biosystems, Weiterstadt, D



Puffer, Lösungen, Reagenzien für die MALDI-TOF:

10x PCR Puffer enthält 15mM MgCl <sub>2</sub>	Quiagen, Hilden, D
4x dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
MgCl <sub>2</sub> 25mM	Quiagen, Hilden, D
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 25	SEQUENOM, San Diego,CA,USA
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 26	SEQUENOM, San Diego,CA,USA
MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri28	SEQUENOM, San Diego,CA,USA
HME MassEXTEND Nucleotide Tri-Mix-Pack	SEQUENOM, San Diego,CA,USA
3-Punkt Kalibrant	SEQUENOM, San Diego,CA,USA
hME-Puffer	SEQUENOM, San Diego,CA,USA
Spectro CLEAN	SEQUENOM, San Diego,CA,USA

Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Gelelektrophorese:

100bp DNA-Leiter 500µg/ml	New England Biolabs, Frankfurt a. Main, D
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bioscience Rockland, ME, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Osterode, D
Ladepuffer (30% Glycerin, Bromphenolblau, Xylenecyanol-FF)	
5% TBE-Puffer (54g Tris-Puffer, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA (pH=8), ad 1l H <sub>2</sub> O)	

2.2.4 Reaktionskits

PCR-Aufreinigung:

Millipore Kit PCR Multiscreen, Montage 96PCR Plates	Millipore, D
QIAquick Gel Extraction Kits	Quiagen, Hilden, D

Sequenzierkits:

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
---	---------------------------------------

MALDI-TOF Massenspektrometrie:

MassEXTEND Core Kit	SEQUENOM, San Diego,CA,USA
---------------------	----------------------------

2.2.5 Enzyme

Polymerasen:

Taq Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Thermosequenase	Amersham Bioscience, Freiburg,D
HotStar Taq (5units/ $\mu$ l)	Quiagen, Hilden, D

sonstige Enzyme:

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Amersham Bioscience, Freiburg,D
-----------------------------------	---------------------------------

2.2.6 Primer

PCR-Primer:

bezogen von Metabion (Planegg/Martinsried, D), (2.3.3.2, Tabelle 1)

Sequenzier-Primer:

bezogen von Metabion (Planegg/Martinsried, D), (2.3.6.2, Tabelle 4)

MALDI-TOF-Primer:

Sense-/ Antisense-/ Extensions-Primer von Metabion (Planegg/Martinsried, D),  
(2.3.10.3.1, Tabelle 6)

2.2.7 Sonstige Materialien

Thermo-Fast 96 PCR Plates (Low Profile)	Peqlab, Erlangen, D
Mikrotiterplatten	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Thermofast 384 MTP	ABgene, Surrey, UK
96-er Custerplates	Quiagen, Hilden, D

### 2.3 Methoden

Die im Anschluss aufgeführten Methoden basieren auf den etablierten Methoden des Labors der Allergogenetik im „Dr. von Haunerschen Kinderspital“ der LMU München und wurden von allen Doktoranden der Arbeitsgruppe PD Dr. Michael Kabesch gemeinsam erarbeitet und fortlaufend aktualisiert. Sie können in der aktuellsten Version unter [www.Asthmagene.de](http://www.Asthmagene.de) eingesehen werden. Spezifische Modifikationen dieser Methoden, wie z.B. die Auswahl der Primer für dieses Projekt, sind projektspezifisch hier dargestellt und können im Einzelfall von den Standardmethoden abweichen.

#### 2.3.1 DNA-Extraktion

Durch Anwendung der Standardaussalzmethode nach Miller<sup>96</sup> (für frisches Blut) und der DNA-Extraktionsmethode nach dem Protokoll der Firma Qiagen (für bei -20°C eingefrorenes Blut) wurde DNA aus EDTA-Vollblut extrahiert und aufgereinigt.

#### 2.3.2 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

##### 2.3.2.1 Theoretische Grundlagen

Nach der DNA-Isolierung bzw. nach einer PCR ist es notwendig, die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung zu bestimmen, um für nachfolgende Versuche definierte DNA-Mengen einsetzen zu können. Die Konzentration einer DNA-Lösung wird bestimmt, indem ihre Extinktion im Spektralphotometer nach geeigneter Verdünnung (1:15) bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) ( $OD_{260}$ ,  $OD_{280}$ ) gemessen und die Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet wird. Die Messung der  $OD_{280}$  erfasst Verunreinigungen und dient der Überprüfung des Reinheitsgrades. Das Verhältnis von  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt den Grad der Verunreinigung an und sollte im Idealfall etwa 1,7-2,0 betragen. Werte  $\leq 1,6$  deuten auf einen

hohen Proteingehalt oder Verunreinigung hin, wobei Werte  $\geq 2,0$  auf einzelsträngige DNA schließen lassen (hyperchromer Effekt).

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)<sup>98</sup>

#### 2.3.3.1 Theoretische Grundlagen

Die Vervielfältigung (Amplifikation) von bestimmten DNA-Abschnitten *in vitro* wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt. Hierbei besteht der Reaktionsansatz aus zwei spezifischen Oligonukleotid-Molekülen (Primern), einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), freien Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP und dTTP, dem DNA-Template und den geeigneten Pufferbedingungen.

Das Prinzip der PCR lässt sich wie folgt beschreiben:

Es basiert auf einer thermischen Denaturierung (bei 95°C) eines doppelsträngigen DNA-Template, an das sich anschließend am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches spezifisch ausgewählte Primer, die in hohem Überschuss zum PCR-Ansatz gegeben wurden, anlagern. Dieser Vorgang wird auch Anneling genannt, wobei hierfür die gewählte Temperatur von dem spezifischen Primerpaar abhängig ist. Diese Primer werden von einer Taq-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate verlängert (Elongation bei 72°C). Die Taq-Polymerase elongiert den entstehenden DNA-Doppelstrang solange, bis sie von der DNA abfällt oder die Reaktion durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C, verbunden mit einer erneuten Denaturierung, unterbrochen wird. Die Synthese eines weiteren Doppelstranges kann nun wiederholt werden. Nach dem zweiten Zyklus entstehen Fragmente, die genau der Länge des zu amplifizierenden Bereiches entsprechen. Diese Fragmente werden in den darauf folgenden PCR-Zyklen exponentiell vermehrt.

### 2.3.3.2 Praktische Durchführung

Das HLX1-Gen wurde vorab anhand der bekannten Referenzsequenz AF 217621 (aus der genomischen Datenbank des National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) in Fragmente unterteilt, anschließend mittels PCR amplifiziert und somit für die Sequenzierung vorbereitet. Durch die Sequenzierung konnten die vorgegebene Basenabfolge und eventuelle Variationen im HLX1-Gen der Mutationen-Screening-Population bestimmt werden.

Untersucht wurden hierbei 1.934bp des Promotors (einschließlich der 5'-UTR), ausgehend vom ATG des ersten Exons, die vier Exons, die dazwischen liegenden Introns und 1.155bp nach der vierten codierenden Sequenz, die unter anderem die 3'-UTR beinhaltet. Somit ergab sich ein zu sequenzierender Bereich von insgesamt 7.919bp. Anhand des oben beschriebenen Bereichs ergaben sich 22 zu untersuchende Fragmente von unterschiedlicher Länge, die zuerst amplifiziert und anschließend sequenziert wurden. Hierfür wurden mit Hilfe des Programms VectorNTI die entsprechenden Primerpaare entworfen und von der Firma Metabion synthetisiert, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Primerpaare überlappten, um eine lückenlose Darstellung des HLX1-Gens zu erzielen.

Die PCR wurde mit den entsprechenden genspezifischen Primerpaaren und ihren optimierten PCR-Bedingungen angewandt (Tabelle 1). Ein Standard-PCR-Ansatz wurde immer nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Schema pipettiert und unter den in Tabelle 3 allgemein beschriebenen Temperatur-Bedingungen in Thermocyclern der Firma Eppendorf durchgeführt.

## MATERIAL UND METHODEN

Fragment	Name	Sequenz	Länge in bp	Annealing Temperatur	Cyclenzahl	Puffer	Weitere Zusätze in $\mu$ l
F1	HLX_-1983fwd_F1	TAA AAG AGA GAT GGA GAG CG	628 bp	57,2°C	34	S	
	HLX_-1355rev_F1	CTG CTT TCA ATT CTG TGA CAG					
F2	HLX_-1464fwd_F2	CTG CGT TCT AAA GAC CCA AG	579 bp	58,0°C	34	Y	
	HLX_-885rev_F2	CCT TCT CTT GAC CTC ATT CT					
F3	HLX_-984fwd_F3	ACT CAG GGC GGC AAC ATT TG	599 bp	65,0°C	34	Y	
	HLX_-385rev_F3	AGT CCG TTA GTT AGG GGG GG					
F3a	HLX_-713fwd_F3a	CAG AAG TTA GAA GAG AGT CAG AGC CC	516 bp	67,0°C	34	Y	0,6 $\mu$ l Betain
	HLX_-197rev_F3a	GTC ACC GCC TCG CTC CC					
F4	HLX_-541fwd_F4	ACT CCC CGC TCC CAT TGG TC	504 bp	65,2°C	37	Y	3,0 $\mu$ l Betain
	HLX_37rev_F4	TTG GAG GCG TAG AAG GGA GC					
F5	HLX_-53fwd_F5	CCA CCC ACC CAG TCC GGC TG	539 bp	61,7°C	34	Y	
	HLX_592rev_F5	CCT CTC AGC GTG TTG CCT T					
F6	HLX_481fwd_F6	ACC ACA GTG GCT CTG CCC CG	586 bp	58,3°C	34	Y	
	HLX_1067rev_F6	TCC AAG AAC GCC ACA GAC GC					
F6a	HLX_775fwd_F6a	ACA AAC AAA AAA TGA CTC CAG GG	581 bp	58,7°C	34	Y	
	HLX_1356rev_F6a	CGG TTA GCA GGG AAG TGA GAT C					
F7a	HLX_1253fwd_F7a	GCA AGG GGA AGG GGA GGA AC	630 bp	59,3°C	39	Y	3,0 $\mu$ l Betain
	HLX_1883rev_F7a	ACC CAG ACA TAA ACT CGC CAA GC					
F8a	HLX_1725fwd_F8a	GAT CCC AGA AAG TGT GTG CGT G	567 bp	60,3°C	34	Y	1,5 $\mu$ l Betain
	HLX_2292rev_F8a	GCA GAA CGG GAG CCA GAG G					
F9	HLX_1966fwd_F9	GCT GTC ATC ATT CAG GCC CA	635 bp				
	HLX_2601fwd_F9	AAG ATC TTG CGT TTG CAC CG					
F9a	HLX_2142fwd_F9a	CGG TGT ATG TGC GAA GGG C	527 bp	60,9°C	34	Y	3,0 $\mu$ l Betain
	HLX_2669rev_F9a	CCT CAC CCC ATC TCC ACC C					
F10	HLX_2485fwd_F10	AAG GCA GTT CTG GCT CCA GC	540 bp	61,0°C	34	Y	1,0 $\mu$ l Betain
	HLX_3025rev_F10	GTG TGG CCA CTC CAA GCA GA					
F11	HLX_2941fwd_F11	CCC AGT TGT GAG GAA GTG AA	594 bp	57,2°C	34	Y	
	HLX_3535rev_F11	CCC AAC GCA TTC ACA CAA GT					
F12	HLX_3397fwd_F12	TTA CAC AAC TCT TCT CCC C	668 bp	55,5°C	34	Y	
	HLX_4065rev_F12	CTA AAA TGA CCT GAG TGA C					
F12a	HLX_3821fwd_F12a	AGT GGC AGT AGA GGA GAG GGC	467 bp	63,6°C	34	Y	3,0 $\mu$ l Betain
	HLX_4288rev_F12a	ACA CCG AGA TGA GAC CCA GG					
F13	HLX_3924fwd_F13	TGG GCT AGG AGT CCA TAA CT	641 bp	62,0°C	34	S	
	HLX_4565rev_F13	AGA GAA CGC TCA CTC CCC TC					
F13a	HLX_4182fwd_F13a	CTG GTC CTT GGT AGA GTC GCC	519 bp	63,6°C	34	Y	3,0 $\mu$ l Betain
	HLX_4701rev_F13a	GCT GCT GCT ACT AAG ACT GCT GG					
F14	HLX_4410fwd_F14	GAA GCC ATC AGG TGG AGC C	618 bp	55,5°C	34	S	
	HLX_5028rev_F14	CAC TGA GAC TCC CCT CTG C					
F14a	HLX_4605fwd_F14a	CCT CAT TAC CGC CAG CAG	612 bp	60,9°C	34	Y	3,0 $\mu$ l Betain
	HLX_5217rev_F14a	GCC TTA ACA ACC CCC AGC					
F15	HLX_4916fwd_F15	TTG GTA GGG CAG GAG ACG C	644 bp	64,0°C	34	Y	
	HLX_5560rev_F15	ATT GAC CCC GCC TGG CAT C					
F16	HLX_5436fwd_F16	AGC AGG CCA TAG AAA CTG TT	644 bp	52,8°C	34	S	
	HLX_6080rev_F16	CCT GGA GAG AGG TTT AAC TT					

**Tabelle 1: Verwendete Primer-Paare und die dazugehörigen Puffer-Bedingungen für die PCR.**

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösungen
PCR-Puffer (Puffer S/Y)	5µl	10 x
dNTPs	1,0µl	je 10 mM
Vorwärtsprimer	0,5µl	25 pmol/µl
Rückwärtsprimer	0,5µl	25 pmol/µl
DNA - Template	3,3µl	20 ng/µl
Taq - Polymerase	0,15µl	25mM/5M
Betain	x µl (Tabelle 1)	5 M
H <sub>2</sub> O	ad 50µl	
<b>Volumen Total</b>	<b>50µl</b>	

Tabelle 2: Komponenten eines PCR-Ansatzes.

Schritte	Temperatur	Zeit
1) Aktivierung	96°C	2 min
2) Denaturierung	96°C	20 sec
Annealing	52,8-67°C	20 sec
Elongation	72°C	20 sec
	Wiederholung von 2) 45x	
3) Letzte Elongation	72°C	5 min
	4°C	unendlich

Tabelle 3: Allgemeine Temperaturbedingungen einer PCR. (Die Annealing-Temperatur ist für jedes Fragment spezifisch und variiert in dieser Arbeit zwischen 52,8°C und 67°C.)

### 2.3.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

#### 2.3.4.1 Theoretische Grundlagen

Die Gelelektrophorese wird eingesetzt, um die PCR-Produkte zu identifizieren, aufzureinigen oder die DNA-Qualität zu kontrollieren. Das Prinzip basiert auf der Tatsache, dass eine Mischung aus aufzutrennenden Molekülen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Agarosegel wandert, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung bewegen sich die Moleküle unterschiedlich schnell durch das Gel, wobei ihre Geschwindigkeit proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist. Nukleinsäuren besitzen unter neutralen pH-Bedingungen eine negative Ladung und wandern somit schnell in Richtung der positiv geladenen Anode.

### 2.3.4.2 Praktische Durchführung

Für die Gelelektrophorese wurden 1,5%-ige Agarose-Gele hergestellt, wofür Agarose in 0,5%-igem TBE-Puffer aufgekocht wurde. Die Zugabe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid zum aufgekochten Agarose-Gemisch, ermöglichte eine Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht (302 nm).

Anschließend wurde die Agarose zum Erhärten in horizontale Schlitten gegossen. An einem Ende der Gelschicht befanden sich kleine, rechteckige Taschen. Diese wurden durch Zähne eines Kamms geformt, der vor dem Gießen des Gels angebracht wurde.

Nach dem Erstarren des Gels wurde Puffer in eine Elektrophorese-Kammer eingefüllt und das Gel mit Puffer überschichtet. Dieser Puffer stellte den Kontakt zwischen den Elektroden auf beiden Seiten des Gels dar. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Produkte mit einem farbigen Ladepuffer versetzt, bestehend aus Loading-dye und Glycerin, der bewirkte, dass sich die DNA auf dem Boden der Taschen absetzt. Nach einem Lauf von 90 min und einer Spannung von 90 Volt konnten die DNA-Produkte unter einer UV-Lampe dargestellt und anhand eines Längenstandards definierter Fragmentlängen (100bp) die Größe der Produkte abgeschätzt werden.

### 2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

#### 2.3.5.1 Praktische Durchführung

Um die PCR-Produkte in die anschließende Sequenzier-Reaktion einsetzen zu können, mussten diese vorher aufgereinigt werden. Für die Aufreinigung wurden Filterplatten der Firma Millipore (Millipore Kit PCR Multiscreen) verwendet, deren Prinzip auf einem



membrangebundenen Aufreinigungsverfahren beruht. Dabei wird das PCR-Produkt unter Druckeinwirkung an eine Membran gebunden und anschließend in Wasser eluiert.

Bei der Durchführung wurde das gesamte PCR-Produkt auf die Platte überführt und nach Zugabe von 250µl Wasser bei 3200g für 7 min zentrifugiert. Anschließend konnte das an die Membran gebundene PCR-Produkt, nach 5 min Vortexen in 30µl Wasser gelöst und der Überstand in frische Reaktionsgefäße abpipettiert werden.

### 2.3.6 Sequenzierung

#### 2.3.6.1 Theoretische Grundlagen

Durch die Methode der Sequenzierung kann die Abfolge der Nukleotidsequenz von kleineren DNA-Einheiten dargestellt und anschließend wieder zu einer vollständigen Gesamtsequenz zusammengefügt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um die bekannte Sequenz des HLX1-Gens in der Mutationen-Screening-Population zu überprüfen und eventuelle Variationen in Form von Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs) identifizieren zu können.

Die hier verwendete Methode beruht auf dem Sanger-Abbruch-Verfahren mit fluoreszierenden Didesoxynukleosid-Triphosphaten (ddNTPs)<sup>99</sup>. In vier sonst gleichen Ansätzen wird eine der vier Basen Adenosin, Thymin, Cytosin oder Guanin zum Teil als Didesoxynukleosidtriphosphat zugegeben. Jedes der vier ddNTPs wird mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt. Zudem besitzen die „Kettenabbruch-ddNTPs“ keine 3'-Hydroxygruppe. Werden nun die ddNTPs in den neusynthetisierten Strang eingebaut, ist eine DNA-Verlängerung nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-Ende für die Verknüpfung mit dem nächsten Nukleotid fehlt. In der Folge entstehen DNA-Fragmente

unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragments zeigen Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und können von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen, gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

### 2.3.6.2 Praktische Durchführung

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung beinhaltete 1-2µl aufgereinigtes PCR-Produkt (25-50ng/µl), 1,0µl Premix (Big Dye v3.1) bestehend aus Polymerase, Puffer und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten, 1µl 5x Sequenzierpuffer, 0,5µl des entsprechenden Sequenzier-Primers (10pmol /µl) und wurde mit Wasser auf 5µl aufgefüllt. In die Sequenzier-Reaktion wurden die Primer eingesetzt, die bereits für die PCR verwendet wurden. Bei einigen Fragmenten, die sich nicht überlappten, wurden zusätzliche Sequenzier-Primer entworfen, die in die Fragmente gelegt wurden. Somit konnte vom Fragmentinneren nach außen sequenziert werden (Tabelle 4, grau unterlegt). In Tabelle 4 sind die Sequenzier-Primer aufgelistet, die in die Sequenzier-Reaktion (Tabelle 5) eingesetzt wurden.

## MATERIAL UND METHODEN

Fragment	Primername	Primersequenz	Sequenzier- richtung
1	HLX_-1355rev_F1	CTG CTT TCA ATT CTG TGA CAG	3' → 5'
2	HLX_-1464fwd_F2	CTG CGT TCT AAA GAC CCA AG	5' → 3'
	HLX_-1246rev_F2	CAG GAG GTT GTA GGA AAT GTT AGC C	3' → 5'
3	HLX_-984fwd_F3	ACT CAG GGC GGC AAC ATT TG	5' → 3'
	HLX_-688rev_F3	GGG CTC TGA CTC TCT TCT AAC TTC TG	3' → 5'
3a	HLX_-713fwd_F3a	CAG AAG TTA GAA GAG AGT CAG AGC CC	5' → 3'
4	HLX_37rev_F4	TTG GAG GCG TAG AAG GGA GC	3' → 5'
5	HLX_592rev_F5	CCT CTC AGC GTG TTG CCT T	3' → 5'
6	HLX_481fwd_F6	ACC ACA GTG GCT CTG CCC CG	5' → 3'
6a	HLX_1356rev_F6a	CGG TTA GCA GGG AAG TGA GAT C	3' → 5'
7a	HLX_1253fwd_F7a	GCA AGG GGA AGG GGA GGA AC	5' → 3'
	HLX_1883rev_F7a	ACC CAG ACA TAA ACT CGC CAA GC	3' → 5'
	HLX_1642rev_F7a	TGA CTC CGT AGC CTC CCG	3' → 5'
8a	HLX_1725fwd_F8a	GAT CCC AGA AAG TGT GTG CGT G	5' → 3'
	HLX_2292rev_F8a	GCA GAA CGG GAG CCA GAG G	3' → 5'
9	HLX_1966fwd_F9	GCT GTC ATC ATT CAG GCC CA	5' → 3'
	HLX_2086fwd_F9	ACG CTC GCT TTA GGT CTT CCG	5' → 3'
9a	HLX_2142fwd_F9a	CGG TGT ATG TGC GAA GGG C	5' → 3'
	HLX_2669rev_F9a	CCT CAC CCC ATC TCC ACC C	3' → 5'
10	HLX_2485fwd_F10	AAG GCA GTT CTG GCT CCA GC	5' → 3'
	HLX_3025rev_F10	GTG TGG CCA CTC CAA GCA GA	3' → 5'
11	HLX_3941fwd_F11	CCC AGT TGT GAG GAA GTG AA	5' → 3'
	HLX_3535rev_F11	CCC AAC GCA TTC ACA CAA GT	3' → 5'
12	HLX_4065rev_F12	CTA AAA TGA CCT GAG TGA C	3' → 5'
12a	HLX_3821fwd_F12a	AGT GGC AGT AGA GGA GAG GGC	5' → 3'
13	HLX_3924fwd_F13	TGG GCT AGG AGT CCA TAA CT	5' → 3'
	HLX_4122fwd_F13	GAT TCC TGG CTT CTT GTG TTC C	5' → 3'
13a	HLX_4182fwd_F13a	CTG GTC CTT GGT AGA GTC GCC	5' → 3'
14	HLX_4410fwd_F14	GAA GCC ATC AGG TGG AGC C	5' → 3'
	HLX_4527fwd_F14	CAG CGA CAC GGA GCG GAC	5' → 3'
	HLX_4536fwd_F14	GGA GCG GAC TGA GGG GAG	5' → 3'
	HLX_4604fwd_F14	CCC TCA TTA CCG CCA GCA G	5' → 3'
	HLX_4793fwd_F14	GCC CCG AGC CAG CCC AAG	5' → 3'
14a	HLX_5217rev_F14a	GCC TTA ACA ACC CCC AGC	3' → 5'
15	HLX_4916fwd_F15	TTG GTA GGG CAG GAG ACG C	5' → 3'
16	HLX_6080rev_F16	CCT GGA GAG AGG TTT AAC TT	3' → 5'

**Tabelle 4: Alle verwendeten Sequenzier-Primer. (Grau: Primer, die nachträglich entworfen wurden, um eine lückenlose Darstellung der Sequenz zu erhalten.)**

Die Reaktion wurde in Low Profil Platten pipettiert und anschließend nach dem in Tabelle 5 aufgeführten Programm mit 28 Zyklen im Mastercycler der Firma Eppendorf durchgeführt.

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
95°C	30 sec
50°C	15 sec
60°C	4 min

**Tabelle 5: Allgemeine Temperaturbedingungen für die Sequenzierreaktion.**

### 2.3.7 Fällung und Aufreinigung der Sequenzierreaktion

#### 2.3.7.1 Praktische Durchführung

Nach der Sequenzier-Reaktion wurden die Sequenzier-Produkte gefällt und aufgereinigt, um anschließend in die automatische Analyse im Kapillarsequenziergerät eingesetzt werden zu können.

Dazu wurde die Sequenzier-Reaktion (2.3.6) mit 100µl 70% Ethanol versetzt und 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 3000g wurde der Überstand dekantiert und ein zweiter Reinigungsschritt durch Zugabe von 150µl 70% Ethanol und einer 10-minütigen Zentrifugation bei 3000g, angeschlossen. Nach Abkippen des Überstandes wurde das Sequenzier-Produkt 5 min bei RT getrocknet, anschließend mit 50µl HPLC-H<sub>2</sub>O versetzt und vorsichtig vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT konnten nun 25µl der Sequenzier-Reaktion auf spezielle Mikrotiterplatten des ABI Prism 3100-Systems überführt werden.

#### 2.3.8 Maschinelle Sequenzierung mit ABI Prism 3100

Die Analyse der in der Sequenzier-Reaktion (2.3.6) entstandenen Fragmente mittels Elektrophorese erfolgte auf einem Kapillarsequenziergerät der Firma Applied Biosystems (ABI Prism 3100 Genetic Analyser). Die Auftrennung fand in einer mit Acrylamid-Gel gefüllten Kapillare statt, die an eine elektrische Spannung angeschlossen war. Durch diese Spannung konnten die Fragmente nach der Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Ein

Laser regte die markierten Fragmente, die je nach „Kettenabbruch-ddNTP“ unterschiedlich fluoreszenz-markiert waren an und ein Detektor empfing die davon ausgehenden Signale. Je nach Größe des zu sequenzierenden Moleküls wurden unterschiedlich lange Kapillaren verwendet. Hier wurden für PCR-Produkte bis 500bp 36 cm Arrays benutzt.

### 2.3.9 Auswertung der Sequenzen

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter Verwendung des Sequenz-Analyse-Programms BioEditSequence Alignment Editor

(Hall 1999, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Es wurden nur Sequenzen ausgewertet, deren Signale eindeutig waren und deren Fragmente überlappten, damit eine lückenlose Darstellung des Gens möglich war. Durch den direkten Vergleich der untersuchten Sequenzen der Mutationen-Screening-Population und der HLX1 Referenzsequenz (AF 217621) aus der genomischen Datenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) konnten genetische Variationen in Form von Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNPs) im HLX1-Gen identifiziert werden.

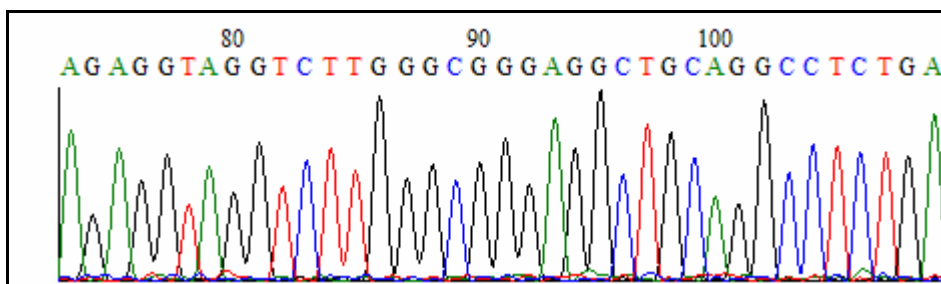


Abbildung 7: Beispiel für eine eindeutig analysierbare Sequenz.

### 2.3.10 Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS

#### 2.3.10.1 Theoretische Grundlagen

Das Prinzip des MALDI-TOF (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **T**ime-**O**f-**F**light) Massenspektrometers beruht auf einer von einem Laserimpuls erzeugten Desorption und Ionisation von Molekülen. Diese Moleküle sind in der zu untersuchenden Probe mit dem 100- bis 1.000fachen Überschuss in einer kristallinen Matrix eingebettet. Diese Matrix ist notwendig, um die Verdampfung der Probe durch die Laserenergie zu erleichtern und einer photolytischen Beschädigung der Fragmente vorzubeugen. Außerdem kann auf diese Weise eine eventuelle Interaktion zwischen den Molekülen vermieden werden. Diese Methode wurde zuerst von Karas *et al.*<sup>100</sup> beschrieben.

Durch die Weiterentwicklung der MALDI-TOF Methode wurde es in den letzten Jahren möglich, DNA-Fragmente von der Größe zwischen 1.000 bis 9.000Da (entsprechend 3-30bp) mit einer Genauigkeit von 0,1 – 0,001% zu erfassen. Durch die Anwendung dieser effektiven Hochdurchsatzmethode („High-Troughput-Method“) ist es möglich, Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in großen Studienpopulationen besser analysieren zu können<sup>101</sup>.

Die ionisierten DNA-Fragmente werden durch einen Laserimpuls aus der Matrix gelöst und in einem konstanten Energiefeld beschleunigt, bis sie auf den Detektor am Ende eines geradlinigen Kanals treffen. Die Zeit zwischen dem Verlassen der Moleküle aus der Matrix und der Identifikation am Detektor gibt das Molekulargewicht der Moleküle wieder. Die ionisierten DNA-Fragmente werden zwar alle mit dem gleichen Potenzial beschleunigt, unterscheiden sich aber je nach Genotyp in der terminalen Base am 3'-Ende. Abweichungen des Molekulargewichts und die Geschwindigkeit repräsentieren den Genotypen jeder einzelnen Probe (Abbildung 8).

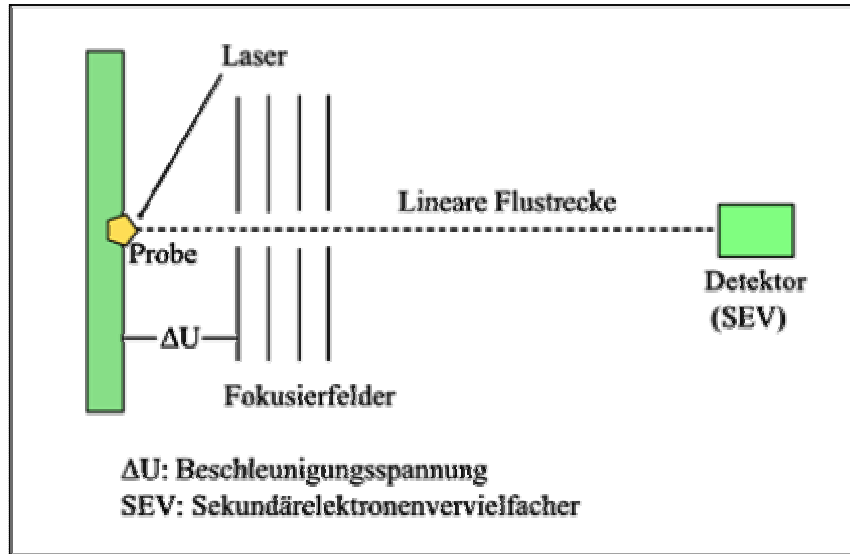
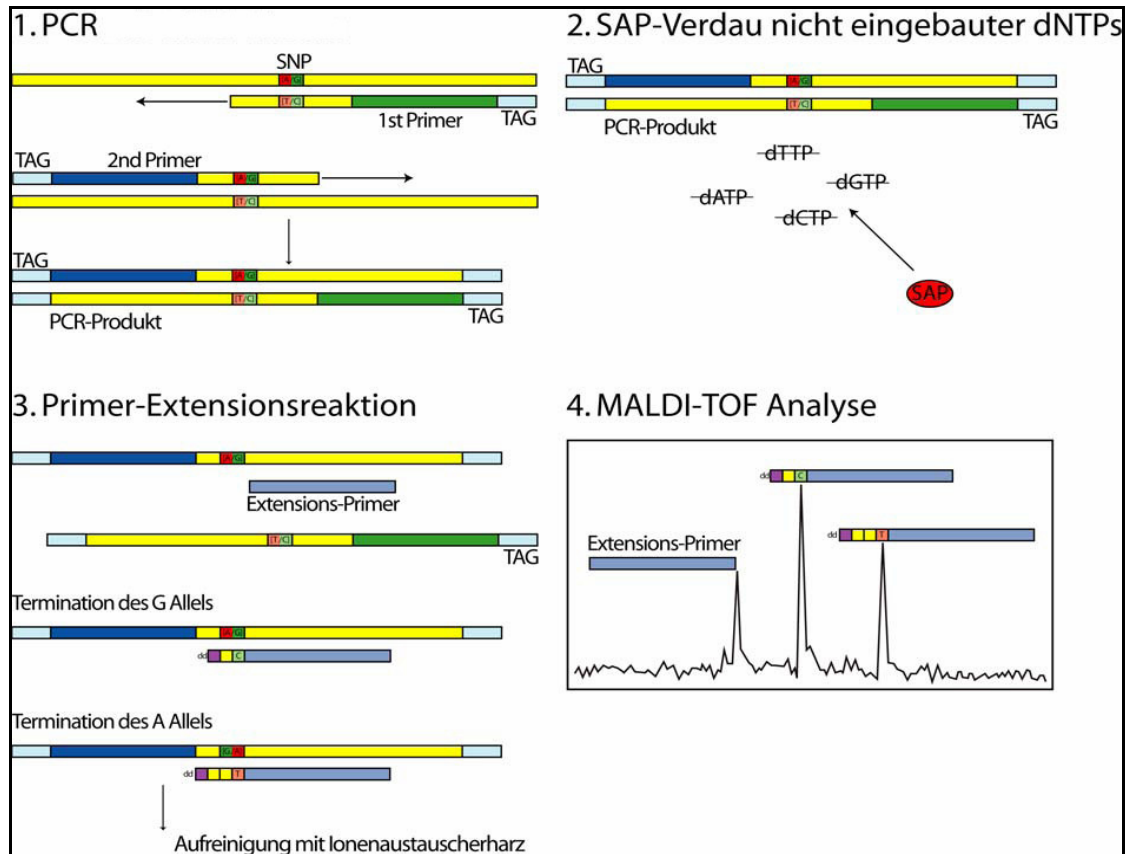


Abbildung 8: Schematische Darstellung des MALDI-TOF Massenspektrometers<sup>101</sup>. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Gohlke, Helmholtz-Zentrum München, Deutschland)

Für die Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS wurde eine Primer-Extensionsreaktion (hME = homogeneous Mass Extent<sup>TM</sup>) unter Verwendung von Sequenom (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde durch eine Standard-PCR die zu genotypisierende Region amplifiziert. Dabei wurden die Primer so ausgewählt, dass die PCR-Amplifikate ca. 100bp groß sind. Danach folgte eine für jeden SNP spezifische Primer-Extensionsreaktion, die es erlaubte, zwischen PCR-Produkten unterschiedlicher Masse entsprechend des Allels eines Polymorphismus unterscheiden zu können<sup>101</sup>.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der hME-Reaktion im Rahmen der MALDI-TOF-Analyse. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Gohlke, Helmholtz-Zentrum München, Deutschland.)**

### 2.3.10.2 Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF MS

Jede einzelne DNA-Probe der Studienpopulation Dresden wurde auf 96er Platten (Peqlab, Erlangen, Deutschland) pipettiert, wobei folgendes Schema zur Kontrolle von Pipettierfehlern eingehalten wurde (Abbildung 10). Zusätzlich wurden vier Negativ-Kontrollen (dH<sub>2</sub>O) an ganz bestimmten Stellen der Platte eingefügt, um eventuelle Kontaminationen identifizieren zu können.



	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>												
<b>B</b>			NC									
<b>C</b>												
<b>D</b>					NC							
<b>E</b>							NC					
<b>F</b>												
<b>G</b>											NC	
<b>H</b>												

Abbildung 10: Aufbau des Pipettierschemas für eine 96er Platte. NC = Negativ Kontrolle. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Gohlke, Helmholtz-Zentrum München, Deutschland.)

Anschließend wurden die einzelnen Proben auf 1ng/µl verdünnt und auf 96er Clusterplatten überführt. Vier 96er Platten wurden mittels der Pipettierstation Genesis RSP 150 zu einer 384er Platte zusammengefasst (siehe Abbildung 11). Das eindeutig definierte Schema der Negativ-Kontrollen erlaubte es, eventuelle Rotationen der einzelnen 96er Platten zu kontrollieren, nachdem sie zu einer 384er Platte zusammengefügt wurden. Anschließend wurde die DNA (5µl) über Nacht luftgetrocknet und mit einer Konzentration von 5ng für die Genotypisierung eingesetzt.

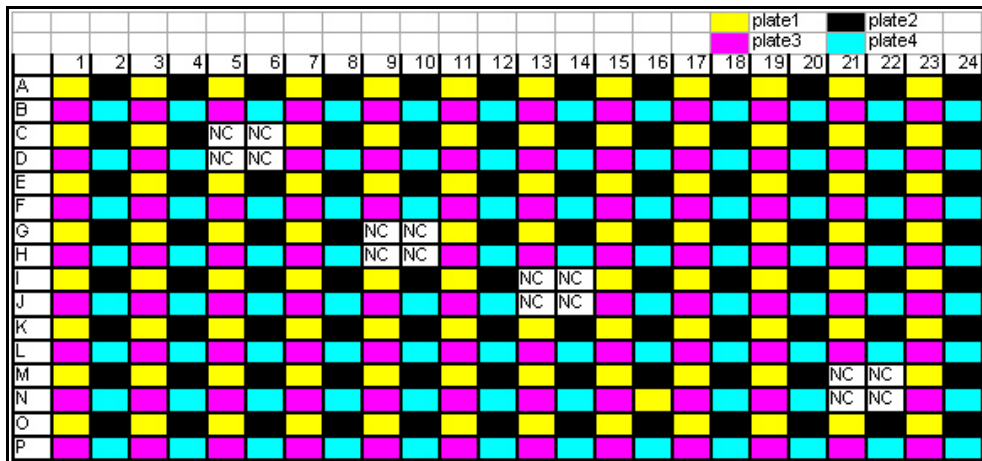


Abbildung 11: Aufbau des Pipettierschemas für eine 384er Platte, bestehend aus vier 96er Platten. NC = Negativ Kontrolle. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Gohlke, Helmholtz-Zentrum München, Deutschland.)

### 2.3.10.3 Der Versuchsablauf im Rahmen der hME-Reaktion

#### 2.3.10.3.1 Primer Design

Unter Verwendung des Programms MassARRAY Assay Designer 3.0 (Sequenom, San Diego, USA) wurden spezifische Primer für die Standard-PCR und die Primer-Extensions-PCR entworfen. Zusätzlich wurde an jeden Primer ein bekanntes, ca. 10bp großes „Motiv“ („Tag“) angehängt. Durch dieses „Motiv“ konnten aufgrund der unterschiedlichen Masse der entstehenden PCR-Produkte in einem Reaktionsgefäß (Multiplex) mehrere PCR-Reaktionen gleichzeitig durchgeführt werden. Diese zusätzlich angebrachte Sequenz („Tag“) an die SNP-spezifischen Primer ist notwendig für die Unterscheidung der Primer untereinander und der Primer-Extensions-PCR-Produkte. Alle Sense- und Antisense-Primer für die PCR-Reaktion und Primer für die Primer-Extensionsreaktion sind in Tabelle 6 aufgeführt.

## MATERIAL UND METHODEN

SNP	Sense- und Antisense Primer		hME-Primer (Extension)
A-1633G	1st	ACG TTG GAT GGA TGC TTA TTA GGG CAA TCG	TCA GGA AGA AAA TAA AAT AAT ACG AA
	2nd	ACG TTG GAT GAC CCA GAT GAG CTG TTC TTG	
C-1486G	1st	ACG TTG GAT GGT GGG GAA ATT CAT TCT GAC	TAG TGG TGG TGG AGG TTT T
	2nd	ACG TTG GAT GTA GAA CGC AGG GTA GTG GTG	
C-1407T	1st	ACG TTG GAT GAA TTC TGT GAC AGC TTC CCC	ACC ACC ACG CAG CTC CTC
	2nd	ACG TTG GAT GTT CTA AAG ACC CAA GGC ACG	
C-796A	1st	ACG TTG GAT GTT TCC TGA AGC GCT TGT CAC	GTG AGA TTA CCG TCC CTT CCC CA
	2nd	ACG TTG GAT GAA GAG TGA GAT TAC CGT CCC	
C-742G	1st	ACG TTG GAT GTT CTA ACT TCT GCA GCT CCG	ATG AAA GCT CCT GTG ATC AAC
	2nd	ACG TTG GAT GTG ACA AGC GCT TCA GGA AAG	
C-559T	1st	ACG TTG GAT GGC AAA AAC TTT GGC GTG GCC G	GGA GGG GAA TTA GGA AC
	2nd	ACG TTG GAT GTC ATC CTC GTG ACC AAT GGG	
A-434G	1st	ACG TTG GAT GAA TAG TCC GTT AGT TAG GGG	AAA ACT TTG GGA GTT TTT AGA G
	2nd	ACG TTG GAT GTC GAA AGC TCC TGC CAA AAC	
C-263A	1st	ACG TTG GAT GTC GCT TTA AAG GCG GCG CGG	CGG CCC CAG CGC CCC TCG CTC TC
	2nd	ACG TTG GAT GTC CCG TCT CCC TGG CTC CC	
T345C	1st	ACG TTG GAT GTG TTG TTG TTG CGG GTG ATG	GCG GCT GTC TCC GCT C
	2nd	ACG TTG GAT GTC CGA AGT CCC GGC TGG CTT	
C1561G	1st	ACG TTG GAT GCC CAA TTG TGA GAT TGC GAC	TTA CTG CCT AAC GGG CGA GCC GAC TAA
	2nd	ACG TTG GAT GAC TCC AGA GTA CTG CCT AAC	
G2255A	1st	ACG TTG GAT GAC AGT TTC AAG CCT TAC GGG	AGA AAG ACA AGA GGG C
	2nd	ACG TTG GAT GGA GCC AGA GGG AAG AAA GAC	
T3182A	1st	ACG TTG GAT GGG GAA GCC CAG TTC TTA AAT	ATA GGA AAT GTA TTG TGG CTG AA
	2nd	ACG TTG GAT GCA GCA GGT TCT GCC TAT TTG	
C3957T	1st	ACG TTG GAT GCT GGG CTA GGA GTC CAT AAC	TTT TTT TAT GCC AGG ACC CCC AT
	2nd	ACG TTG GAT GGA CCC CCA ACA TAC TCT CTC	
G4446A	1st	ACG TTG GAT GAG AAG CCA TCA GGT GGA GCC	GGC TCC TCT CGT CCT G
	2nd	ACG TTG GAT GTC TCA GCC TCG CCT TCA GAA C	
C4523G	1st	ACG TTG GAT GTT GTT TGG TGC AGA GAA CGC	CGA GTC CCT GGA CAT GG
	2nd	ACG TTG GAT GTG AGA GCG AGA GCA GCG ACT	

**Tabelle 6: Verwendete Sense-, Antisense- und hME-Primer für die 15 genotypisierten SNPs des HLX1-Gens.**

2.3.10.3.2 PCR-Reaktion

Auf einer 384er Mikrotiterplatte wurde für die PCR-Reaktion 6µl PCR Mastermix (Tabelle 7) zu 5ng der luftgetrockneten DNA pipettiert. Die Amplifikation jedes Fragments (ca. 100bp) wurde in einem Thermocycler MJ research (Waltham, USA) unter standardisierten Bedingungen durchgeführt (Tabelle 8). Um den Erfolg der PCR-Reaktion und die Größe der entstandenen PCR-Produkte beurteilen zu können, wurde 1µl der PCR-Reaktion von einer Reihe (24 Proben) der Mikrotiterplatte auf ein 3%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Eventuelle Kontaminationen des Mastermixes, konnten durch die mitgeführte Negativ-Kontrolle ausgeschlossen werden.

Komponenten	Volumen für Einzelreaktion	Volumen für 384er Mikrotiterplatte (480x)	Konzentration
dNTP-Mix	0,6µl	288µl	2mM
MgCl <sub>2</sub>	0,24µl	115,2µl	25mM
PCR Puffer	0,6µl	288µl	10x
Primer forward	0,1µl	48µl	10mM
Primer reverse	0,1µl	48µl	10mM
HotStarTaq-DNA-Polymerase	0,02µl	9,6µl	5U/µl
dH <sub>2</sub> O	4,34µl	2083,2µl	
<b>Volumen Total</b>	<b>6µl</b>	<b>278µl</b>	

Tabelle 7: Standard Mastermix für die PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.

Schritte	Temperatur	Zeit
1) Aktivierung	95°C	15 min
2) Denaturierung	95°C	30 sec
Annealing	56°C	30 sec
Elongation	72°C	1 min
	Wiederholung von 2) 45x	
3) Letzte Elongation	72°C	10 min

Tabelle 8: Standard-Protokoll für die PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.

2.3.10.3.3 Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) Reaktion

Das katalytische Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) wurde zu den PCR-Produkten hinzugefügt, um überschüssige dNTPs zu entfernen und somit einen eventuellen Einfluss auf die SNP-spezifische PCR-Reaktion zu unterbinden. Mittels einer Multimek 96er-Kanal Autopipette wurde 2µl eines Mastermixes, bestehend aus SAP, hME-Puffer und H<sub>2</sub>O (Tabelle 9) zum PCR-Produkt dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 37°C in einem Thermocycler wurde eine Inaktivierung des SAP Enzyms bei 85°C für 10 min durchgeführt.

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen für Einzelreaktion</b>	<b>Volumen für 384er Mikrotiterplatte (480x)</b>	<b>Konzentration</b>
hME-Puffer	0,17µl	81,6µl	10x
SAP(ShrimpAlkaline Phosphatase)	0,3µl	144 l	1U/µl
dH <sub>2</sub> O	1,53µl	734,4µl	
<b>Volumen Total</b>	<b>2µl</b>	<b>960µl</b>	

**Tabelle 9: Standard Mastermix für die SAP-Reaktion im Rahmen der hME-Methode.**

2.3.10.3.4 Primer-Extensionsreaktion

Mit Hilfe der Primer-Extensionsreaktion wird der Genotyp jeder einzelnen Probe identifiziert. Hierzu werden Primer (Tabelle 6) so konzipiert, dass entweder das 3'- oder 5'-Ende des Primers (je nachdem, ob es sich um einen Sense- oder Antisense-Primer handelt) unmittelbar vor dem zu untersuchenden SNP an das PCR-Produkt bindet. Durch die Verwendung von Didesoxynukleotid-Triphosphaten (ddNTP) kommt es je nach Vorliegen des entsprechenden Allels zum Kettenabbruch und damit zu unterschiedlich großen Extensionsprodukten, die sich in der MALDI-TOF analysieren lassen (Abbildung 9). Ein Beispiel: Ist der Genotyp eines Polymorphismus G/A, werden die ddNTP G, T und C und das dNTP A für die Primer-Extensionsreaktion verwendet. Dementsprechend stoppt die PCR-Reaktion, wenn das

homozygote G Allel besteht. Im Gegensatz dazu wird bei einem homozygoten, polymorphen Allel A das dNTP A und ein zusätzliches ddNTP eingebaut. Bei heterozygoten Individuen sind beide Bedingungen gegeben.

Die Primer-Extensionsreaktion wurde mit dem Enzym *Thermosequenase*, den Extensions-Primern (endgültige Konzentration 5,4µM) und dem Mastermix in 10µl-Reaktionsansätzen durchgeführt (Tabelle 10). Die Denaturierung der Primer-Extensionsreaktion erfolgte bei 94°C für 2 min, anschließend bei 94°C für 5 sec, bei 52°C für 5 sec und bei 72°C für 10 sec für 55 Zyklen. Alle notwendigen Pipettierschritte wurden mit der Multimek 96er-Kanal Autopipette und die Primer-Extensionsreaktion in einem Thermocycler MJ research durchgeführt.

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen für Einzelreaktion</b>	<b>Volumen für 384er Mikrotiterplatte (480x)</b>
hME Extend-Mix	0,2µl	96µl
hME-Primer	0,054µl	25,92µl
Thermosequenase (MassExtend Enzym)	0,018µl	8,64µl
dH <sub>2</sub> O	1,728µl	829,4µl
<b>Volumen Total</b>	<b>2µl</b>	<b>960µl</b>

**Tabelle 10: Standard Mastermix für die Primer-Extensionsreaktion im Rahmen der hME-Methode.**

#### 2.3.10.3.5 Aufreinigung der Extensions-Produkte

Im letzten Schritt wurden die Primer-Extensions-Produkte mittels eines Kationenaustauschharzes (SpectroCLEAN resin) aufgereinigt, um verbleibende Pufferbestandteile und Mg<sup>2+</sup> zu entfernen. Dazu wurden 16µl Wasser zu jeder Primer-Extensionsreaktion mit einer Multimek 96er-Kanal Autopipette pipettiert, so dass letztendlich ein Volumen von 26µl entstand. Anschließend wurde diese Lösung für 10 min geschüttelt und danach für 3min bei 800g in einer Eppendorf Zentrifuge 5810 zentrifugiert.

### 2.3.10.3.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Nach der beschriebenen Probenaufreinigung wurden 8-12nl des Analysengemisches mit Hilfe des Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems<sup>TM</sup> auf einen Siliziumchip transferiert, der mit einer kristallinen Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) beladen war. Zusätzlich zu den Proben wurden noch 10 weitere Matrixspots mit einem Kalibrator (Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse) des MALDI-TOF Systems beschickt. Der beladene Chip wurde anschließend auf einen metallischen Probenträger überführt und die Daten mittels Bruker Biflex Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer erfasst. Die Genotypisierung wurde in Real-Time mit der MASSARRAY RT Software durchgeführt.

### 2.3.11 Statistische Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurden statistische Analysen durchgeführt, um die Assoziation zwischen SNPs oder Haplotypen des HLX1-Gens und den wichtigsten Phänotypen Asthma, Atopie, atopische Dermatitis, Rhinitis allergica und dem Gesamt-IgE-Serum-Spiegel zu untersuchen.

#### 2.3.11.1 Assoziationsanalysen

##### 2.3.11.1.1 Qualitative Phänotypen (kategorische Variablen)

Mittels verschiedener Chi-Quadrat-Tests sowie Armitage-Trend-Tests konnte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Genotypen der HLX1-SNPs und bestimmten dichotomen Phänotypen besteht. Dabei wurde das Prinzip von Sasieni<sup>102</sup> verwendet, der verschiedene Modelle aufführt: Das *lineare* Modell, das eine Zu- oder Abnahme einer Krankheitswahrscheinlichkeit mit wachsender Anzahl eines Allels annimmt. Das *allelische* Modell, bei dem die Häufigkeit der Allele zwischen Patienten und Gesunden verglichen wird

und das *dominante* Modell (dominant auf dem seltenen Allel), das auch als „*serological*“ bezeichnet wird, fasst den heterozygoten mit dem homozygot polymorphen Genotyp zusammen und führt dann einen Vierfelder-Chiquadrattest durch. Zudem gibt es bei Sasiени noch zwei weitere Vierfelder-Chiquadrattests, bei denen einmal nur die Häufigkeit von Wildtyp und heterozygoten Genotyp und einmal die Häufigkeit von Wildtyp und Polymorphismus berücksichtigt wird.

```
Standardanalyse plus
SASIENI: HLX_CMIN559T_D (METHODE A: via Martin: doubling) -Asthma
Results of different tests asthma in HLX_CMIN559T_D
```

test	Odds Ratio	CI(Lower Bound)	CI(Upper Bound)	Chi-Square	p-value (Chi-Square test)	p-value (Fishers exact test)
Hetero vs. Wild	0.833	0.571	1.214	0.9056	0.3413	0.38949
Poly vs. Wild	1.189	0.723	1.955	0.4676	0.4941	0.51100
linear	1.023	0.799	1.308	0.0313	0.8595	.
alleles	1.024	0.794	1.321	0.0336	0.8547	0.84515
serological	0.917	0.650	1.294	0.2432	0.6219	0.66008

Abbildung 12: Beispiel für eine statistische Auswertungstabelle.

Für die nachfolgenden Ergebnisse wird das jeweilige verwendete Modell stets explizit angeführt. Lediglich das lineare Modell verlangt den Armitage-Trend-Test. Die anderen Modelle verwenden den Chi-Quadrat-Test, um eine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp zu berechnen. Als Effektmaß aller Tests gibt man die Odds-Ratio (Risiko-Ratio = OR) an, die das Chancenverhältnis zwischen zwei Gruppen beschreibt, eine Krankheit zu bekommen. Bei einer OR für Asthma von 2:1 für die Gruppen mit Mutation/ ohne Mutation bedeutet dies: Das Risiko an Asthma zu erkranken, ist in der Gruppe mit Mutation doppelt so hoch als in der Gruppe ohne Mutation. Odds Ratios werden immer mit einem 95%igen Konfidenzintervall angegeben (d.h. in 95% aller Ziehungen würde die wahre Odds Ratio innerhalb des Konfidenzintervalls liegen).



### 2.3.11.1.2 Quantitative Phänotypen (kontinuierliche Variablen)

Um die potentiellen Auswirkungen der Genotypen auf den IgE-Spiegel zu bestimmen, wurde getestet, ob sich die Mittelwerte zwischen den Genotypen signifikant unterscheiden. Dazu wurden zuerst univariante Varianzanalysen mit einer Nullhypothese durchgeführt, wobei man davon ausging, dass es keine Mittelwertunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen gibt (in dieser Arbeit zwischen verschiedenen Genotypen). Zusätzlich wurden die Mittelwertunterschiede in einem rezessiven Modell getestet, wobei der t-Test verwendet wurde. Im rezessiven Modell wurden der Wildtyp und der heterozygote Genotyp gemeinsam betrachtet und mit dem homozygot polymorphen Genotyp verglichen.

Sämtliche Tests wurden zweiseitig durchgeführt und als Signifikanzniveau wurde ein  $\alpha$  von 0,05 festgelegt. Die Assoziationsanalysen sowie die Tests auf Abweichungen vom HWE (= Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) wurden mit SAS 9.1.3 oder SAS/Genetics durchgeführt.

### 2.3.11.2 Haplotypanalyse

Ein Haplotyp ist eine Gruppe von Polymorphismen, die alle gemeinsam auf die nächste Generation übertragen werden. Im Vergleich zum Genotyp sind diese Polymorphismen auf einem „Einzelchromatid“ lokalisiert und nicht auf beiden Strängen des Chromosoms nachweisbar.

Die Haplotyp-Frequenzen wurden anhand des EM („expectation-maximization“) Algorithmus ermittelt und alle Haplotyp-Analysen mit dem SAS/Genetics durchgeführt. Um Assoziationen zwischen den Merkmalen des Genotyps (Asthma, Atopie und Rhinitis allergica, bemessen anhand des Prick-Tests) und des jeweiligen Haplotyps des HLX1 Gens beurteilen zu können, wurde ein Haplotyp-Regressions-Modell angewendet. Dabei wurde die mögliche

Wahrscheinlichkeit, mit der der Haplotyp gebildet wird, als unabhängige Variable in dieses Modell eingesetzt. Da der Test durch binäre Variablen beschränkt ist, mussten quantitative Merkmale, wie der IgE-Spiegel, in binäre Ergebnisse umgeformt werden.

### 2.3.11.3 Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)

Genotypfrequenzen werden durch Vererbungsmuster bestimmt, wobei man im Allgemeinen von einer zufälligen Paarung ausgehen kann. Dominante und rezessive Merkmale einer Population stehen dabei in einem Gleichgewicht. In den Jahren 1908 und 1909 zeigten G.H. Hardy und W. Weinberg<sup>103</sup> unabhängig voneinander, dass die Häufigkeit der Homozygoten und Heterozygoten über Generationen hinweg konstant bleibt, wenn folgende Voraussetzungen einer idealen Population gegeben sind: keine Selektionsvor- oder nachteile bestimmter Genotypen, eine vollständige genetische Mischung in der Population („Panmixie“), d.h. die Individuen können sich uneingeschränkt und mit gleicher Wahrscheinlichkeit paaren, eine sehr große oder unendliche Population, bei der es zu keiner Zu- und Abwanderung kommt. Die daraus resultierenden Nachkommen müssen dann wiederum die gleichen Überlebenschancen, die gleiche Fruchtbarkeit und die gleichen Paarungschancen haben<sup>104</sup>.

Das Modell von Hardy-Weinberg stellt die mathematische Beziehung zwischen der Allelfrequenz und der Genotypfrequenz dar, wobei man von zwei Allelen A und a und deren Allelfrequenzen p und q ausgeht<sup>105</sup>. p wird definiert als die Frequenz des dominanten Allels und q als die Frequenz des rezessiven Allels eines Merkmals. Das HWE beschreibt den Genotyp AA homozygot-dominant als  $p^2$ , Aa (oder aA) heterozygot als  $2pq$  und aa homozygot-rezessiv als  $q^2$ . Summe aller:  $p^2+2pq+q^2=1$  oder 100%.

Die Frequenzen der Gleichungen konstituieren das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium = HWE). Bei Abweichungen vom HWE wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet, bei dem die erwarteten Häufigkeiten aus den beobachteten Allelfrequenzen abgeleitet wurden. Eine signifikante Abweichung vom HWE deutet in der Praxis meist auf ein technisches Problem bei der Genotypisierung hin, weswegen das HWE daher zur Überprüfung der Genotypisierungsqualität verwendet wurde.

### 2.3.12 *In silico* Analysen

#### 2.3.12.1 Phylogenetische Analysen (VISTA Browser)

Phylogenetische Vergleiche werden verwendet, um Informationen über evolutionäre Beziehungen zwischen verschiedenen Organismen zu gewinnen. Dieser klassische Ansatz bedient sich der Suche, nach funktionell relevanten DNA-Sequenzen, die zwischen verschiedenen Organismen in einer langen Zeit der Evolution konserviert wurden. Nah verwandte Spezies zeigen üblicherweise eine weit übergreifende Übereinstimmung der Sequenzen, während die DNA von entfernt verwandten Organismen normalerweise große Unterschiede aufweisen. So konnte eine Konservierung kodierender Regionen und regulatorischer Sequenzen während der Evolution beobachtet werden. Durch die natürliche Auswahl werden bestimmte Gene und andere funktionelle Regionen erhalten. Sie erlaubt es jener DNA, die keine funktionelle Relevanz besitzt, schneller zu mutieren. Somit können phylogenetische Vergleiche zwischen evolutionär entfernten Spezies relevante Genregionen des menschlichen Genoms identifizieren, die eine vermeintlich wichtige funktionelle Rolle spielen. Nicht nur Exons oder der Promotor eines Gens, sondern auch regulatorische Elemente innerhalb eines Introns, können erkannt werden.

Die phylogenetischen Untersuchungen wurden mit der VISTA Genome Browser Software (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>) durchgeführt, die online zur Verfügung steht. Dieses Programm stellt die Ähnlichkeit von Sequenzen verschiedener Organismen in Prozent dar. Es können sowohl kleinere DNA-Fragmente als auch ganze Gene verglichen werden. Zudem wird die Lokalisation der Exons und der UTRs (untranslated regions) des jeweiligen Gens abgebildet. Anhand des Programms VISTA Browser können vermeintlich funktionelle Einflüsse auf genetisch interessante Regionen dargestellt werden.

Das HLX1-Gen des Menschen (*Homo sapiens*) wurde mit dem Genom des Schimpansen (*Pan troglodytes*), des Hundes (*Canis familiaris*) und der Maus (*Mus musculus*) verglichen, um gemeinsam konservierte Regionen der unterschiedlichen Spezies zu ermitteln.

### 2.3.12.2 Analyse von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (MAT-Inspector)

Polymorphismen haben unterschiedliche Auswirkungen auf ein Gen und seine Funktion. SNPs im Bereich eines Exons können zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen, was dann wiederum zu einer Funktionsänderung des entsprechenden Proteins führt. Dabei kann ein Basenaustausch entweder eine veränderte oder eine erhöhte Funktion des Proteins hervorrufen oder auch zu einem kompletten Funktionsverlust führen. Wenn der Basenaustausch im Bereich eines Exons jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz nimmt und die Funktion unverändert bleibt, spricht man von einer „stillen Mutation“.

Liegt der Basenaustausch jedoch im Bereich eines Introns, können möglicherweise regulatorische Elemente der Transkription betroffen sein. Dadurch können sich Bindungsmotive für DNA-bindende Proteine verändern und die Transkriptionsrate eines Gens beeinflussen. DNA-bindende Proteine sind z.B. Transkriptionsfaktoren, die für die Initiation

der RNA-Polymerase bei der Transkription von Bedeutung sind. Mehrere Arten von Transkriptionsfaktoren sind bekannt, wobei zwischen allgemeinen (basalen) und gewebe- bzw. zellspezifischen Transkriptionsfaktoren unterschieden werden kann.

Allgemeine Transkriptionsfaktoren sind ubiquitär, d.h. in allen Zellen eines Organismus verteilt und für jede Transkription notwendig. Sie können dabei entweder direkt an die DNA oder an andere Proteine eines Initiationskomplexes binden. Durch unterschiedliche Strukturen der Transkriptionsfaktoren entstehen auch unterschiedliche Aufgaben. Einige besitzen Bindungsstellen für wichtige Regulatoren, andere haben Proteinkinase-Funktionen oder zeigen Helicase-Aktivität. Spezifische Transkriptionsfaktoren dagegen vermitteln der Polymerase, welches Gen aktiviert werden soll. Sie sind daher nur in jenen Zellen vorhanden, in denen das Gen, das sie regulieren, aktiviert bzw. reprimiert werden soll. Die Transkriptionsfaktoren werden meist durch Proteinkinasen aktiviert und erkennen anschließend spezifische Sequenzen (cis-Elemente wie Enhancer oder Silencer) an die sie sich binden.

MAT-Inspector ist ein Programm zur Transkriptionsfaktor-Analyse, das Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren in Sequenzen bis max. 5000bp findet. Dabei wird ein mögliches Bindungspotential angegeben, jedoch nichts über die Funktionalität der gefundenen Bindungsstelle ausgesagt. Um darzustellen, wie gut die gefundene Bindungsstelle in der eingegebenen Sequenz mit der tatsächlichen Bindesequenz aus der Datenbank des Programms übereinstimmt, verwendet MAT-Inspector die Begriffe *core sequence*, *core similarity* und *matrix similarity*. Dabei wird die *core sequence* als Sequenz aufeinanderfolgender Positionen der Matrix definiert, die am höchsten konserviert sind (gewöhnlich vier). Das Maximum der *core similarity* von 1,0 wird nur erreicht, wenn die am höchsten konservierten Basen der

Matrix exakt mit der untersuchten Sequenz übereinstimmen. Wichtiger jedoch ist die *matrix similarity*, die die Übereinstimmung aller Basen der Matrize, nicht nur der *core sequence*, mit der untersuchten Sequenz prüft. Eine vollkommene Übereinstimmung, wenn alle Sequenzpositionen der Matrix entsprechen, erhält eine *matrix similarity* von 1,0. Bei einer „guten“ Übereinstimmung beträgt die *matrix similarity*  $> 0,8$ .

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnisse des Mutationenscreenings

##### 3.1.1 Amplifikation und Sequenzierung

Im Rahmen des vorliegenden Mutationenscreenings wurden 40 Probanden (= 80 Chromosomen) einer Zufallsstichprobe aus einer deutschen Population untersucht, um eventuelle Genveränderungen des HLX1-Gens identifizieren zu können.

Anfänglich wurde das HLX1-Gen in 16, sich überlappenden Fragmenten (mit je ca. 500 bp) eingeteilt. Da mit dieser Einteilung keine vollständige, lückenlose Darstellung des Gens zu erreichen war, mussten die Fragmente F3, F6, F7, F8, F9, F12, F13 und F14 erneut unterteilt und Primer entwickelt werden (gekennzeichnet mit einem „a“). Die Fragmente und die für die PCR eingesetzten Primer sind in Tabelle 1 unter 2.3.3.2 aufgelistet.

Somit konnten letztendlich insgesamt 22 Fragmente mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (2.3.3.2) aufgereinigt (2.3.5) und in die Sequenzierreaktion (2.3.6.2) eingesetzt werden. Je nach Struktur des zu sequenzierenden Fragments wurde vom 3'-, vom 5'-Ende oder zum Teil von beiden Seiten aufeinander zulaufend (vom 3'- und vom 5'-Ende) sequenziert. Für die Fragmente F2, F3, F7, F9, F13 und F14 wurden Sequenzierprimer hergestellt, die in die Mitte des Fragments gelegt wurden, um vom Inneren des Fragments überlappend in Richtung 3'-Ende oder 5'-Ende sequenzieren zu können. Die einzelnen Sequenzierprimer und die Leserichtung können aus Tabelle 4 (2.3.6.2) entnommen werden.

Das HLX1-Gen (auf Chromosom 1q41-q42) kann strukturell in folgende Abschnitte eingeteilt werden (Tabelle 11):

Bereiche des HLX1-Gens	Länge in bp
1. Proximaler Promotor	1.495
2. 5'UTR	439
3. 1. Exon	591
4. 1. Intron	745
5. 2. Exon	179
6. 2. Intron	783
7. 3. Exon	184
8. 3. Intron	1.849
9. 4. Exon	499
10. 3' UTR	350
11. Flankierende Region	805
<b>Basenpaare insgesamt</b>	<b>7.919</b>

Tabelle 11: Untersuchte Bereiche des HLX1-Gens und deren Länge in bp.

Die Einteilung der Fragmente des HLX1-Gens ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt:

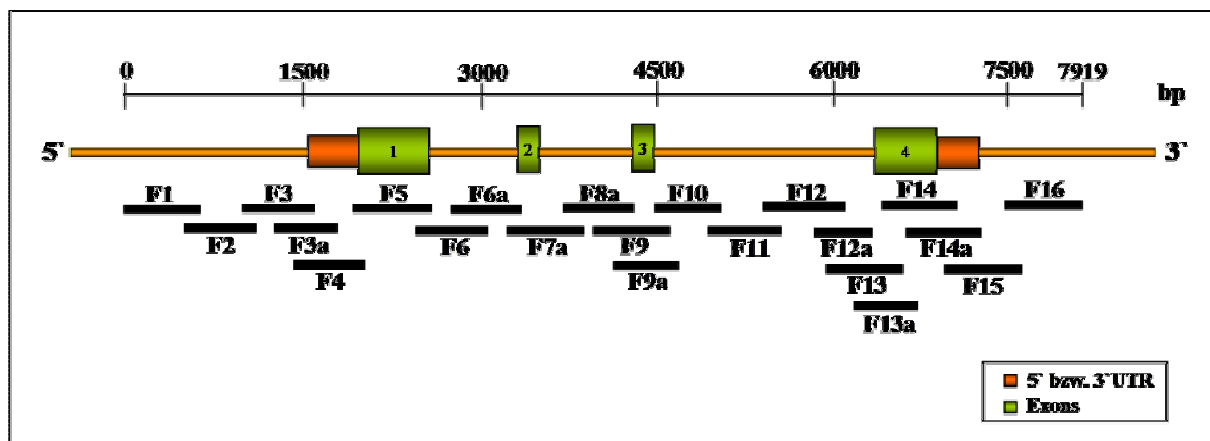


Abbildung 13: Schematische Darstellung des HLX1-Genoms. Die Exons sind grün markiert, flankiert von den orange markierten UTR. Für das untersuchte HLX1-Gen sind die sich überlappenden Fragmente schematisch dargestellt.

### 3.1.2 Identifizierung der Polymorphismen des HLX1-Gens

Durch die oben genannte Einteilung ergab sich letztendlich eine Anzahl von 1440 auszuwertenden Sequenzen. Dabei kam es zu je zwei Ausfällen in Fragment F4 und F11. Somit konnten bei 38 Probanden alle 22 Fragmente überlappend sequenziert werden. Die Sequenzen wurden durch den direkten Vergleich mit der Referenzsequenz AF 217621 (aus der genomischen Datenbank des National Center for Biotechnology Information



## ERGEBNISSE

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ausgewertet, wobei nur eindeutig analysierbare Sequenzen verwendet wurden (Abbildung 7).

In den zu untersuchenden Bereichen des HLX1-Gens konnten insgesamt 19 SNPs identifiziert werden. Drei der 19 identifizierten SNPs waren vor dieser Analyse noch nicht in der öffentlichen Datenbank (dbSNP) beschrieben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Alle drei Polymorphismen wurden an der NCBI Datenbank eingereicht und als Variationen dort aufgenommen. Nach Definition werden Polymorphismen als solche beschrieben, wenn sie innerhalb einer Population eine Häufigkeit von über 3% erreichen („Minor Allel Frequency“ (MAF) > 0,03). Genetische Variationen unterhalb dieser Frequenz werden als Mutationen gewertet.

SNP	Position der SNPs (in Relation zum ATG des Exon 1) <sup>(2)</sup>	Genposition	rs- Nummer <sup>(3)</sup>	Tagging SNP	MAF <sup>(5)</sup>
1	A-1633G <sup>(1)</sup>	Promotor	rs 41369048		0,09
2	C-1486G	Promotor	rs 2738751		0,1
3	C-1407T	Promotor	rs 3806325		0,24
4	C-796A <sup>(1)</sup>	Promotor	rs 41441946		0,05
5	C-742G	Promotor	rs 2184658		0,05
6	C-559T	Promotor	rs 2807857		0,31
7	A-434G	5'-UTR	rs 2738752		0,32
8	T-429G	5'-UTR	rs 12730158	C3958T	0,21
9	C-263A	5'-UTR	rs 2738754		0,25
10	T346C <sup>(4)</sup>	Exon 1	rs 12141189		0,41
11	C1562G	Intron 2	rs 17597773		0,36
12	G2256A	Intron 2	rs 2247213		0,35
13	T3009C	Intron 3	rs 1317189	A-434G	0,33
14	T3183A	Intron 3	rs 868058		0,27
15	C3958T <sup>(1)</sup>	Intron 3	rs 34180575		0,21
16	C4431T	Exon 4	rs 2738755	G2256A	0,34
17	G4447A	Exon 4	rs 3738182		0,18
18	C4524G	Exon 4	rs 11578466		0,09
19	C4844T	3'-UTR	rs 2738756	C4524G	0,09

**Tabelle 12: Bezeichnung und Lokalisation der SNPs im HLX1-Gen.**

<sup>(1)</sup>Neu beschriebene und in die NCBI Datenbank aufgenommene SNPs

<sup>(2)</sup>Basierend auf der NCBI GenBank Sequenz (Zugangsnummer: AF217621)

<sup>(3)</sup>Identifikationsnummer der SNP-Datenbank (<http://snpper.chip.org/bio/>)

<sup>(4)</sup>SNP führt zu einem Aminosäureaustausch

<sup>(5)</sup>Minor Allel Frequency der Screeningpopulation

Sechs SNPs des HLX1-Gens befinden sich im Promotorbereich (rs41369048, rs2738751, rs3806325, rs41441946, rs2184658, rs2807857), wovon SNP A-1633G (rs41369048) und C-796A (rs41441946) neu identifiziert wurden. Drei befinden sich in der 5' UTR (rs2738752, rs12730158, rs2738754), fünf in den Intronregionen (rs17597773, rs2247213, rs1317189, rs868058, rs34180575). Neu identifiziert wurde hiervon SNP C3958T (rs34180575). Ein SNP befindet sich in der 3' UTR (rs2738756). Vier bereits bekannte SNPs befinden sich in den kodierenden Regionen des HLX1-Gens. Im Exon 1 zeigte sich SNP T346C (rs12141189), der zu einem Aminosäureaustausch führte: Das neutrale Serin wurde gegen das polare Prolin ausgetauscht. Im Exon 4 befinden sich 3 SNPs, wovon zwei zu einem Aminosäureaustausch führen: C4431T (rs2738755) Prolin > Leucin, G4447A (rs3738182) und C4524G (rs11578466) Alanin > Glycin.

Die genauen Bezeichnungen und Lokalisationen der Polymorphismen können aus Abbildung 14 entnommen werden. Dabei entspricht die Bezeichnung der SNPs der Entfernung in Basenpaaren des ersten ATGs der CDS-Region (= Beginn der codierenden Region).

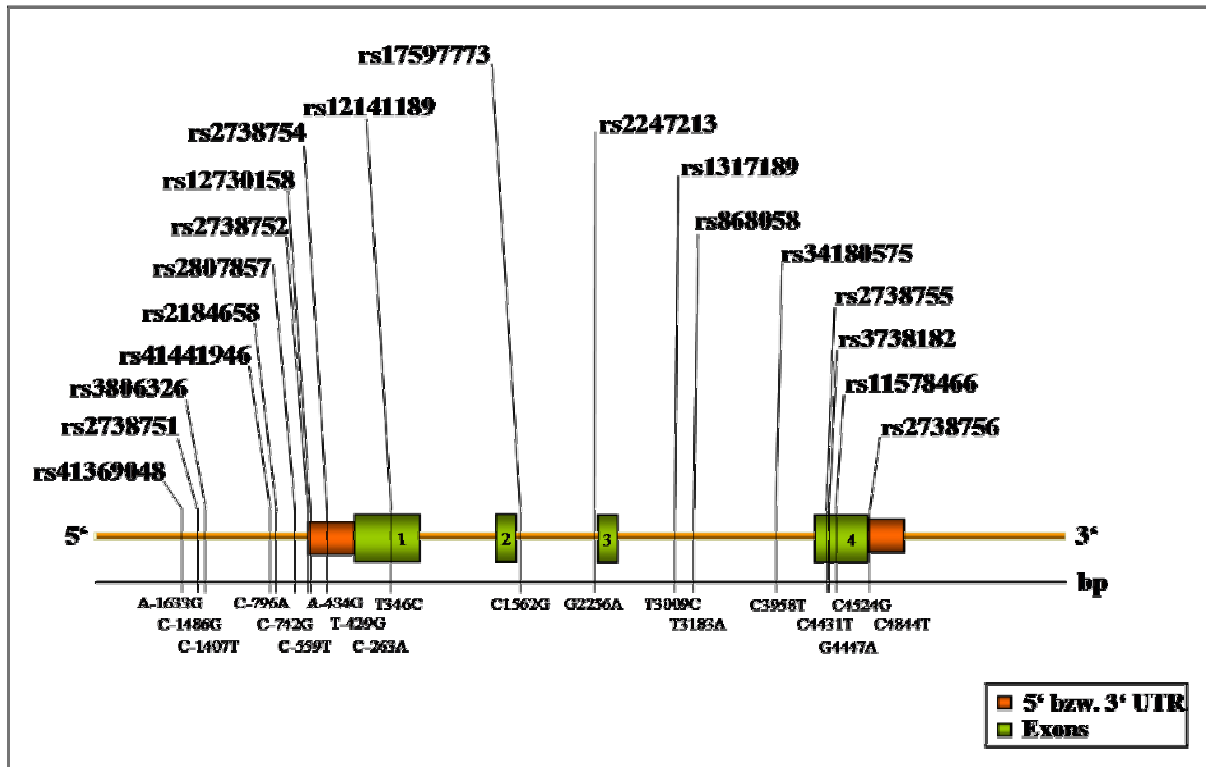


Abbildung 14: Schematische Darstellung des HLX-Gens mit den identifizierten SNPs.

In der 5' UTR, 428 bp proximal vom ersten ATG des Exon 1 entfernt, befindet sich eine insgesamt 31bp grosse Sequenz, die einen T- und einen C-Repeat (T=13, C=8) enthält. Diese Teilsequenz war durch die Sequenzierung schwer darstellbar. Bei der Sequenzierung vom 3'-, bzw. vom 5'-Ende kam es nach dem T- bzw. nach dem C-Repeat zu einem Abbruch der Sequenzierungsreaktion, so dass die 11 Basen zwischen den Repeats zum Teil gar nicht oder nur unvollständig dargestellt werden konnten. Aufgrund zahlreicher Deletionen und Insertionen in der gesamten Teilsequenz ist die Auswertung dieses „hypervariablen“ Bereichs nicht verwertbar. (Abbildung 15)

## ERGEBNISSE

---

```
3481 ctaattcccc tccaactcccc gctcccattg gtcacgagga tgaccaatga gcgctcggat
3541 cgaggtccta ccccgggcct gactcgaaag ctctgcca aactttggga gtttttagag
A-434G T-429G Hypervariabler Bereich
3601 acgagttttt ttttttttct attacttttc ccccccctaa ctaacggact attattggtg
3661 ttgttttaaa tttagctctt agggcttagc tatttggggt ttcttgcggt gtccggctcd
```

**Abbildung 15: Hypervariabler Bereich in der 5'UTR. Orange-gelb: Schwer sequenzierbarer Bereich. Die CTATTAC-Sequenz war vielfach nicht eindeutig darstellbar. Rot: SNP A-434G und T-429G, die sich vor dem T-Repeat befinden. Orange: 5'UTR.**

In der nachfolgenden Kopplungskarte (Abbildung 16) ist die Verteilung der SNPs des HLX1-Gens innerhalb der Mutationenscreening-Population schematisch dargestellt. Dabei erscheinen die Polymorphismen entweder in der heterozygoten Form (gelb markiert), wobei auf beiden DNA-Strängen unterschiedliche Basen erscheinen. Oder in der homozygoten Form (rot markiert). Hier sind die Basen beider DNA-Stränge gleichsinnig verändert und somit wiederum identisch.

Für die anschließende Assoziationsstudie, in der die Auswirkungen der identifizierten Polymorphismen auf die Entstehung von Asthma und asthma-assoziierten Erkrankungen untersucht werden, mussten zuvor SNPs für die Durchführung ausgewählt werden. In der Kopplungskarte lässt sich bereits an der Verteilung der Polymorphismen erkennen, dass bestimmte SNPs miteinander gekoppelt sind und somit auch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt werden.

ERGEBNISSE

Probanden-Nr.	A-1633G (1)	C-1486G	C-1407T	C-796A (1)	C-742G	C-559T	A-434G	T-429G	C-263A	T346C	C1562G	G2256A	T3009C	T3183A	C3958T (1)	C4431T	G4447A	C4524G	C4844T
1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	0	0	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
10	2	2	2	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	2	3	1	2	2
11	2	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	1	3	1	3	3
12	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2
13	1	1	1	1	1	3	0	0	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1
14	1	1	2	3	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1
15	1	1	2	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1
16	1	1	2	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1
17	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1
18	1	1	3	1	3	1	3	3	1	1	1	3	3	1	3	3	3	1	1
19	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
20	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
21	1	1	3	1	1	1	2	2	1	2	1	3	2	1	2	3	2	1	1
22	1	1	3	1	1	1	2	2	1	2	1	3	2	1	2	3	2	1	1
23	1	1	2	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1
24	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1
25	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1
26	1	1	1	3	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1
27	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	3	1	3	1	3	3	1	1	1	3	3	1	3	3	3	1	1
30	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1
31	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
32	1	1	3	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
35	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2
36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1

1 Wildtyp      2 Heterozygot SNP      3 Homozygot SNP

Abbildung 16: Kopplungskarte (Linkage Map) der HLX1-SNPs der Screening-Population. (0) = Nicht auswertbare Sequenzen, (1) = Neu identifizierte SNPs.

Mit dieser Information lassen sich bestimmte „SNP-Cluster“ bilden. Das heißt: Es wird aus einem Cluster gekoppelter SNPs lediglich ein SNP ausgewählt und genotypisiert.

Nachfolgend kann aus den gewonnenen Kenntnissen des einen SNPs auf die restlichen SNPs des Clusters geschlossen werden. Somit lässt sich die Anzahl der zu genotypisierenden SNPs reduzieren.

### 3.1.3 Analyse des Kopplungsverhaltens (Linkage Disequilibrium)

Mit Hilfe des Programms Haploview konnten die Kopplungsverhältnisse der identifizierten SNPs untereinander untersucht werden. Dabei wurden Gruppen von SNPs gebildet, die einen starken Zusammenhang zueinander haben. Es wurde pro Gruppe ein SNP ausgewählt („tagging SNP“), der stark mit den anderen SNPs gekoppelt ist und die Gruppe vertritt. Das Maß der Kopplung der SNPs untereinander dient als Linkage Disequilibrium und kann zwischen 0 und 1,0 liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Kopplungsgleichgewicht initial mit  $r^2=0,9$  berechnet.

Die Ergebnisse der Kopplungsanalyse sind schematisch in Abbildung 17 dargestellt, wobei die unterschiedliche Schattierung der Felder das Maß des Zusammenhangs wiedergibt: Schwarz steht für eine starke Kopplung ( $LD=1,0$ ) und Weiß für eine fehlende Kopplung der SNPs ( $LD=0$ ).

Auf diesem Weg wurden 15 Polymorphismen für die anschließende Genotypisierung des HLX1-Gens ausgewählt: A-1633G, C-1486G, C-1407T, C-796A, C-742G, C-559T, A-434G, C-263A, T346C, C1562G, G2256A, T3183A, C3958T, G4447A und C4524G. Die SNPs T3009C, C4431T, T-429G und C4844T sind mehr als 90% ( $> 0,9$ ) mit anderen SNPs gekoppelt. Aus diesem Grund konnte auf eine Genotypisierung dieser SNPs verzichtet werden. (Abbildung 17)

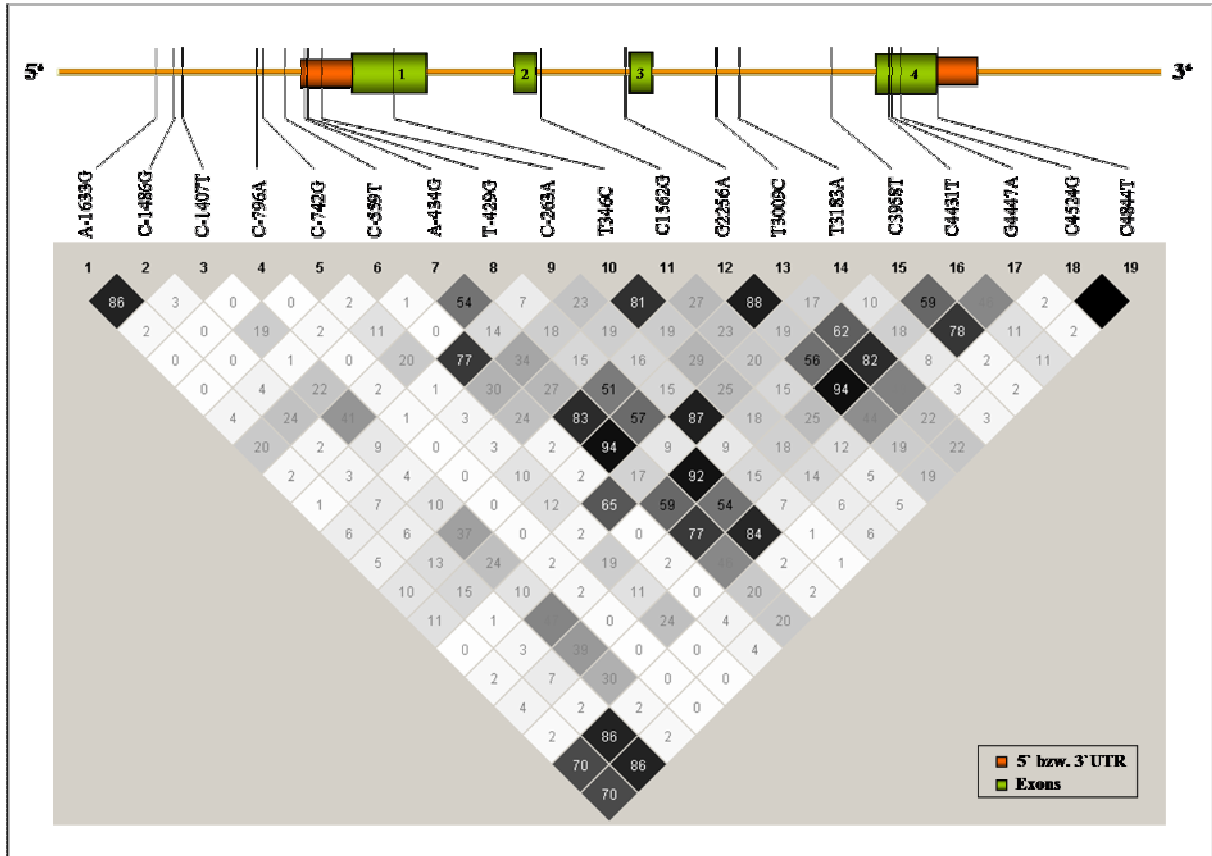


Abbildung 17: Grafische Darstellung des Linkage Disequilibrium. Schwarz: Starke Kopplung (LD=1), Weiß: fehlende Kopplung (LD=0). Bezeichnung der SNPs 1 bis 19 in Relation zum ATG des Exon 1.

### 3.2 Genotypisierung

In der vorliegenden Assoziationsstudie wurde ein eventueller Zusammenhang zwischen den in der Screeningpopulation identifizierten Polymorphismen und dem Auftreten von Asthma bronchiale und/oder anderen atopischen Erkrankungen anhand einer Studienpopulation untersucht. Die analysierten atopischen Phänotypen sind Asthma bronchiale, atopisches Asthma, nicht-atopisches Asthma und Atopie. Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich IgE, atopische Dermatitis und atopische Rhinitis werden gesondert dargestellt.

### 3.2.1 Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Wie bereits unter 2.3.11.3 beschrieben, wurde im Rahmen der statistischen Analyse der Hardy-Weinberg-Test als Qualitätskontrolle eingesetzt. Dieser Test überprüft den korrekten Ablauf der Genotypisierung. Unter Verwendung des Hardy-Weinberg-Gesetzes ( $p^2+2pq+q^2 = 1$ ) wurden die tatsächlich beobachteten Frequenzen mit den zu erwarteten Werten verglichen. Unter Normalbedingungen sollte die Häufigkeit der beiden homozygoten Genotypen ( $p =$  dominantes Allel,  $q =$  rezessives Allel) und die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps ( $= pq$ ) von Generation zu Generation konstant bleiben.

Bei der Genotypisierung der Dresdner Population zeigten mehrere SNPs (A-1633G, C-1486G, C-742G, C-559T, C-263A, T3183A und C4524G) eine Abweichung vom HWE. Für diese Abweichung können unterschiedliche Ursachen verantwortlich sein. Eine der häufigsten Ursachen sind methodische Fehler bei der Genotypisierung. Um eine technische Fehlerquelle ausschließen zu können, sollte eine Wiederholung der Genotypisierung unter unterschiedlichen chemischen Bedingungen durchgeführt werden. Auch biologische Effekte können zu einer Abweichung führen. Bei Bestätigung der Werte durch eine Regentypisierung können diese Effekte in Betracht gezogen werden. (Tabelle 13)



## ERGEBNISSE

Dresden			
SNP		Genotyp-Frequenz	p-Wert HWE
A-1633G	beobachtet	AA 0,77/AG 0,21/GG 0,01	<b>0,0005</b>
	erwartet	AA 0,78/AG 0,19/GG 0,23	
C-1486G	beobachtet	CC 0,74/CG 0,24/GG 0,02	<b>0,0015</b>
	erwartet	CC 0,75/CG 0,22/GG 0,03	
C-1407T	beobachtet	CC 0,66/CT 0,31/TT 0,04	0,3215
	erwartet	CC 0,66/CT 0,23/TT 0,04	
C-796A	beobachtet	AA <0,01/AC 0,04/CC 0,98	0,4095
	erwartet	AA <0,01/AC 0,03/CC 0,97	
C-742G	beobachtet	CC 0,67/CG 0,3/GG 0,03	<b>0,0410</b>
	erwartet	CC 0,68/CG 0,28/GG 0,04	
C-559T	beobachtet	CC 0,44/CT 0,45/TT 0,12	<b>0,0018</b>
	erwartet	CC 0,45/CT 0,42/TT 0,14	
A-434G	beobachtet	AA 0,45/AG 0,44/GG 0,11	0,7391
	erwartet	AA 0,45/AG 0,45/GG 0,12	
C-263A	beobachtet	AA 0,16/AC 0,48/CC 0,36	<b>&lt;0.0001</b>
	erwartet	AA 0,22/AC 0,36/CC 0,42	
T346C	beobachtet	CC 0,06/CT 0,38/TT 0,56	0,2225
	erwartet	CC 0,06/CT 0,39/TT 0,56	
C1562G	beobachtet	CC 0,56/CG 0,38/GG 0,06	0,1580
	erwartet	CC 0,55/CG 0,39/GG 0,06	
G2256A	beobachtet	AA 0,11/AG 0,44/GG 0,45	0,5513
	erwartet	AA 0,11/AG 0,44/GG 0,45	
T3183A	beobachtet	AA 0,13/AT 0,46/TT 0,42	<b>0,0012</b>
	erwartet	AA 0,14/AT 0,42/TT 0,44	
C3958T	beobachtet	CC 0,66/CT 0,31/TT 0,04	0,2734
	erwartet	CC 0,66/CT 0,30/TT 0,04	
G4447A	beobachtet	AA 0,04/AG 0,31/GG 0,66	0,3893
	erwartet	AA 0,04/AG 0,31/GG 0,66	
C4524G	beobachtet	CC 0,74/CG 0,24/GG 0,02	<b>0,0002</b>
	erwartet	CC 0,76/CG 0,22/GG 0,03	

**Tabelle 13: HWE-Ergebnisse der SNPs für die Dresden-Population.  
Vom HWE abweichende Ergebnisse = fett gedruckt**

### 3.3 Ergebnisse der Assoziationsstudie

Die Ergebnisse der Assoziationsstudie für die Dresden-Population werden im Folgenden für jeden Phänotyp in Tabellen demonstriert. Dabei werden die Risiko-Ratio-Werte („odds ratio“ = OR), das dazugehörige Konfidenzintervall (in Klammern) und der p-Wert dargestellt und die Ergebnisse in einem dazugehörigen Text erläutert.

### 3.3.1 HLX1 und Asthma bronchiale

Durch die Genotypisierung der Polymorphismen bei 1.940 Kindern der Dresdner Studienpopulation sollte die Assoziation mit atopischen Phänotypen untersucht werden. Zwischen den genotypisierten SNPs des HLX1-Gens und dem Auftreten eines kindlichen Asthma bronchiale zeigte sich bei mehreren SNPs ein signifikanter Zusammenhang. Bei SNP C-1407T (MAF 0,19, call rate 97,5%), C-742G (MAF 0,18, call rate 95,2%) und C3958T (MAF 0,19, call rate 98,7%) konnte ein signifikantes Ergebnis im Sinne eines erhöhten Risikos, an Asthma bronchiale zu erkranken, beobachtet werden. Alle drei Polymorphismen überschritten dabei das Signifikanzniveau von 0,05. (Tabelle 14)

SNP T346C (MAF 0,25, call rate 97,4%) und C1562G (MAF 0,25, call rate 97,1%) zeigten im Gegensatz dazu einen protektiven Effekt auf die Ausprägung des kindlichen Asthma bronchiale. Ein signifikanteres Ergebnis lieferte dabei SNP T346C (OR 0,621, 95% KI 0,431-0,893,  $p=0,0097$ ). Interessant ist, dass dieser Polymorphismus im Exon 1 zu einem Aminosäureaustausch führt. (Tabelle 14)

Um analysieren zu können, ob es sich bei den beobachteten Effekten um die atopische oder nicht-atopische Asthmaform handelt, wurde eine Untersuchung angeschlossen, um zwischen beiden Formen unterscheiden zu können. (Tabellen 15,16)

Dresden			
SNP / Phänotyp	Asthma bronchiale	SNP / Phänotyp	Asthma bronchiale
A-1633G	OR=1,212 (0,814-1,807) p=0,3434	T346C	<b>OR=0,621</b> <b>(0,431-0,893)</b> <b>p=0,0097</b>
C-1486G	OR=0,994 (0,669-1,478) p=0,9766	C1562G	<b>OR=0,628</b> <b>(0,437-0,902)</b> <b>p=0,0113</b>
C-1407T	<b>OR=1,445</b> <b>(1,019-2,050)</b> <b>p=0,0379</b>	G2256A	OR=1,282 (0,903-1,820) p=0,1639
C-796A	OR=0,951 (0,339-2,669) p=0,9242	T3183A	OR=0,886 (0,628-1,252) p=0,4932
C-742G	<b>OR=1,444</b> <b>(1,010-2,062)</b> <b>p=0,0428</b>	C3958T	<b>OR=1,428</b> <b>(1,007-2,024)</b> <b>p=0,0446</b>
C-559T	OR=0,917 (0,650-1,294) p=0,6219	G4447A	OR=1,373 (0,967-1,950) p=0,0753
A-434G	OR=1,239 (0,873-1,758) p=0,2303	C4524G	OR=1,025 (0,685-1,534) p=0,9039
C-263A	OR=1,014 (0,679-1,513) p=0,9471		

**Tabelle 14: Assoziation der SNPs mit Asthma bronchiale in der Dresden-Population.**  
(signifikante Ergebnisse ( $\alpha < 0,05$ ) sind fett gedruckt)

### 3.3.2 HLX1 und atopisches Asthma

Bei der Analyse der SNPs C-1407T, C-742G und C3958T konnte bereits ein signifikant erhöhtes Risiko, an Asthma bronchiale zu erkranken, beobachtet werden. In der weiterführenden Untersuchung, um welche Asthmaform es sich handelt, zeigten die oben genannten Polymorphismen eine signifikante Assoziation zu atopischem Asthma. Im Vergleich zum untersuchten Phänotyp Asthma wiesen die SNPs beim Phänotyp atopisches Asthma eine leichte höhere Signifikanz auf und überschritten das Signifikanzniveau erneut eindeutig.

Die sich protektiv auf Asthma auswirkenden SNPs T346C und C1562G zeigten keine Assoziation zu atopischem Asthma. (Tabelle 15)

Dresden			
SNP / Phänotyp	Atopisches Asthma	SNP / Phänotyp	Atopisches Asthma
A-1633G	OR=1,148 (0,635-2,072) p=0,6479	T346C	OR=0,717 (0,424-1,210) p=0,2108
C-1486G	OR=0,950 (0,527-1,713) p=0,8638	C1562G	OR=0,721 (0,426-1,220) p=0,2209
C-1407T	<b>OR=1,713</b> <b>(1,034-2,840)</b> <b>p=0,0348</b>	G2256A	OR=1,469 (0,872-2,474) p=0,1463
C-796A	OR=0,525 (0,071-3,863) p=0,5201	T3183A	OR=0,674 (0,407-1,117) p=0,1235
C-742G	<b>OR=1,709</b> <b>(1,021-2,862)</b> <b>p=0,0394</b>	C3958T	<b>OR=1,693</b> <b>(1,021-2,806)</b> <b>p=0,0391</b>
C-559T	OR=0,688 (0,416-1,140) p=0,1446	G4447A	OR=1,599 (0,960-2,663) p=0,0690
A-434G	OR=1,419 (0,843-2,391) p=0,1862	C4524G	OR=1,003 (0,554-1,815) p=0,9924
C-263A	OR=0,689 (0,385-1,233) p=0,2077		

Tabelle 15: Assoziation der SNPs mit atopischem Asthma in der Dresden-Population. (signifikante Ergebnisse ( $\alpha < 0,05$ ) sind fett gedruckt)

### 3.3.3 HLX1 und nicht-atopisches Asthma

Der Vergleich zwischen der Assoziation zu Asthma bronchiale und nicht-atopischem Asthma, zeigte einen leicht reduzierten, aber trotzdem signifikant protektiven Effekt der Polymorphismen T346C und C1562G. Die Polymorphismen C-1407T, C-742G und C3958T wiesen keine Assoziation zu nicht-atopischem Asthma auf. (Tabelle 16)

Dresden			
SNP / Phänotyp	Nicht-atopisches Asthma	SNP / Phänotyp	Nicht-atopisches Asthma
A-1633G	OR=1,175 (0,661-2,087) p=0,5817	T346C	<b>OR=0,502</b> <b>(0,292-0,864)</b> <b>p=0,0113</b>
C-1486G	OR=0,953 (0,538-1,689) p=0,8702	C1562G	<b>OR=0,518</b> <b>(0,304-0,883)</b> <b>p=0,0140</b>
C-1407T	OR=1,148 (0,688-1,914) p=0,5969	G2256A	OR=1,013 (0,619-1,660) p=0,9578
C-796A	OR=1,551 (0,472-5,102) p=0,4663	T3183A	OR=1,351 (0,809-2,255) p=0,2488
C-742G	OR=1,127 (0,666-1,908) p=0,6549	C3958T	OR=1,134 (0,680-1,891) p=0,6295
C-559T	OR=1,412 (0,848-2,353) p=0,1829	G4447A	OR=1,110 (0,665-1,850) p=0,6902
A-434G	OR=0,979 (0,598-1,604) p=0,9338	C4524G	OR=0,961 (0,533-1,734) p=0,8951
C-263A	OR=1,726 (0,937-3,183) p=0,0767		

Tabelle 16: Assoziation der SNPs mit nicht-atopischem Asthma in der Dresden-Population. (signifikante Ergebnisse ( $\alpha < 0,05$ ) sind fett gedruckt)

### 3.3.4 HLX1 und Atopie

Zwischen den genotypisierten Polymorphismen des HLX1-Gens und dem Auftreten einer atopischen Sensibilisierung (=Atopie) konnte kein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden. (Tabelle 17)

Dresden			
SNP / Phänotyp	Atopie	SNP / Phänotyp	Atopie
<b>A-1633G</b>	OR=1,073 (0,834-1,380) p=0,5848	<b>T346C</b>	OR=0,870 (0,704-1,074) p=0,1949
<b>C-1486G</b>	OR=1,076 (0,849-1,364) p=0,5452	<b>C1562G</b>	OR=0,871 (0,706-1,076) p=0,2004
<b>C-1407T</b>	OR=1,104 (0,887-1,374) p=0,3765	<b>G2256A</b>	OR=1,182 (0,959-1,458) p=0,1176
<b>C-796A</b>	OR=0,949 (0,512-1,756) p=0,8666	<b>T3183A</b>	OR=1,019 (0,827-1,255) p=0,8606
<b>C-742G</b>	OR=1,084 (0,866-1,357) p=0,4804	<b>C3958T</b>	OR=1,109 (0,893-1,378) p=0,3501
<b>C-559T</b>	OR=0,989 (0,803-1,219) p=0,9205	<b>G4447A</b>	OR=1,100 (0,884-1,369) 0,3908
<b>A-434G</b>	OR=1,172 (0,950-1,447) p=0,1381	<b>C4524G</b>	OR=1,138 (0,896-1,445) p=0,2887
<b>C-263A</b>	OR=0,988 (0,783-1,247) p=0,9215		

**Tabelle 17: Assoziation der SNPs mit Atopie in der Dresden-Population.**  
(signifikante Ergebnisse ( $\alpha < 0,05$ ) sind fett gedruckt)

### 3.3.5 Weitere Ergebnisse der Genotypisierung des HLX1-Gens

Die identifizierten Polymorphismen der Screeningpopulation zeigten in der Assoziationsstudie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Phänotypen atopische Dermatitis, Heuschnupfen und Gesamt-IgE.

### 3.3.6 Haplotypanalyse

Eine Haplotypanalyse wurde durchgeführt, um Informationen darüber zu erhalten, inwieweit die Kombination verschiedener Allele (Haplotypen) die Entstehung von Asthma beeinflusst. Dargestellt werden die am häufigsten vorkommenden Kombinationen der identifizierten Polymorphismen in Wildtyp- bzw. polymorpher Form und deren Assoziation zu Asthma bronchiale, atopischem Asthma bzw. nicht-atopischem Asthma. (Tabelle 19-21)

Die Haplotypanalyse der vorliegenden Arbeit basiert auf Ergebnissen einer weiterführenden Analyse des HLX1-Gens von Kathrin Suttner *et al.* Durch eine Wiederholung des Linkage Disequilibrium mit einer Abrissgrenze von  $r^2 = 0,8$  des in dieser Arbeit beschriebenen Mutationenscreenings konnten spezifische SNPs für die Haplotypanalyse identifiziert werden. Die 19 Polymorphismen konnten so in 5 Blöcke eingeteilt werden, wobei ein SNP, der so genannte „tagging“-SNP, den jeweiligen Block repräsentierte (C-1486G, C-1407T, T346C, G2256A und T3183A). (SNP C-796A wurde aus den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen, da die MAF < 3% betrug.) Kathrin Suttner *et al.* führte anschließend eine Assoziationsstudie und Haplotypanalyse der identifizierten Polymorphismen an einer Gesamtpopulation (n = 3.099), bestehend aus einer Dresdner (n = 1.940) und Münchner Population (n = 1.159) durch. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der Dresden-Population isoliert dargestellt. (Die Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kathrin Suttner *et al.*) Die Blöcke und die „tagging“-SNPs können aus Tabelle 18 entnommen werden.

## ERGEBNISSE

SNPs	Position der SNPs <sup>(1)</sup>	Genposition	MAF <sup>(4)</sup>	LD ( $r^2=0,8$ ) <sup>(4)</sup>	Block	Tagging SNP	Call R%	p-HWE
1 <sup>(2)</sup>	A-1633G	Promotor	0,09 <sup>(5)</sup>	0,86 <sup>(5)</sup>	1			-
2	C-1486G	Promotor	0,14	1	1	C-1486G	98,8	0,0303 <sup>(7)</sup>
3	C-1407T	Promotor	0,19	1	2	C-1407T	97,5	0,1869
4 <sup>(2)</sup>	C-796A	Promotor	0,05	1	n.a. <sup>(6)</sup>			
5	C-742G	Promotor	0,18	0,98	2		-	-
6	C-559T	Promotor	0,34	0,98	5		-	-
7	A-434G	5' UTR	0,32 <sup>(5)</sup>	0,83 <sup>(5)</sup>	4		-	-
8	T-429G	5' UTR	0,21 <sup>(5)</sup>	1 <sup>(5)</sup>	2		-	-
9	C-263A	5' UTR	0,25 <sup>(5)</sup>	0,87 <sup>(5)</sup>	5		-	-
10	T346C <sup>(3)</sup>	Exon 1	0,25	1	3	T346C	97,4	0,9735
11	C1562G	Intron 2	0,36 <sup>(5)</sup>	0,81 <sup>(5)</sup>	3		-	-
12	G2256A	Intron 2	0,33	1	4	G2256A	98,2	0,4336
13	T3009C	Intron3	0,30 <sup>(5)</sup>	0,88 <sup>(5)</sup>	4		-	-
14	T3183A	Intron 3	0,35	1	5	T3183A	95,1	<,0001 <sup>(7)</sup>
15 <sup>(2)</sup>	C3958T	Intron 3	0,19	0,98	2		-	-
16	C4431T <sup>(3)</sup>	Exon 4	0,31 <sup>(5)</sup>	0,94 <sup>(5)</sup>	4		-	-
17	G4447A	Exon4	0,19	0,98	2		-	-
18	C4524G <sup>(3)</sup>	Exon4	0,09 <sup>(5)</sup>	0,86 <sup>(5)</sup>	1		-	-
19	C4844T	3'UTR	0,09 <sup>(5)</sup>	0,86 <sup>(5)</sup>	1		-	-

**Tabelle 18: Daten der weiterführenden Analyse des HLX1-Gens mit einer Abrissgrenze von  $r^2 = 0,8$  im Linkage Disequilibrium. (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kathrin Suttner)**

<sup>(1)</sup>Basierend auf der NCBI GenBank Sequenz (Zugangsnummer: AF217621)

<sup>(2)</sup>Neu identifizierte SNPs

<sup>(3)</sup>Polymorphismen, die zu einem Aminosäureaustausch führen

<sup>(4)</sup>Basierend auf den Ergebnissen der Genotypisierung der Dresden-Population (n = 1.940)

<sup>(5)</sup>Ergebnisse der Screeningpopulation

<sup>(6)</sup>Dieser SNP zeigte eine MAF von 5% in der Screeningpopulation, und nur 2% in der Dresden-Population. Dieser SNP wurde aus den folgenden Analysen ausgeschlossen, da die erforderliche MAF von 3% nicht erreicht wurde. (n.a. = nicht analysiert)

<sup>(7)</sup>SNPs, die eine starke Abweichung des HWE zeigten. Diese wurden regenotypisiert. Die Ergebnisse konnten bei beiden SNPs bestätigt werden. Damit konnte ein technischer Fehler während der Genotypisierung ausgeschlossen werden.

Die Haplotypanalyse der fünf „tagging“-SNPs identifizierte fünf Haplotypen (H\_a bis H\_e), die eine Häufigkeit von > 3% zeigten. Die dabei am häufigsten vorkommende Kombination der Polymorphismen erreichte einen Wert von 34,5%.

Der Haplotyp H\_b (C-C-C-G-T) zeigte dabei einen starken protektiven Effekt gegenüber Asthma bronchiale (OR 0,462, 95%CI (0,246-0,866), p = 0,0159), wobei lediglich SNP T346C in der polymorphen Form vorlag. Die restlichen SNPs sind in dieser Kombination als



## ERGEBNISSE

Wildtypform beteiligt. Daraus kann geschlossen werden, dass bei dem Vorkommen dieser Kombination ein signifikant vermindertes Risiko, an Asthma bronchiale zu erkranken, vorliegt. Zusätzlich zeigte Haplotyp H<sub>c</sub> (C-T-T-A-T) eine grenzwertig signifikante Assoziation zu Asthma (OR 1,761, 95%CI (0,989-3,134), p = 0,0546). Dabei waren SNP C-1407T und G2256A in der polymorphen Form beteiligt und die restlichen SNPs in der Wildtypform. (Tabelle 19)

Asthma bronchiale										
	C-1486G	C-1407T	T346C	G2256A	T3183A	Kontrollen	Fälle	Komplette Studienpopulation	OR (CI) HTR	p-Wert HTR
H <sub>a</sub>	C	C	T	G	A	34,45%	34,78%	34,47%	1,028 (0,626-1,687)	0,9143
H <sub>b</sub>	C	C	C	G	T	<b>25,69%</b>	<b>19,20%</b>	<b>25,19%</b>	<b>0,462 (0,246-0,866)</b>	<b>0,0159</b>
H <sub>c</sub>	C	T	T	A	T	18,75%	23,55%	19,12%	1,761 (0,989-3,134)	0,0546
H <sub>d</sub>	G	C	T	A	T	13,42%	14,49%	13,51%	1,178 (0,602-2,307)	0,6320
H <sub>e</sub>	C	C	T	G	T	6,99%	7,61%	7,04%	1,186 (0,481-2,919)	0,7112

**Tabelle 19: Haplotypfrequenzen der Dresden-Population (n = 1.940), gebildet aus den fünf „tagging“-SNPs (C-1486G, C-1407T, T346C, G2256A und T3183A) und die Assoziation der Haplotypen mit Asthma bronchiale (p-Wert, Odds Ratio und 95% Confidence Intervall der Haplotyp trend regression = HTR). (signifikante Ergebnisse ( $\alpha < 0,05$ ) sind fett gedruckt). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kathrin Suttner.**

Bei der Analyse der Suptypen des Asthmas bronchiale zeigte Haplotyp H<sub>c</sub> einen signifikanten Effekt, der das Risiko an atopischem Asthma zu erkranken, stark erhöht (OR 2,417, 95%CI (1,080-5.409), p = 0,0319). Diese Kombination an Polymorphismen zeigt nicht nur gegenüber Asthma, sondern speziell zum Subphänotyp atopisches Asthma eine eindeutige Signifikanz. (Tabelle 20)

## ERGEBNISSE

atopisches Asthma										
	C-1486G	C-1407T	T346C	G2256A	T3183A	Kontrollen	Fälle	Komplette Studienpopulation	OR (CI) HTR	p-Wert HTR
H_a	C	C	T	G	A	34,45%	30,65%	34,31%	0,725 (0,343-1,533)	0,3996
H_b	C	C	C	G	T	25,69%	21,77%	25,55%	0,638 (0,264-1,542)	0,3186
H_c	C	T	T	A	T	<b>18,75%</b>	<b>26,61%</b>	<b>19,03%</b>	<b>2,417 (1,080-5,409)</b>	<b>0,0319</b>
H_d	G	C	T	A	T	13,42%	12,90%	13,41%	0,918 (0,327-2,579)	0,8714
H_e	C	C	T	G	T	6,99%	8,07%	7,04%	1,332 (0,372-4,766)	0,6591

**Tabelle 20: Haplotypfrequenzen der Dresden-Population (n = 1.940), gebildet aus den fünf „tagging“-SNPs (C-1486G, C-1407T, T346C, G2256A und T3183A) und die Assoziation der Haplotypen mit atopischem Asthma (p-Wert, Odds Ratio und 95% Confidence Intervall der Haplotyp trend regression = HTR). (signifikante Ergebnisse ( $\alpha < 0,05$ ) sind fett gedruckt). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kathrin Suttner.**

Eine eindrucksvolle Signifikanz zum Subtyp nicht-atopisches Asthma zeigte Haplotyp H\_b (OR 0,275, 95%CI (0,103-0,734), p = 0,0099). Wie in der Haplotypanalyse von Asthma bronchiale, zeigte dieser Haplotyp hier einen stark protektiven Effekt und vermindert damit das Risiko, an nicht-atopischem Asthma zu erkranken. (Tabelle 21)

nicht-atopisches Asthma										
	C-1486G	C-1407T	T346C	G2256A	T3183A	Kontrollen	Fälle	Komplette Studienpopulation	OR (CI) HTR	p-Wert HTR
H_a	C	C	T	G	A	34,45%	42,19%	34,73%	1,842 (0,923-3,676)	0,0829
H_b	C	C	C	G	T	<b>25,69%</b>	<b>15,63%</b>	<b>25,32%</b>	<b>0,275 (0,103-0,734)</b>	<b>0,0099</b>
H_c	C	T	T	A	T	18,75%	20,31%	18,81%	1,214 (0,510-2,890)	0,6611
H_d	G	C	T	A	T	13,42%	13,45%	13,45%	1,104 (0,415-2,938)	0,8423
H_e	C	C	T	G	T	6,99%	7,00%	7,00%	1,010 (0,265-3,846)	0,9884

**Tabelle 21: Haplotypfrequenzen der Dresden-Population (n = 1.940), gebildet aus den fünf „tagging“-SNPs (C-1486G, C-1407T, T346C, G2256A und T3183A) und die Assoziation der Haplotypen mit nicht-atopischem Asthma (p-Wert, Odds Ratio und 95% Confidence Intervall der Haplotyp trend regression = HTR). (signifikante Ergebnisse ( $\alpha < 0,05$ ) sind fett gedruckt). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kathrin Suttner.**

### 3.4 *In silico* Analysen

#### 3.4.1 Phylogenetische Analyse

Durch die Assoziationsstudie konnte gezeigt werden, dass fünf der untersuchten Polymorphismen eine Assoziation zu atopischen Phänotypen in Abhängigkeit des Genotyps aufweisen. Im Folgenden wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt, um Hinweise dafür zu bekommen, inwieweit der Grad der Konservierung eines Genabschnitts einen Einfluss auf dessen Funktion ausübt. Frühere systemische Studien belegten, dass Genabschnitte, die wichtige Funktionen erfüllen, wie z.B. Exons oder Promotoren, durch die Evolution kaum verändert werden. Das heißt: Je konservierter ein Genabschnitt (mit eventuell enthaltenden SNPs) über die Evolution hindurch vorliegt, desto stärker deutet dies auf eine funktionelle Relevanz hin. Liegen Polymorphismen in einem derartig konservierten Bereich, ist dies umso relevanter, da die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Bedeutung des SNPs damit steigt.

##### 3.4.1.1 Phylogenetischer Vergleich von Mensch – Schimpanse – Hund – Maus

Mit Hilfe des Programms Vista Browser konnte der Konservierungsgrad des HLX1-Gens des menschlichen Genoms und des Genoms des Schimpansen, des Hundes und der Maus vergleichend dargestellt werden (Abbildung 18). Wie zu erwarten, zeigte sich eine sehr hohe Homologie zwischen dem gesamten Genom des Menschen und des Schimpansen, und im Bereich der Exone zwischen allen dargestellten Spezies. Auffällig zeigte sich das Exon 4 und die 3' UTR des Hundes. Lediglich die Hälfte des Exons und die Hälfte der 3'-UTR bleiben konserviert. Dieser Bereich scheint im Genom des Hundes keine funktionelle Bedeutung zu haben.

## ERGEBNISSE

Der im Exon 1 lokalisierte SNP T346C, der zu einem Aminosäureaustausch führt, zeigt bei dem Vergleich zwischen dem menschlichen Genom und dem Genom des Schimpansen, des Hundes und der Maus eine auffällig hohe Konservierung (80-90%). Da, wie bereits erwähnt, funktionell wichtige Genabschnitte während der Evolution hoch konserviert bleiben, ist diese Beobachtung jedoch nicht unerwartet. Die anderen vier SNPs zeigen eine hohe Konservierung im Schimpansen-Genom. Im Vergleich zum Hund- und Maus-Genom ist die Konservierungsrate bei SNP C-1407T am höchsten. SNP C-742G, C1562G und C3958T weisen eine Übereinstimmung von lediglich 50% und weniger auf, was auf keine funktionelle Relevanz hinweist.

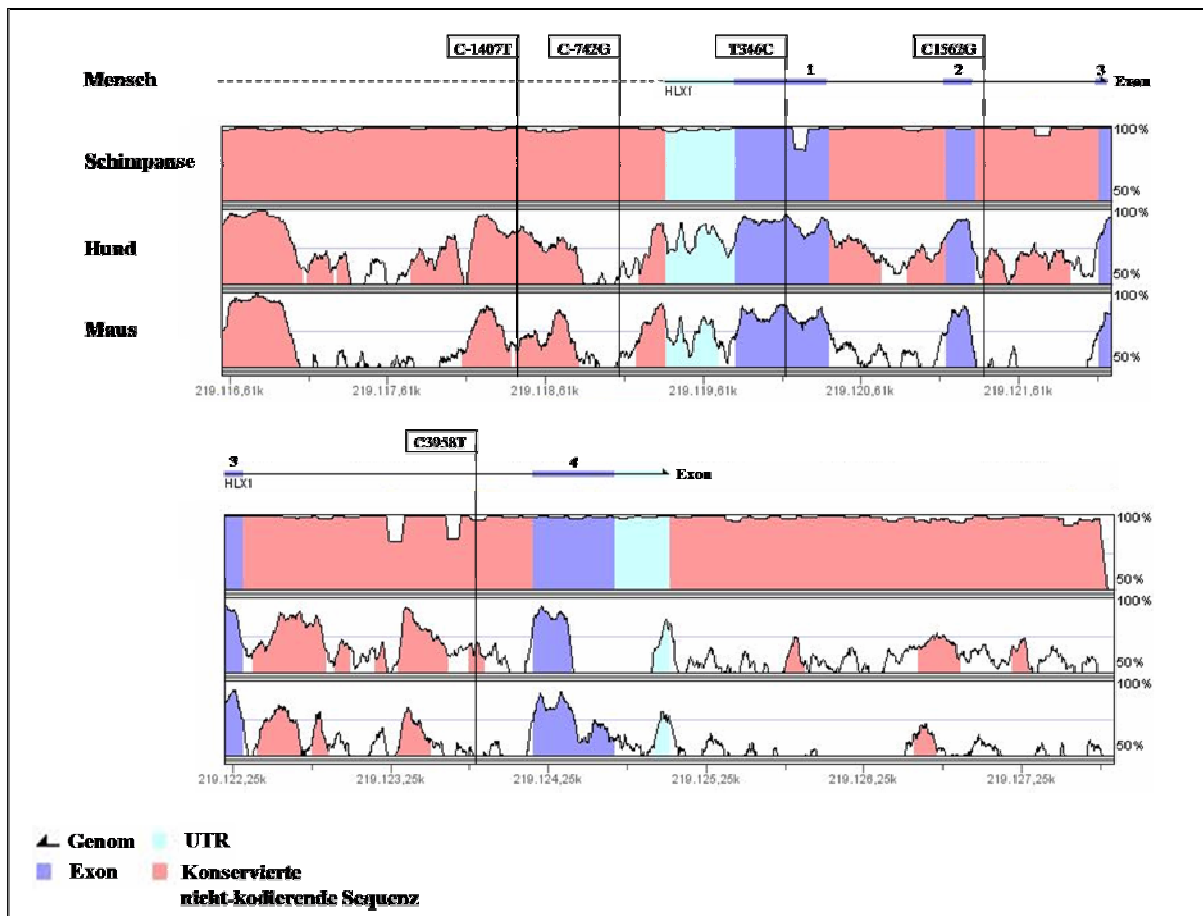


Abbildung 18: Vista-Browser Analyse des HLX1-Gens.

### 3.4.2 Untersuchung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (MAT-Inspektor)

Die bisherigen Untersuchungen haben ergeben, dass SNP T346C sich im Exon 1 befindet und zu einem Aminosäureaustausch führt. Ein Exon ist bekannterweise ein Teil eines Gens, der nach dem Spleißen (Splicing) erhalten bleibt und im Zuge der Protein-Biosynthese in ein Protein translatiert werden kann. Eine Variation in der Basenfolge würde hier zur Expression eines veränderten Proteins führen.

Die anderen vier auffälligen SNPs liegen entweder im Promotor- oder Intronbereich, d.h. in nicht-codierenden Bereichen. Vor allem die SNPs im Promotorbereich sind von besonderem Interesse. Die wichtigste Eigenschaft eines Promotors ist die spezifische Wechselwirkung mit bestimmten DNA-bindenden Proteinen, die den Start der Transkription des Gens durch die RNA-Polymerase vermitteln und als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. SNPs könnten mit einer veränderten Basenabfolge Einfluss auf die Transkriptionsrate nehmen. Eine zusätzliche Bindungsstelle oder der Wegfall einer Bindungsstelle könnte den Hinweis auf eine Funktionsänderung in der Genregulation darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des Programms MAT-Inspektor die Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen beim Wildtyp im Vergleich zum Polymorphismus dargestellt. Im Folgenden werden lediglich die Ergebnisse für die auffälligsten Polymorphismen ausführlich besprochen (In Klammern sind die *core similarity* und *matrix similarity* des jeweiligen Transkriptionsfaktors mit aufgeführt). Aus Tabelle 22 können die Ergebnisse aller SNPs entnommen werden.

Die SNPs C-1407T und C-742G liegen beide im Promotorbereich, weshalb die MAT-Inspektor-Analyse der beiden SNPs von besonderer Bedeutung ist. Die Analyse ergab, dass am SNP C-1407T weder an der Wildtypform noch am Polymorphismus Transkriptionsfaktoren binden (aus diesem Grund in der Tabelle nicht aufgeführt). SNP C-742G weist an der Wildtypform zwei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf, die beide bei Eingabe des Polymorphismus wegfallen. Zum einen handelt es sich hierbei um eine kombinierte Bindungsstelle für *STAF* (0,809, 0,781), ein Selenocystein-tRNA-aktivierender Faktor und *ZNF76* (0,809, 0,781), ein Zinkfinger Protein 76, der im Hoden exprimiert wird. *ZNF76* ist ein neues DNA-bindungs Protein, das mit *STAF* und *ZNF143* verwandt ist.

Zum anderen besteht eine Bindungsstelle für *EKLF* (1,000, 0,907), der Erythroid Kruppel-like Faktor. *EKLF* ist ein C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der für die entgeltige Hämatopoese notwendig ist.

SNP C1562G im Intron 1, zeigt ebenfalls zwei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Dort binden kombiniert die Faktoren *c-myb* (1,000, 0,975) und *v-myb* (0,765, 0,858). Vor allem *c-myb*, das Produkt des *c-myb* Proto-Onkogens, spielt im hämatopoetischen System eine Schlüsselrolle, indem es als molekularer Schalter das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen steuert. Diese Bindungsstellen gehen mit dem Auftreten des Polymorphismus verloren.

Bei SNP 3958T binden an der Wildtypform keine Transkriptionsfaktoren. Kommt es zu einer veränderten Basenabfolge durch den Polymorphismus, entstehen dagegen vier neue Bindungsstellen. Zum einen bindet *PDX1*(0,782, 0,756) der Pancreas Duodenum Homeobox-1 Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung des Pancreas, die Insulinproduktion und den Glukosestoffwechsel nötig ist.

Zum anderen binden *CART* (1,000, 0,826) das Cartilage homeoprotein 1 und *XVENT* (1,000, 0,826), ein *Xenopus* homeodomain Faktor. *CART* ist ein Homeoprotein, das selektiv in Chondrozyten exprimiert wird. *XVENT* ist essentiell für die Ausbildung der dorsal-ventralen Körperachse während der Embryogenese des glatten Krallenfrosches (*Xenopus laevis*).

Ausserdem entsteht eine Bindungsstelle für *CLOX/CDPCR* (1,000, 0,780), die der Familie der Cut-like homeodomain Protein-Familie angehören.

ERGEBNISSE

Wildtyp		SNP	
Position (zum ATG Exon1)	bindende Transkriptionsfaktoren	Position (zum ATG Exon1)	bindende Transkriptionsfaktoren
A-1633A	LTUP/AACC.01 IRFF/IRF1.01 CLOX/CDP.01 PDX1/ISL1.01 CART/CART1.01 CART/CART1.01	A-1633G	IRFF/IRF1.01    SORY/SOX5.01
C-1486C	TEAF/HLF0.1 CEBP/CEBPB.01	C-1486G	
C-796C	RREB/RREB1.01 EGRF/EGR1.02 ZBPF/ZNF202.01	C-796A	RREB/RREB1.01  ZBPF/ZNF202.01 RCAT/CLTR CAAT.01
C-742C	STAF/ZNF76 143.01 EKLF/EKLF.01	C-742G	
C-559C	ATBF/ATBF1.01 HOXF/GSH2.01	C-559T	ATBF/ATBF1.01 HOXF/GSH2.01 BNCF/BNC.01
A-434A	MEF2/MMEF2.01 MEF2/MEF2.05 TBPF/TATA.02 IRFF/ISRE0.1	A-434G	
T-429T	MEF2/MEF2.05 IRFF/ISRE.01	T-429G	
C-263C	MAZF/MAZ.01	C-263A	EVI1/MEL1.02
C1562C	CMYB/CMYB.02 VMYB/VMYB.04	C1562G	
C2256C	VMYB/VMYB.05	C2256A	
T3183T	LTUP/TAACC.01 HOXF/BARX.2.01 BRNF/BRN2.03 LHXF/LHX3.01 MEF2/AMEF2.01 OCTB/TST1.01 PIT1/PIT1.01 RBIT/BRIGHT.01 LHXF/LHX3.01 HOMF/MSX.01 CDXF/CDX2.01	T3183A	LTUP/TAACC.01  BRNF/BRN2.03       CDXF/CDX2.01 TBPF/ATATA.01 HOXF/GSH1.01
C3958C		C3958T	PDX1/PDX1.01 CART/XVENT2.01 CART/XVENT2.01 CLOX/CDPCR3.01
C4844C	MAZF/MAZ.01	C4844T	MAZF/MAZ.01

**Tabelle 22: Allelspezifische Bindeverhalten der Transkriptionsfaktoren. An den SNPs C-1407T und T3008C binden weder an der Wildtypform noch am Polymorphismus Transkriptionsfaktoren und sind somit in dieser Tabelle nicht weiter aufgeführt.**



### 4 DISKUSSION

In zahlreichen Studien wurde die Funktion der Transkriptionsfaktoren, die an der Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Differenzierung und damit an der Entwicklung von Asthma bronchiale involviert sind, untersucht. Der Fokus lag dabei bislang auf den Transkriptionsfaktoren T-bet (Th<sub>1</sub>) und GATA-3 (Th<sub>2</sub>). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde kein systemisches Mutationenscreening des HLX1-Gens veröffentlicht. Aus diesem Grund wurde das HLX1-Gen für die vorliegende Arbeit ausgewählt, um zu untersuchen, inwieweit genetische Variationen im HLX1-Gen im Zusammenhang mit der Ausbildung eines Asthma bronchiale stehen.

Aufgrund der signifikanten Ergebnisse dieser Arbeit wurde eine weitere molekularbiologische und funktionelle Analyse von HLX1 durchgeführt. Dipl. biol. Kathrin Suttner der Arbeitsgruppe Kabesch *et al.* untersuchte dabei das Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren von Polymorphismen des HLX1-Gens. Basierend auf dem vorliegenden Mutationenscreening, wurde das Linkage Disequilibrium mit einer Abrissgrenze von  $r^2 = 0,8$  wiederholt. Die identifizierten Polymorphismen konnten mit dieser Analyse in 5 Blöcke eingeteilt werden, wobei jeweils ein „tagging“-SNP einen Block präsentierte (C-1486G, C-1407T, T346C, G2256A und T3183A). Um zu untersuchen, inwieweit die Umwelt mit den identifizierten Polymorphismen in Zusammenhang steht, wurden die SNPs in einer umfangreichen Studienpopulation (n = 3.099) deutscher Schulkinder reagentypisiert und in einer Assoziationsstudie, vergleichend zwischen einer Dresdner (n = 1.940) mit einer Münchner (n = 1.159) Population untersucht. Nachfolgend wird gelegentlich auf die Daten dieser Studie hingewiesen (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dipl. biol. Kathrin Suttner, Dr. von Haunersches Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität, München).

In der vorliegenden Arbeit wird das erste bekannte Mutationenscreening des HLX1-Gens vorgestellt. Insgesamt konnten 19 SNPs in den untersuchten Bereichen identifiziert werden. 15 SNPs wurden anschließend genotypisiert, während vier ein hohes Kopplungsgleichgewicht zu anderen SNPs aufwiesen (>90%) und deshalb nicht weiter individuell analysiert wurden. Damit konnte eine Abdeckung aller Genotypen mit einem maximalen Informationsgehalt erreicht werden.

Bei der Genotypisierung der Dresdner Population zeigten sieben SNPs (A-1633G, C-1486G, C-742G, C-559T, C-263A, T3183A und C4524G) eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Eine mögliche Ursache dieser Abweichung könnte ein methodischer Fehler während der Genotypisierung sein. Um diesen Fehler weitestgehend auszuschließen, wurden die beiden „tagging“-SNPs C-1486G (p-HWE = 0,0303) und T3183A (p-HWE = < 0,0001) im Rahmen der Anschlussanalyse des HLX1-Gens von Dipl. biol. Kathrin Suttner regenotypisiert. Die Ergebnisse der Regenotypisierung bestätigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Somit konnte ein systemischer Fehler während der Genotypisierung durch diese beiden Fälle ausgeschlossen werden. (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dipl. biol. Kathrin Suttner, Dr. von Haunersches Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität, München).

Da eine technische Ursache für die Abweichung der Werte aus dem HWE ausgeschlossen werden konnte, kommen als alternative Erklärungsmöglichkeiten biologische oder populationsbedingte Effekte in Frage. Aufgrund der Größe der Studienpopulation von 1.940 Probanden und einer geringen Abweichung der Werte vom HWE kann hier von einem zufälligen Effekt ausgegangen werden.

In der anschließenden Assoziationsstudie wurden nur SNPs untersucht, die eine Allelfrequenz von  $> 3\%$  aufwiesen. Da alle Polymorphismen diese Voraussetzung erfüllten (siehe Tabelle 12), wurden alle SNPs auf die Assoziation mit Asthma und anderen atopischen Phänotypen untersucht.

Eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Erkrankungsrisiko für Asthma bronchiale konnte bei den Polymorphismen C-1407T, C-742G und C3958T beobachtet werden (Tabelle 14). Bei der Analyse der verschiedenen Formen des Asthmas zeigte sich eine zunehmende Signifikanz dieser Polymorphismen bei dem Phänotyp atopisches Asthma (Tabelle 15). Interessanterweise war keine signifikante Assoziation mit anderen atopischen Erkrankungen, wie atopische Dermatitis, Heuschnupfen, Gesamt-IgE oder atopische Sensibilisierung (Atopie) zu beobachten. Dieser Effekt lässt vermuten, dass genetische Variationen des HLX1-Gens, die einen Zusammenhang mit atopischem Asthma aufweisen, nicht über den Weg der atopischen Sensibilisierung agieren, sondern vielmehr über eine Atopie-unabhängige Reaktion direkt auf asthmaspezifische Mechanismen Einfluss nehmen. Epidemiologische Daten deuten darauf hin, dass Atopie zwar der grösste Risikofaktor für die Entstehung eines Asthma bronchiale darstellt<sup>106</sup>, jedoch in manchen Fällen Asthma und Atopie als zwei unabhängige Phänomene auftreten.

Das atopische Asthma ist charakterisiert durch eine bronchiale Hyperregibilität (BHR), eine chronische bronchiale Eosinophilie, erhöhte IgE-Werte und einer massiven Schleimproduktion, verursacht durch Th<sub>2</sub>-spezifische Zytokine. IL-4 und IL-13 sind pleiotrophe Zytokine, die eine zentrale Rolle in der IgE-abhängigen Entzündungsreaktion spielen<sup>107</sup> und in bronchialem Gewebe von Asthmapatienten stark erhöht sind. IL-4 und IL-5 führen zu einer Stimulation der IgE-Produktion in den B-Zellen und zu einer Mobilisation der

eosinophilen Zellen in die Bronchialschleimhaut. IL-13 wirkt zellspezifisch vor allem auf die glatte Muskulatur, Endothelzellen und Fibroblasten der Atemwege und ist damit mitverantwortlich für die Entstehung einer bronchialen Hyperreagibilität<sup>71-73</sup>.

Da IL-13 unter anderem einen Rezeptor mit IL-4 teilt (IL-4R $\alpha$ ) und somit auf dem gleichen Signalübertragungsweg wie IL-4 agiert, scheint IL-13 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von atopischem Asthma zu spielen. Eine Studie von Wills-Karp *et al.*<sup>73</sup> konnte beweisen, dass IL-13, pathophysiologische Charakteristika von atopischem Asthma hervorrufen kann, unabhängig von IgE und eosinophilen Zellen. Die tägliche Gabe eines rekombinanten IL-13 in die Atemwege „naiver“ Mäuse bewirkte die Ausbildung einer BHR. Damit konnte demonstriert werden, dass eine gesteigerte IL-13-Aktivität ausreicht, um eine BHR auszubilden. Ebenfalls zeigte eine Blockade des Zytokins IL-13 im Mausmodell, eine komplette Umkehrung einer Allergen verursachten BHR. Damit bestätigten diese Untersuchungen, dass eine bronchiale Hyperreagibilität, die ein Charakteristikum des atopischen Asthmas darstellt, unabhängig des Entzündungsmediators Immunglobulin-E und/oder einer pulmonalen Eosinophilie induziert werden kann.

Basierend auf diesen Beobachtungen und mit dem Hintergrund, dass zum heutigen Zeitpunkt noch wenig funktionelle Analysen des HLX1-Gens vorliegen, bieten sich diverse Ansatzpunkte zur Erklärung an, wie HLX1 eine signifikante Assoziation zum Phänotyp atopisches Asthma hervorrufen kann, ohne gleichzeitig eine Ausprägung einer atopischen Sensibilisierung oder einer Erhöhung des Gesamt IgE-Spiegels aufzuweisen.

Zwischen HLX1 und T-bet besteht eine starke Interaktion, wobei es durch eine Co-Expression von HLX1 zu einer optimalen IFN- $\gamma$ -Produktion in Th<sub>1</sub>-Zellen kommt. Jedoch ist bis heute noch nicht geklärt, auf welchem Weg diese Interaktion stattfindet. Die *In-silico*-Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen zeigte, dass bei Promotor-SNP C-742G zwei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren am polymorphen Allel wegfallen (Tabelle 22). Bei SNP C3958T im Intron 3 binden am Wildtypallel keine Transkriptionsfaktoren, jedoch kommen am Polymorphismus vier neue Transkriptionsfaktoren dazu. Denkbar wäre, dass genetische Variationen im HLX1-Gen einen Wechsel der Transkriptionsfaktoren hervorrufen, wodurch eine veränderte Transkriptionsrate erfolgt und HLX1 auf T-bet Einfluss nehmen kann. Eine daraus resultierende Suppression des T-bet-Gens würde eine Verminderung der T-bet spezifischen Funktionen bewirken.

Da T-bet den Schlüsseltranskriptionsfaktor der Th<sub>1</sub>-Differenzierung darstellt, kommt es durch eine Suppression zu einer Verminderung der Fähigkeit zur Autoinduktion von T-bet, der Chromatin Umstrukturierung des IFN- $\gamma$ -Lokus und der Induktion von IL-12R $\beta$ 2 und damit zu einer gesamten Beeinträchtigung der Th<sub>1</sub>-Differenzierung. Man geht davon aus, dass es bei einer verminderten Th<sub>1</sub>-Differenzierung zu einer Umkehrreaktion und einer verstärkten Th<sub>2</sub>-Differenzierung kommt. Diese Reaktion würde durch eine Abnahme der T-bet bedingten Hemmung des IL-4-Rezeptors und der indirekten Hemmung von GATA-3 unterstützt werden.

Somit wäre vorstellbar, dass Polymorphismen im HLX1-Gen eine Umkehrung der Th<sub>1</sub>-Differenzierung über den beschriebenen Signalweg initiieren, eine Verstärkung der Th<sub>2</sub>-Differenzierung via GATA-3 bewirken könnten und auf diesem Weg eine asthmatische Reaktion auslösen, die IgE-unabhängig ist.

Bereits frühere Studien zeigten, dass GATA-3 mRNA-positive Zellen vermehrt in bronchioalveolärer Lavageflüssigkeit und in Bronchialbiopsien von Asthmapatienten vorkommen<sup>108-110</sup>. Eine Studie von Yamashita *et al.*<sup>111</sup> untersuchte, welche Rolle GATA-3 in der Pathogenese von IgE-unabhängigem Asthma spielt, und konnte zeigen, dass es in GATA-3-transgenen Mäusen zu einer signifikanten Zunahme einer bronchialen Hyperreagibilität kommt, ohne Induktion von IgE. Im Vergleich dazu konnte beobachtet werden, dass eine Hemmung der GATA-3-Expression die Produktion von IL-4, IL-5, IL-13 und IgE unterdrückt und die Infiltration von Eosinophilen und die Hypersekretion im Bronchialgewebe stark vermindert waren. Diese Fakten lassen vermuten, dass GATA-3, das für die Differenzierung von Th<sub>2</sub>-Zellen essentiell ist, in der Pathophysiologie von atopischem, aber auch nicht-atopischem Asthma eine wichtige Rolle spielt.

Der Th<sub>2</sub>-spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 interagiert dabei mit den Zytokinen IL-4 und IL-13, die letztlich für die bronchiale Hyperreagibilität verantwortlich sind. GATA-3 bindet dabei am Promotor der IL-5 / IL-13-Gene und reguliert auf direktem Wege den mRNA-Spiegel dieser Zytokine<sup>69</sup>. IL-4 wird nicht direkt über eine Promotoraktivität gesteigert, sondern GATA-3 erhöht vielmehr den IL-4-mRNA-Spiegel durch eine Chromatinstrukturierung des IL-4-Lokus. IL-13 und IL-4 können direkt nach ihrer Expression die Mukuszellen beeinflussen und eine bronchiale Hyperreagibilität induzieren<sup>112,113</sup>. IL-4 und IL-13-Rezeptoren werden auf einer großen Anzahl von Zelltypen im Bronchialgewebe exprimiert, einschließlich Epithelzellen und glatten Muskelzellen<sup>114,115</sup>. Die Effekte von IL-4 und IL-13 in *in vitro* Studien deuten darauf hin, dass diese Zytokine, Epithelzellen und glatte Muskelzellen auf verschiedene Weise beeinflussen und zur Ausbildung einer BHR beitragen<sup>116,117</sup>.

Inwieweit Polymorphismen im HLX1-Gen die Th<sub>2</sub>-spezifischen Zytokine IL-4 und IL-13 direkt beeinflussen können, ist fraglich. Da T-bet auch durch die Suppression des IL-4R die Th<sub>2</sub>-Differenzierung hemmt, würde es durch eine Expression eines veränderten HLX1-Gens zu einer verminderten T-bet-Aktivität kommen, was wiederum zu einer gesteigerten IL-4R-Aktivität führen würde. Da jedoch vor allem IL-13 zur Ausbildung einer BHR verantwortlich ist, scheint es wahrscheinlicher, dass genetische Variationen des HLX1-Gens einen „falsch-positiven“ Einfluß auf GATA-3 und IL-4 / IL-13 gleichermaßen ausüben und so das Risiko erhöhen, ein IgE-unabhängiges atopisches Asthma bronchiale auszubilden.

Wie bereits beschrieben, konnte beobachtet werden, dass es nur durch eine Co-Expression von HLX1 mit T-bet und einer engen Interaktion beider Transkriptionsfaktoren zu einer optimalen IFN- $\gamma$ -Produktion kommen kann, die wiederum wichtig für die Aufrechterhaltung der Th<sub>1</sub>-Zelllinie ist. Dies bietet einen weiteren Ansatzpunkt zur Erklärung, wie ein verändertes HLX1-Gen Einfluss auf die T-Helferzell-Differenzierung nehmen könnte.

Die Rolle der Th<sub>1</sub>-Antwort ist bei der Ausbildung von Asthma von großem Interesse, da bereits mehrere Therapieschemen auf einer Steigerung der Th<sub>1</sub>-Immunantwort basieren, um die allergische Entzündungsreaktion in den Bronchien zu reduzieren. Vor allem ein vermindert repräsentiertes IFN- $\gamma$  wird mit der Entwicklung eines Asthma bronchiale in Zusammenhang gebracht<sup>51,118</sup>. Jedoch wird die Th<sub>1</sub>-Immunantwort während der Entwicklung einer allergischen Erkrankung auch kontrovers diskutiert. Widersprüchliche Daten deuten darauf hin, dass die Th<sub>1</sub>-Antwort eine allergische Entzündungsreaktion steigern, aber auch vermindern kann<sup>42,119-122</sup>.

Es ist bekannt, dass das Th<sub>1</sub>-spezifische Zytokin IFN- $\gamma$  durch Hemmung der Fibroblastenaktivität, wie Proliferation und Kollagenproduktion, auf direktem Weg einen antifibrotischen Effekt induzieren kann<sup>123,124</sup>, oder auf indirektem Weg über eine Minderung der IL-4 und IL-13-Aktivität<sup>125,126</sup>. Außerdem supprimiert IFN- $\gamma$  direkt die IgE-Synthese und hemmt die Entwicklung von Th<sub>2</sub>-Zellen<sup>127,128</sup>. Die IFN- $\gamma$ -Produktion wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert, wovon IFN regulatory factor-1 (IRF-1) von besonderem Interesse ist<sup>129</sup>. Studien lieferten Beweise dafür, dass eine Verbindung zwischen Asthma und Atopie, und IFN- $\gamma$  und IRF-1 besteht<sup>130-132</sup>.

Ein Zusammenhang zwischen der Auswirkung von HLX1-Polymorphismen auf eine verringerte IFN- $\gamma$ -Produktion und der Ausbildung eines Asthmas bronchiale wäre denkbar. Durch eine insuffiziente Interaktion der Transkriptionsfaktoren HLX1 und T-bet könnte keine optimale IFN- $\gamma$ -Produktion in Th<sub>1</sub>-Zellen bereitgestellt werden, wodurch eine Repolarisation zu Th<sub>2</sub>-Zellen stattfinden würde. Dass bei atopischen Asthmatiker im Vergleich zu nicht-atopischen Patienten eine verringerte IFN- $\gamma$ -Expression und ein erhöhter IL-4-Spiegel vorliegen, konnte bereits demonstriert werden<sup>133,134</sup>.

Die identifizierten Polymorphismen des HLX1-Gens in der vorliegenden Arbeit zeigen zwar eine signifikante Assoziation zu atopischem Asthma, jedoch nicht zu anderen atopischen Erkrankungen. Darum muß davon ausgegangen werden, dass die SNPs auf direktem Weg auf asthmaspezifische Mechanismen Einfluss nehmen, ohne eine atopische Sensibilisierung zu initiieren. Trotz der vorliegenden Studienergebnisse scheint diese Überlegung eher unwahrscheinlich, da IFN- $\gamma$  unter anderem direkt die IgE-Synthese supprimiert. Bei einer verringerten Expression des Th<sub>1</sub>-spezifischen Zytokins, würde es wiederum zu einer



verstärkten IgE-Expression kommen und damit zur Ausbildung eines IgE-abhängigen atopischen Asthmas.

Inwieweit sich eine verminderte HLX1-Expression auf ein erhöhtes Risiko ein Asthma bronchiale auszubilden, auswirkt, bleibt daher leider unklar. Denkbar wäre auch, dass die genetischen Variationen im HLX1-Gen eine gesteigerte HLX1-Expression bewirken und es zu einem frühen Zeitpunkt der Th<sub>1</sub>-Differenzierung aufgrund verminderter IFN- $\gamma$ -Produktion zu einer Umkehrung und Repolarisation zu Th<sub>2</sub>-Zellen kommt. Daher sind weiterführende funktionelle Studien der Zwischenschritte im Prozess der HLX1-Genexpression nötig, um die Entstehung dieser Erkrankung besser verstehen zu können.

In der Haplotypanalyse, die die Wirkung verschiedener Kombinationen von Polymorphismen untersucht, spiegeln sich die Ergebnisse der Genotypisierung der einzelnen SNPs wider. Haplotyp H<sub>c</sub> (C-T-T-A-T) zeigte eine leicht höhere Signifikanz zu atopischem Asthma als die Werte der einzelnen Polymorphismen (Tabelle 20). An dieser Kombination waren die drei „tagging“-SNPs C-1486G, T346C und T3183A in ihrer Wildtypform beteiligt, „tagging“-SNPs C-1407T und G2256A traten in ihrer polymorphen Form auf. Interessant ist das Vorliegen der polymorphen Form von SNP C-1407T, der unter anderem mit den SNPs C-742G und C3958T einen Block bildet und genau diese SNPs in der Assoziationsanalyse eine signifikante Assoziation aufweisen. Die Haplotypanalyse zeigt, dass SNP C-1407T und das Vorkommen der anderen Polymorphismen in dieser Verknüpfung zu einem signifikant höheren Auftreten von atopischem Asthma führt.

Eine signifikante Assoziation zu Asthma bronchiale im Sinne einer sich protektiv auswirkenden Funktion zeigten die SNPs T346C und C1562G. In der weiterführenden, statistischen Analyse konnte bei beiden SNPs eine leicht abnehmende Signifikanz bei nicht-atopischem Asthma im Vergleich zu Asthma bronchiale beobachtet werden (Tabelle 16). Von besonderem Interesse ist dabei, dass SNP T346C im Exon 1 zu einem Aminosäureaustausch führt, wobei das neutrale Serin gegen das polare Prolin ausgetauscht wird. Prolin ist eigentlich keine Amino-, sondern vielmehr eine Iminosäure<sup>135</sup>, die aufgrund seiner 5er-Ringstruktur in Proteinen zum Abknicken der Peptid-Kette führt. Eine veränderte Aminosäuresequenz im HLX1-Gen erreicht auf diesem Weg eine umgewandelte Proteinstruktur, die mit einer veränderten Funktion einhergeht.

SNP C1562G im Intron 2 besitzt am Wildtyallel zwei Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren *c-myb* und *v-myb*, die interessanterweise am polymorphen Allel wegfallen (Tabelle 22). Durch die Änderung der Transkriptionsfaktoren könnte eine veränderte Transkriptionsrate initiiert werden, die sich protektiv auf die Ausbildung eines Asthmas auswirken könnte.

Da dem nicht-atopischen Asthma bronchiale zwar keine atopische Diathese zugrunde liegt, aber trotzdem eine bronchiale Hyperreagibilität besteht, wäre es durchaus denkbar, dass beide Polymorphismen, die im Übrigen zu 80% miteinander gekoppelt sind (LD  $r^2 = 0,9$ ), die Funktion des HLX1-Gens insoweit verändern, dass eine verstärkte Interaktion mit T-bet stattfindet und daraus eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Produktion in Th<sub>1</sub>-Zellen resultiert. IFN- $\gamma$ , als Th<sub>1</sub>-spezifisches Zytokin, supprimiert, wie bereits erwähnt, direkt die IgE-Synthese und hemmt die Entwicklung von Th<sub>2</sub>-Zellen<sup>127,128</sup>. Außerdem würde durch die Auswirkungen des antifibrotischen Effekts von IFN- $\gamma$  und über eine Minderung der IL-4 und IL-13-

Aktivität<sup>125,126</sup> die Ausbildung einer BHR reduziert werden. Eine verstärkte Th<sub>1</sub>-Immunantwort lässt somit die Ausbildung einer atopischen Erkrankung als unwahrscheinlich erscheinen. Jedoch bleibt bis heute unklar, wie eine BHR überhaupt entsteht und wie IFN- $\gamma$  in den Atemwegen die Ausbildung einer bronchialen Hyperreagibilität beeinflusst<sup>136</sup>.

Wie bei der Haplotypanalyse des atopischen Asthmas, spiegelt sich auch beim nicht-atopischen Asthma die Werte der Genotypisierung in der Haplotypanalyse wieder. Die Kombination des Haplotyps H\_b (C-C-C-G-T) weist dabei im Vergleich zur Genotypisierung der Einzelanalysen einen deutlich stärkeren protektiven Effekt auf (Tabelle 21). Auffallend dabei ist, dass „tagging“-SNP T346C in dieser Kombination als einziger SNP in der polymorphen Form vorliegt, während die anderen SNPs in der Wildtypform vorliegen. SNP T346C bildet mit C1562G einen Block und zeigen in der Assoziationsanalyse eine signifikante Assoziation zu nicht-atopischem Asthma. Offensichtlich bildet der Block des „tagging“-SNPs C-346T einen protektiven Effekt aus oder verringert zumindest das Risiko, an nicht-atopischem Asthma zu erkranken. Er wird dabei durch die Anwesenheit der anderen vier „tagging“-SNPs in der Wildtypform positiv unterstützt.

Bei der Entstehung atopischer Erkrankungen ist es jedoch genauso wichtig, genetische Divergenzen zwischen Studienpopulationen unterschiedlicher Städte zu erforschen und die Exposition verschiedener Umwelteinflüsse in den Analysen zu berücksichtigen. Da aus früheren Studien hervorgeht, dass neben einer genetischen Prädisposition auch diverse Umweltfaktoren einen gravierenden Einfluss auf die Entstehung von Asthma und allergischen Erkrankungen ausüben<sup>87</sup>, wäre es von besonderem Interesse, die Auswirkungen der identifizierten Polymorphismen des HLX1-Gens bezüglich der Ausbildung eines Asthma bronchiale in Populationen aus Ost- und Westdeutschland zu untersuchen.

Aus diesem Grund werden die Polymorphismen von Dipl. biol. Kathrin Suttner (Arbeitsgruppe Kabesch *et al.*) zurzeit anhand der Studienpopulationen Dresden (Ostdeutschland) und München (Westdeutschland) analysiert. Wichtig wäre dabei zu beobachten, inwieweit regionale Unterschiede beim Auftreten allergischer Erkrankungen in Assoziation zu HLX1 bestehen. Studien, die vergleichende Untersuchungen zwischen Ost- und Westdeutschland vorstellen, zeigten in diesem Zusammenhang, dass es beim Auftreten atopischer Erkrankungen nicht nur zwischen verschiedenen Ländern, sondern auch innerhalb eines Landes Unterschiede gibt. Desweiteren konnte beobachtet werden, dass das Risiko, an Asthma zu erkranken, im westlichen Teil Deutschlands lange Zeit signifikant höher war<sup>2</sup>.

Als Ursache dafür könnten frühkindliche Unterschiede in der Umwelt, vergleichend zwischen Ost- und Westdeutschland, verantwortlich sein. Vor allem im frühen Kindesalter übt die Umwelt eine Stimulation auf das Immunsystem aus. Die Differenzierung von einer bei Geburt Th<sub>2</sub>-geprägten zu einer eher Th<sub>1</sub>-geprägten Immunantwort bedarf einer Stimulation durch mikrobielle Faktoren<sup>9</sup>. Aus diesem Grund ist eine Studie von Weiland *et al.*<sup>80</sup> interessant, die aufzeigte, dass schon wenige Jahre nach der Zusammenführung Deutschlands eine steigende Prävalenz atopischer Erkrankungen in den neuen Bundesländern zu beobachten war, die bis auf das Niveau westdeutscher Bundesländer anstieg. Neben den Umweltfaktoren können aber auch soziale Faktoren eine ausschlaggebende Rolle spielen. Durch eine verbesserte Hygiene in den letzten Jahrzehnten ist die Stimulation des Immunsystems möglicherweise geringer geworden. Es liegen Hinweise vor, die indirekt einen solchen Zusammenhang nahe legen. So haben Kinder mit vielen Geschwistern, und vor allem mit älteren Geschwistern, deutlich weniger Sensibilisierungen und Allergien als Einzelkinder<sup>137,138</sup>. Einzelkinder, die früh in eine Kinderkrippe kommen, haben später im Leben weniger Sensibilisierungen und Allergien als

solche, für die dies nicht zutrifft<sup>139</sup>. Somit ist sichergestellt, dass all diese Faktoren auf das Ausmaß der Allergenexposition und die Krankheitsentstehung entscheidend Einfluss nehmen.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Asthma und Atopie sind äußerst komplexe Erkrankungen, an deren Entstehung sowohl eine genetische Prädisposition als auch umweltbedingte Faktoren beteiligt sind. Jedoch sind bis heute noch nicht alle Mechanismen vollständig untersucht. Man geht davon aus, dass ein Ungleichgewicht innerhalb der T-Helferzellen mit einem Überwiegen von Th<sub>2</sub>-Zellen bei gleichzeitig abgeschwächter Th<sub>1</sub>-Immunantwort besteht. Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei dieser Differenzierung. Bei der genetischen/molekularbiologischen Analyse von Transkriptionsfaktoren der T-Zelldifferenzierung lag der Fokus bislang nur auf den Schlüsseltanskriptionsfaktoren T-bet und GATA-3.

In dieser Arbeit wurde HLX1, ein noch wenig untersuchter Transkriptionsfaktor, der mit T-bet interagiert, genetisch und molekularbiologisch analysiert. Das HLX1-Gen, das auf Chromosom 1 (1q41-q42) lokalisiert ist, scheint ein Kandidatengen in der Entstehung atopischer Erkrankungen darzustellen.

Anhand eines Mutationenscreenings, basierend auf einer Zufallsstichprobe von Atopikern und Nicht-Atopikern, wurde das HLX1-Gen auf potentielle Polymorphismen hin untersucht. Durch Sequenzierung des gesamten HLX1-Gens konnten 19 Polymorphismen identifiziert werden, wovon drei neu entdeckt und in die SNP- Datenbank aufgenommen wurden. In der anschließenden Assoziationsstudie wurde anhand einer Dresdner Studienpopulation (n=1.940) der Zusammenhang zwischen den identifizierten Polymorphismen und Asthma und anderen atopischen Erkrankungen untersucht. Die Analysen ergaben bei drei Polymorphismen eine signifikante Assoziation mit Asthma bronchiale, vor allem mit atopischem Asthma, jedoch nicht mit anderen atopischen Erkrankungen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass das HLX1-Gen in der Entstehung von kindlichem Asthma bronchiale eine signifikante Rolle spielt. Jedoch bedarf es weiterführender statistischer und funktioneller Analysen, um die Funktionen und Zusammenhänge des HLX1-Gens genauer verstehen zu können.

## 6 SUMMARY

Asthma and allergy are complex diseases. Their development is thought to be based on both, genetic predisposition and environmental factors. However, not all mechanisms are yet completely understood. It is assumed that there is an imbalance in the distribution of T-helper cells with a preponderance of Th<sub>2</sub> cells and an attenuated Th<sub>1</sub> immune response. Here transcription binding factors play an important role. Up to now the analysis of T cell differentiation focused only on the key transcription factors T-bet and GATA-3.

In contrast, HLX1 is a transcription factor that up to now is poorly understood. Therefore, we screened the HLX1-gene, which is located on chromosome 1 (1q41-q42). HLX1 is an important component of the Th<sub>1</sub> cell differentiation cascade and seems to be a candidate gene for the development of atopic diseases.

Mutation screening for HLX1 was performed in randomly selected adult German volunteers consisting of atopic and non-atopic probands. All 4 exons, introns, Promotor and flanking 5'- and 3'-UTR regions were screened. In total of 19 polymorphisms were identified of which three polymorphisms were currently unknown and therefore were added to the SNP database. In the following association study a study population of 1.940 children from Dresden was screened for associations between the identified polymorphisms of the HLX1-gene and the development of asthma and other atopic diseases. For three polymorphisms a significant association with childhood asthma, particularly atopic asthma was found. There were no associations between these HLX1-gene polymorphisms and other atopic diseases. Thus, it may be speculated that the effects of genetic variants of HLX1 observed with asthma may not act via intermediate steps of atopic sensitization but rather, have a more direct effect on asthma specific mechanisms independent of atopy.

Further statistic and functional analyses are needed to completely understand the influence of the HLX1-gene on the development of asthma bronchiale.

7 HLX1-GENKARTE

LOCUS AF217621 12648 bp DNA linear PRI 25-APR-2000  
 DEFINITION Homo sapiens homeobox protein (HLX1) gene, complete cds.  
 ACCESSION AF217621  
 VERSION AF217621.1 GI:7643910  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Homo sapiens (human)  
 ORGANISM Homo sapiens  
 Eukaryota;Metazoa;Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Mammalia;Eutheria;Euarchontoglires;Primates;Haplorrhini;  
 Catarrhini;Hominidae;Homo.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 12648)  
 AUTHORS Hanrahan,V. and Kennedy,M.A.  
 TITLE Genomic Sequence of Human Homeobox Gene HLX1  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 12648)  
 AUTHORS Hanrahan,V. and Kennedy,M.A.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (19-DEC-1999) Pathology, Christchurch School of  
 Medicine,  
 Riccarton Ave., Christchurch, SI 8015, New Zealand  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..12648  
 /organism="Homo sapiens"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /db\_xref="taxon:9606"  
 /chromosome="1"  
 /map="1q41-q42.1"  
 variation 3476  
 /replace="c"  
 variation 3630..3637  
 /replace="ccccccccc"  
 variation 3772  
 /replace="a"  
 gene <4035..>9199  
 /gene="HLX1"  
 mRNA join(<4035..4626,5371..5550,6333..6517,8356..>  
 /gene="HLX1"  
 CDS join(4035..4626,5371..5550,6333..6517,8356..8865)  
 /gene="HLX1"  
 /codon\_start=1  
 /product="homeobox protein"  
 /protein\_id="AAF65541.1"  
 /db\_xref="GI:7643911"

ORIGIN

```

1   tcaagtagct ggataagctg tgtttctttt tctttctgat tgtaaatatt taattattta
61   catctctttt cttgaagcca gtaggtacca tgtttgcaag aatatttgaa attaagagga
121  gaggggttcc gaagtccaca gagcaactgc cttgcacatt attttaccca gaatgcacaa
181  gaaaaagcaa cacagatagc agatatagcc agttcaagtc cttgaagagt tatggtcctg
241  taatatacaa ggcccagcat tcactataat tgacctgtgc tcagtgtgga tctgtgactc
301  tggttttggg acaaaagtct gcactgatga tttaaatatg gaggctccaa agacaggtag
361  aaccaaagga tggtgaaacc catctcttgc ctcagtcatt gcataagccc ctgattcagg
421  acccttttaa accctaaatc cccataagct atattgttaa attataaaac gaaccttctc
481  tgatcttate cattcccaat atgggtgaaat cgtctttggc tgtgtttaac taggaaaagt
541  gaagggatga gttgaaagca ttaaaaacag cagtcagcat gatcagaaac cccagccaat
601  gcgatatttt ccaaagaaaa gaggccacag ttagggcttc cgctgcgtag accaagctca
661  agttaattcg gtttagccag gcocctttct ttcctgttaa attatcaacc cccatggcta
721  ccagcccctg gggagccctc gcctctacco ccaggacctc cctgcccggc tcagtagctc
  
```



# HLX1-GENKARTE

781	tgggccagtt	catttgcoca	cagcccggag	cctctcgaa	agcaaagatt	aaaggggaaa
841	gtcgcagctg	tatatattata	ttttcattgc	tagaaggaa	ttgatttccg	tgcatttatt
901	ttggtagttg	taatacataa	gggoggattt	gcgtcaccg	agcaacttgc	cggtggagat
961	aaagttgcac	aaatattgaa	aggggaagtg	ctaggagtca	ttatagagtt	tttctccgga
1021	agaaataagg	atthctgcag	tatcctaaaa	tactaaggcc	gcttctatth	tgagaccaat
1081	ctcgcaggca	catccgctca	tttagtccc	agtttgagcc	catcaaaaaa	caggagatga
1141	cctgaactcc	ggcgagccca	gggtttcctg	ctgctttctt	ggttctgaag	agtggggagt
1201	aaggagggcg	ggagtctgcg	ggctcagaac	tccgcaagg	gcctgcagg	gccaggcttg
1261	ggcctgggga	aggggtagag	ggggcgccg	gggtcgctcc	aaagacttgt	atthcgcgth
1321	tgctccggg	agctgggagt	aaggccttg	atggcgccga	cgcggttg	aggaagctga
1381	ggcctgggag	agcaaggggc	gocgagccga	agttgcaact	tgactccag	ccgcccgcct
1441	ggcggagaaa	gggaggctcg	cggcgccg	aggagtcgg	ggcctcgg	gcctcgctth
1501	cgccgcatct	gcccagcgt	ccggccttg	aatctcggca	gatgcgagtt	gtgggcacct
1561	aggaaccct	gaggactcgc	atcccccg	gtctgtatcc	cgtgccacc	ccgagagctc
1621	gcaaaccctg	gaaaggtgga	aagctgatag	gggagtctta	tttcttaaga	gagaggggta
1681	gggcgcg	cgctgcctcg	ggtaaggagt	aaatgcacct	ctttcacaac	cgtgagtttg
1741	ggcttaggct	gaggtctaaa	tgtttgcagt	caaattagaa	acgcaatcaa	actggaagtg
1801	gcactagaaa	gcagagggct	cacggcctcc	gctacgcaca	ctcccaccga	aggctcacca
1861	gaaccctcag	ccagcgcctc	aattgccc	gthgtacttg	tcgctcctth	gccttcacct
1921	tgacacagaa	aaactggtct	taatacgtct	ctcgcaccg	gtaccctac	cttcagccaa
1981	acacaccat	ctatctctgg	aatagcacc	tctctcctgg	ttgctggag	caggggaaga
2041	aaacctthca	gtaaaagaga	gatggagagc	gagagcggga	gagctggagg	gcgggaggag
2101	ggagagagag	agggagaggg	agagatctta	gtgctggctg	atcagaagtg	attgataatt
2161	ttccaggaga	aagtcaaaag	cttaaaagga	tagcatctgc	atcaaggggc	tagagaaaac
2221	accagaaatt	aatthttataa	gcccacaacc	tgaactcgag	ataggcatgg	caagthtact
2281	tgctthctg	gthttatthg	gtgaggagcc	thcgtgctga	agggaaataa	aaatgtcaca
2341	gaatccctgt	taggagatgc	thattagggc	aatcgaaaac	aaaagththc	gtgththcat
	<b>A-1633G</b>					
2401	gttctgatt	atthttatth	cttctgaaa	atgtgcaaga	acagctcatc	tgggtggcct
2461	gtgththgth	tgggagaggg	gtggggaat	tcattctgac	tataatthta	agagaagaaa
			<b>C-1486G</b>			
2521	thcttaaaat	agatatgtcg	atgthgca	aaacctccac	caccactacc	ctcgtthcta
					<b>C-1407T</b>	
2581	aagaccaag	gcacgaatgg	aagacgthga	ccaccacgca	gctctctctg	caaccaggcc
2641	caaggggthc	ctggggaagc	tgtcacagaa	ttgaaagcag	tattgaaacc	cacggaaatc
2701	tgctcttg	ggcacttgca	aaacaacgaa	ccccacgtga	tccggagatg	tggthgagg
2761	gtgaggctaa	catttctctac	aaactctctg	aaaggatgga	agcgcgtgcc	gctctccc
2821	gthtccggg	gcagcctgth	thgtagcctc	tgaggctccg	gggaaaggth	tggctgcgtc
2881	taagagagac	gththgagcc	atccgtctta	ththgththga	aaagtcactc	gthcaagthg
2941	tcactgtgtg	acagctcaga	ataaaaccaa	ththcggccg	cccctcctcc	tcgcttccc
3001	gaggatctcc	tgggaggcac	gaggcggacg	cggtgctgag	thgggccggg	actcagggcg
3061	gcaacatthg	ggcaagggcc	caggaaagat	gaggggctth	gccgaggaca	cggactcctg
3121	gaataaaagc	agaatgaggt	caagagaagg	gaagcaaaag	ggccaaagcg	cgctccgctc
					<b>C-796A</b>	
3181	tccaccggga	ggcgggctth	gcagagccct	aaagagtgag	attaccgtcc	cttcccag
					<b>C-742G</b>	
3241	cccccaactc	gccccgggtg	acaagcgtth	caggaaagct	cctgtgatca	actctcttg
3301	ccccgtggcg	gthcggagct	gcagaagtta	gaagagagtc	agagccctcc	ggagcggctg
3361	cctggcccct	acgcagagta	gcaagaagca	ctgcgatgtg	cgctactaag	cccacgcggc
					<b>C-559T</b>	
3421	cgagcaaaa	actthggcgt	ggccggggcg	tggctagggt	ccggccaggc	ccctctgthc
3481	ctaattcccc	tccactcccc	gctcccattg	gtcacgagga	tgaccaatga	gcgctcggat
					<b>5'UTR</b>	
3541	cgaggtctta	ccccgggct	gactcgaaa	ctctgcca	aaactthggga	gththtagag
	<b>A-434G</b>	<b>T-429G</b>	<b>Hypervariabler Bereich</b>			
3601	acgagththth	ththththct	attactththc	ccccccctaa	ctaacggact	attatthgthg
3661	thgthththaa	thtagctctt	agggcttagc	tatthgggt	thcttgcggt	gtcccggctc
					<b>C-263A</b>	
3721	cgctctccctg	gctccccgcg	ccgcctcg	gccccagcgc	ccctcgctct	ctccagccc
3781	gcgaggagtg	cgggcgccgc	gocgcctthta	aagcagggcc	agggagcag	gcggtgaccg
3841	gccgagatcc	ggccctcgcc	tcctccctcg	gtggcgctag	ggctcccggc	ctctcttct

# HLX1-GENKARTE

3901 cagtgcgggc ggagaagcga aagcggatcg tctcggctg ccgcgcctt ctccgggact  
3961 cgcgcgcccc tccccgcgog cccaccacc cagtccggct ggactgcggc agccgcgog

**1. ATG Exon 1**

4021 ctacccccgg caggatgttc gcagccgggc tggctccctt ctacgcctcc aacttcagcc  
4081 tctggctcggc cgcttactgc tctcggccg gcccagggcg ctgctccttc ccttggacc  
4141 ccgcccggct caaaaagccc tctttctgca tcgcagacat tctgcacgcc ggcgtggggg  
4201 atctgggggc ggccccggag ggcttggcag gggctcggc ccgcgcctc accgcgact  
4261 tgggctcggc tcaccgcac gctctttcc aagcggcggc cagatccccg ctccgacca

**T346C**

4321 ccccagtggt ggcgccctcc gaagtcccg ctggcttccc gcagcggtg tctccgctc  
4381 cagccgccta ccaccaccat cccccgaac aacaacagca gcagcaacag ccgcagcagc  
4441 aacagcctcc gctccgccc cgggctggcg cctgcagcc ccgcgctcg gggagcgag  
4501 tggttccgaa cccccaccac agtggctctg ccccgcccc ctccagcaaa gacctcaaat  
4561 ttggaattga ccgcatttta tctgcagaat ttgacccaaa agtcaaagaa ggcaacacgc

**Intron 1**

4621 tgagaggtag gtcttgggcg ggaggetgca ggctctgac cactgacca ctccccggac  
4681 cccgggctgg cttggggtgc ctttgagtgt ttttacaatt aaggacaaat cggtaaaacg  
4741 ggagagaaga aaacgaattg taagaaaact acaaaacatt aggtctaaaa ctcacctgtt  
4801 ctatgtaaaa caaacaiaaaa atgactccag ggattcttta aaaacacgtc ttagaatcaa  
4861 tatttataaa agtggttggg gtaattatct gctaacaatga ctttgatctc tttataaatg  
4921 tatctagaga cagaattata tttctgaca gctaaagcat tttgggaaa cactttcgca  
4981 cttatctgat ttctagtaaa aatttcacc aggaaatgta aataataaac aaaaccgct  
5041 agatgagcgg gcagagtggg gccaccttg ggccggaggt ttgcgtctgt ggcgttctg  
5101 gaagacacgt gaaagtgagg ccgtaagccg atttatgtaa agcctttact tactatatac  
5161 atgcatatgg acgtgagggc cacacaggaa cttttcgtgc gtcgctcctt ggcaactgtt  
5221 gggagagaga ggtttcagcg cctagacggg ttctctcttg acttcgctca ataaaagtga  
5281 atccagggca aggggaaggg gaggaacaaa tcagcggaga gtgtgagtgt gcccgagatg

**Exon 2**

5341 taacctgcta tcttttccc ttgtcccag atctcacttc cctgctaacc ggtggggcggc  
5401 ccgcgggggt gcacctctca ggctgcagc cctcggccgg ccagttcttc gcatctctag  
5461 atcccattaa cgaggcttct gcaatcctga gtcccctaaa ctogaacca agaaattcag

**Intron 2**

5521 ttcagcatca gttccaagac acgtttccag gtacggaaaa actccagagt actgcctaac

**C1562G**

5581 gggcgagcgg actaa c agtc agaaatctca ggactgacgc ctccagggct gccacggtgt  
5641 cgcaatctca caattggggc gggaggctac ggagtcagga gagagaaacc gaaagatttc  
5701 tcagcgagct agcgcctcgt toggatgggt ccccttgaaa aggggtagag gcgctggag  
5761 atcccagaaa gtgtgtcgt ggacggggg gtggggggct ttctcgaagt cttttcgccc  
5821 cagagggctt gaaaaatgca gcatcaatgt tgcttattag catatacaca ttttgggatg  
5881 acctcaaaaa cttgtgcttg gcgagtttat gtctgggtgc ctggacacat gcgggaataa  
5941 acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acgagataat tcaattcagg  
6001 gctgtcatca ttcaggccca agggacattt ttgtctactc ttcgtagggc tgatggccac  
6061 gcatgaggtt tatgtttttc tcttggaaat aaaggacaag ccgccaggct tctccactcc  
6121 acgctcgtt taggtcttcc gactgtcgtg taaaattcct ccttagaggg gccattcgtt  
6181 gtatgtcga agggcttct gaatgagggg ggaatcgaca gttaacacga aacagtttca

**G2256A**

6241 agccttacgg ggacccccag gctggcaggt caaggactgg aactgaac g ccctcttgt

**Exon 3**

6301 ctttcttccc tctggctccc gttctcggc aggtccctat gctgtgctca cgaaggacac  
6361 catgccgcag acgtacaaaa ggaagcgttc atggctcgcg gctgtgttct ccaacctgca  
6421 gaggaaaggc ctggagaaaa ggtttgagat tcagaagtac gtgaccaagc cggaccgaaa

**Intron 3**

6481 gcagctggcg gcgatgctgg gctcaccgga cgcacag gta aggcagttct ggctccagcg  
6541 cacagcgcgc tcgggcgggc agcagcgcac ggctagtct ggtaggtccc ctccatcccg  
6601 gccgactggc ctctcgggt gcaaacgcaa gatcttgact ttcaagaggc tttgtggact  
6661 acgcaacttg aggcaggaga agaggagggg ggagatgggg tgaggagaa ggaccgagag  
6721 aagagctcat cccaagatg tgtgtcaaca agcactgcat gtttattttg gccaacaggc  
6781 taaagaacca cggagaaagc aaaagggccg ctggaaataa cactgatata ctcaactgta  
6841 gtgcaattcg ctgtaggagg cagtttattt cagaaaagat aaaaacccaa aggcaagaga  
6901 ttgttgttg gtttttttcc ctctcaccct cctccttcc tctctctct gctgcttctg  
6961 ctggattgtg aaatccccag ttgtgaggaa gtgaaaatat aatttcaaac ggaattagtt

# HLX1-GENKARTE

**T3009C**

7021 agctccagga gggcagggag tctgcttggg gtggccacac attacaaggc ttaggctctg  
 7081 aagaaaatct gaaggaaggg gagaggtgag ggaagaaag aaagaaaat gattctctta  
 7141 gaatacccaa gagcatttca gcaggttctg cctatttgaa ttttttcaag acaatagga

**T3183A**

7201 atgtattgtg gctgaattaa ttttattctt tttcttaaat ttaagaactg ggcttcccc  
 7261 cccccacca cccgagcttt gactgtggaa gagtcaactct tgtgcacccc atagcactgg  
 7321 ctctggctct ggggtgctga ttttccccag caggtcagaa gccagaggca ggcttctttt  
 7381 tcttagctcc ttgggtccca aattgctgtc tctgtttctt tctgacctcc attacacaac  
 7441 tcttctcccc agtacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca caggaggagc  
 7501 ccagccggtt tccaccagct gtggatgta tttttaaag ggaagctgga acttgtgtga  
 7561 atgcgttggg tccccaggg gatcgtatat atctgtatag attctctgcc ccatctctat  
 7621 ccccttctt aattttgcac acatttaatt ccattgtttt ctgagcccc aggagaattt  
 7681 gtttatctt aacaggggca agtcttctt cagctcttgc gtacaaacac accaaagaaa  
 7741 tgctgtctta ctgaaagccc aacaatgccc ccacctact gtgattaaca gtttaaacc  
 7801 cctttccctt tctgcttccc atgtttcctt ttttgaaaa agtattgctt tgggtagtgg  
 7861 cagtagagga gagggccaac ttagagcagg aattcttaac actggcacac caaaccttg  
 7921 acattgtaag caatatcttg ggcataatgtg tatttttctg ggctaggagt ccataacttt

**C3958T**

7981 aatcagattc tcatgggggt cctggcataa aaaattaca tggatttaga gtagagagag  
 8041 agtatgttgg gggtcgggtg caggaatctg ctttccaac agtcaactcag gtcattttag  
 8101 tcctggggcc tgaggggtgc attttgaaa cggcttagt gggttcccta ggccaggatt  
 8161 cctggcttct tgtgttcccc tgggtgccc cttggctcct gcgcctacca cagtgtctgg  
 8221 tccttggtag agtcgccaag taagcgttgc ttttccactc agggaggtgg cttagagggtg  
 8281 cacgcgagtc ggataggagc aaacctgggt ctcactctcg tgtctcttct tgtctccgg

**Exon 4**

8341 tgtggcgcg cgcaggtgaa ggtgtggttc cagaaccggc ggatgaagtg gcggcactcc  
 8401 aaggaggccc aggcccaaaa ggacaaggac aaggaggctg gcgagaagcc atcaggtgga

**C4431T** **G4447A**

8461 gcccgggctg cggatggcga gcaggacgag aggagcccc gccgttctga aggcgaggct

**C4524G**

8521 gagagcgaga gcagcgactc cgagtcctg gacatggccc ccagcgacac ggagcggact  
 8581 gaggggagtg agcgttctct gcaccaaaca acagttatta aggccccggg cactggcgcc  
 8641 tcattaccg ccagcagtg tgggagtggt gggagcagc gcggcgcgcg caatagtctc  
 8701 agcttcagca gcgccagcag tcttagtagc agcagcacca gtgcgggttg cgccagcagc  
 8761 cttggcgcg gcggcgctc ggagcttctc cctgcaacac agcccacagc cagcagcgt

**3' UTR** **C4844T**

8821 cccaaaagcc ccgagccagc ccaaggcgcg cttggctgct tatagactgt actagggagg  
 8881 aggggatccg ggccttgcgt gcagcctccc aaccatgggc tgggttttgt gcttactgta  
 8941 tgttggcgac ttggtagggc aggagacgca gcgtggagcc tacctcccga cattcacgct  
 9001 tcgccccacg ctgctccgac tggctgcagc ggacactgcc caaagcagag gggagtctca  
 9061 gtgtcctgct agccagccga acacttctct ccggaagcag gctggttcga ctgtgagggtg  
 9121 tttgactaaa ctgtttctct gactcgcccc agaggtcgtg gctcaaaggc acttaggacg  
 9181 ccttaaattt gtaataaaaa tgtttactac ggtttgtaaa ggccgcttgg ctttgctggg  
 9241 ggttgtttaag gccagagatc tacaaccgga ccttagtccc ggggacactg tagaatgcag  
 9301 cagctgaagg tgggtgggct ggagtctcag ggaagtggc tcaacctcag agccatcttg  
 9361 ttacagacat cagagatggg cgtctgggtt tagaggcttc taattaagag atttctagcg  
 9421 ccaactgcca ctgaaagtgc cctctgagac cctgagtagc ctgagagtgc agcaggccat  
 9481 agaaactggt aggccagtgc aacagatggt tccccattc acagtatgga cgaaatgagt  
 9541 tcctagagta ctcagagtgt gaatggggaa ggcagtgatg ccaggcgggg tcaatctagg  
 9601 cacagctgta atcactatgt ggacgcgaag cgcgggccc gagccctgca caaacttttc  
 9661 cttgttccgg gatggggtag aggacaggtt tgcaatgttg ctgaggaaag gacagacatg  
 9721 acacagtggg tagagctgga agcttgggtc ttagagtgcc agggccctgg ttgtaaacat  
 9781 gccaaacaaa gaggtgactt cttcaagggt aagcagaggc acagcccaga tcagaacttg  
 9841 gacttctctg cctacatgtg gccacggata gaactatgaa gttgcactct ccattccctc  
 9901 atccacgcaa aaattttcct ttgcaatttg gccactggag gtgcctagat gagctctttc  
 9961 tccccaaagc tgctgagagt cgtgaggcag tttccccatc cactgcagc tggaaaatat  
 10021 gtagtaaac ttgacactgc tactaggatg ggcaattcaa agattttttg tttgtttatt  
 10081 tcttttaaag gtgaaaagt aaacctctct ccaggacctg tctctctgct tgtaactgtg  
 10141 aaatgtctgg agttgctaaa agctctttgg ggggatttta tagcaaatag atttctttgg  
 10201 gaaatcctga tcagtctcag tgccaatctc ttcggcactg agcaagtga ggacacaagg

## HLX1-GENKARTE

---

10261 tctctggcag acccagcato caggcgggggt ggcagttct cagaatgagt tgaggagagg  
10321 tgctgaagtc agagagccta ggacacacct cagtcccttg gccagagtgg gaaagttctc  
10381 agcggctctc tgtcttgctt atctctcca cttttagaca ttcccctgga gctcattcca  
10441 ggatctctgt tctcgacttt tccatccagg ggtgaagtag aggcagcaga ttgagccttc  
10501 ttacacttgc atagccagat acaagatata gataacaagt cccaaagcca acacatggat  
10561 gcaaagatga tcatttcctg acccagccaa ccccctaagt ccccaaactcg agatgattca  
10621 agagcagtga gaatggagta ggggcagaat gatcagagat gtacaattta gtcaagagaa  
10681 aagaaagagc ataccacaag ggaccccatc ttcaatagga acatgaacta gctgttatcc  
10741 ctaattgtgt cacaagagtt tccaggccag ggcagcctcc ccacctggcc tgggtgcggg  
10801 ccagggtctg gatagttctt caagccttct gtaggctctg ctgccaaact tcaggattcc  
10861 ctctgtacct cagttttgtc tgcattatcg atatcaattt cccctgaccc cacatatcga  
10921 aattctggaa gcaggatata ccaagcacat cgaattttga ggtgcttcaa tccagctctg  
10981 gcgtaagga gaataacgcy tcggcacgca cacttagctg aggagcggag tctagggaag  
11041 aaaggtgggg aggatgcttt atacaaaccg cactttcccc tgctcctcac ctggcctggy  
11101 aggtttccgc taccgcaaaa cccagaccgt aggtccacgc cctggccccg gggctttgaa  
11161 cgtgaagaaa atcatcatcg gggaatgtca tgatgtgatt tcaggtagaa ttctgcctta  
11221 tttaggccac ctttcgccag gccagggggc acggcagagc tggggggctc agggatgaag  
11281 tgagccgggg ggggtgagcgc ctgagggcgg gagtcagaag gacgaatacc accctagtgc  
11341 tcgcaggagg cgcccctgct tccgccaccc ccaccccag ttcctagtca gttatcacct  
11401 gaagttcttg cggggcttta ccctagcagt ggagttcttc cacatttcat cagaatcgga  
11461 atatcacaag ccccggaaaa gttacagttc atctggaaga agggtagcca caggtggcca  
11521 ggaggaaagg ctaaaatttg gccggatagt cccatcccag ggctgctctc tcgaccccgg  
11581 gtactgggggt cttcttgcca ggcgaaaatg ctagcaaagg cggccaagca gctcgaaatt  
11641 cttcaaccaa gacctagagt tttcagaccc ggaagagaag gccacagcgc gaccgtgcyg  
11701 ggcgctagaa ccgctcaggg ttgaggcttg gagcaggaga gcgcgcgggc cccggagcag  
11761 agcagagcag agcagaacag agccgcggcc cccgccctc ctgcacacaa cccgagactc  
11821 cagccagcga ttgctctttg agcaaagctt tgcctagccc gctgaagtcc cgctgcgcgg  
11881 agccctccga aaaaggctac caaggtgcac agaggctcac agagggatgg tgaccacggt  
11941 gcgtttctct tggggcgggg gtagggactc aataccatc acccatcccc tccaacgtgg  
12001 acgcacacag acctgcagat tcatatagac acacgagaga caggcagtat actggctatt  
12061 tcagcacttt gcgggtaaaa ccacgctaataaattcccc attctcctcc atattggcaa  
12121 gcagagagga gctctgccc ccttattcag cctgtgtggg tgggtagggc gcttgtttcc  
12181 acagagaatt tgcctagcgc caagtccgc ggactaaacc actgaaggct ggcgcgcgt  
12241 ttctctccct tttgcccgt tcagtcgaga gtgggcatag acatccttgc gagcagtgtg  
12301 tctccctcgc cttcctgtgc ccaccccccc gcccgaggcc aaagtctgca gccccgggg  
12361 caggtccagg cgaggtcctg cttccaaggg aggtcaggt cattatacca gccagggaga  
12421 tttcccgtt ctctccctct actcctgca aagagtctg tggattgtag gcgggctcag  
12481 actctgcttg ccacaaatcc ctctgacatc ctttgacct cagaggcaac cataaaggaa  
12541 ctccagtcac tctgggatct tttctctggc tgccctctct acccaggatc tggagtttga  
12601 tgttggcagg ggatgaacta ggttgtggcc agcgcagggc aggcacag

Erklärung:

SNPs

UTR

Exon

Intron

Hypervariabler Bereich

**8 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Aberg, N., Hesselmar, B., Aberg, B. & Eriksson, B. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin Exp Allergy* **25**, 815-9 (1995).
2. von Mutius, E. et al. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 358-64 (1994).
3. Kuhni, C.E. & Sennhauser, F.H. The Yentl syndrome in childhood asthma: risk factors for undertreatment in Swiss children. *Pediatr Pulmonol* **19**, 156-60 (1995).
4. Oswald, H. et al. Outcome of childhood asthma in mid-adult life. *Bmj* **309**, 95-6 (1994).
5. Grant EN, W.R., Weiss KB. Observations on emerging patterns of asthma in our society. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104** S1-9 (1999).
6. Kunz B, R.J., Überla K, 1989. Frequency of atopic diseases and allergic sensitization in preschool children in different parts of Bavaria. *Allergology* **12**, 144 (1989).
7. von Mutius, E., Fritsch, C., Weiland, S.K., Roll, G. & Magnussen, H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *Bmj* **305**, 1395-9 (1992).
8. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* **12**, 315-35 (1998).
9. Johannes Ring, T.F., Gerhard Schulz-Werninghaus, Urban + Vogen GmbH. Weißbuch Allergie in Deutschland. (Januar 2004).
10. Hrsg. v. Gerhard Grevers u. Martin Röcken, T.V. Taschenatlas der Allergologie: Grundlagen, Diagnostik, Klinik (2001).
11. Carey, V.J., Weiss, S.T., Tager, I.B., Leeder, S.R. & Speizer, F.E. Airways responsiveness, wheeze onset, and recurrent asthma episodes in young adolescents. The East Boston Childhood Respiratory Disease Cohort. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 356-61 (1996).
12. Cookson, W.O. & Moffatt, M.F. Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science* **275**, 41-2 (1997).
13. Silverman M, W.N. Wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* **52**, 936-937 (1997).
14. Harris, J.R., Magnus, P., Samuelsen, S.O. & Tambs, K. No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 43-9 (1997).
15. Rothe, T. Modernes Asthma-Management. *Verlag Hans Huber* **3. vollständig überarbeitete Auflage**(2005).
16. Rothe T, H.A., Verlag: Huber, Bern; Auflage: 3., vollst. überarb. A. Modernes Asthma-Management. Ein Therapie-Leitfaden (Taschenbuch). (November 2004).
17. [www.medizininfo.de/allergie/asthma/asthmaformen.htm](http://www.medizininfo.de/allergie/asthma/asthmaformen.htm).
18. [www.allergome.org](http://www.allergome.org).
19. Host, A. & Halken, S. The role of allergy in childhood asthma. *Allergy* **55**, 600-8 (2000).
20. Wahn, U. What drives the allergic march? *Allergy* **55**, 591-9 (2000).
21. Kroegel C. Asthma bronchiale: Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik und Therapie. *Georg Thieme Verlag* (2002).
22. Romagnani, S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int, Arch Allergy Immunol* **98**, 279-285 (1992).
23. Angelika Vollmer, T.D. Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*.

24. Pfeiffer, C. et al. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med* **181**, 1569-74 (1995).
25. Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M. & O'Garra, A. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* **182**, 1579-84 (1995).
26. Tao, X., Grant, C., Constant, S. & Bottomly, K. Induction of IL-4-producing CD4+ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J Immunol* **158**, 4237-44 (1997).
27. Ariga, H. et al. Instruction of naive CD4+ T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology* **122**, 210-21 (2007).
28. Mullen, A.C. et al. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* **3**, 652-8 (2002).
29. Glimcher, L.H. Trawling for treasure: tales of T-bet. *Nat Immunol* **8**, 448-50 (2007).
30. Lighvani, A.A. et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15137-42 (2001).
31. Afkarian, M. et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* **3**, 549-57 (2002).
32. Mullen, A.C. et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* **292**, 1907-10 (2001).
33. Renauld, J.C. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* **54**, 577-89 (2001).
34. Lugo-Villarino, G., Ito, S., Klinman, D.M. & Glimcher, L.H. The adjuvant activity of CpG DNA requires T-bet expression in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13248-53 (2005).
35. Sullivan, B.M. et al. Increased susceptibility of mice lacking T-bet to infection with Mycobacterium tuberculosis correlates with increased IL-10 and decreased IFN-gamma production. *J Immunol* **175**, 4593-602 (2005).
36. Peng, S.L., Townsend, M.J., Hecht, J.L., White, I.A. & Glimcher, L.H. T-bet regulates metastasis rate in a murine model of primary prostate cancer. *Cancer Res* **64**, 452-5 (2004).
37. Peng, S.L., Szabo, S.J. & Glimcher, L.H. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5545-50 (2002).
38. Bettelli, E. et al. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **200**, 79-87 (2004).
39. Juedes, A.E., Rodrigo, E., Togher, L., Glimcher, L.H. & von Herrath, M.G. T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in type 1 diabetes. *J Exp Med* **199**, 1153-62 (2004).
40. Wang, J. et al. Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells. *J Clin Invest* **116**, 414-21 (2006).
41. Kips, J.C. et al. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 535-9 (1996).
42. Lack, G. et al. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol* **157**, 1432-9 (1996).
43. Li, X.M. et al. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. *J Immunol* **157**, 3216-9 (1996).
44. Maggi, E. et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* **148**, 2142-7 (1992).
45. Parronchi, P. et al. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* **149**, 2977-83 (1992).

46. Manetti, R. et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**, 1199-204 (1993).
47. Rengarajan, J., Szabo, S.J. & Glimcher, L.H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* **21**, 479-83 (2000).
48. Scott, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* **147**, 3149-55 (1991).
49. Murphy, E. et al. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* **183**, 901-13 (1996).
50. Klinman, D.M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* **4**, 249-58 (2004).
51. Erb, K.J., Holloway, J.W., Sobeck, A., Moll, H. & Le Gros, G. Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med* **187**, 561-9 (1998).
52. Pochard, P. et al. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 617-23 (2002).
53. Mohamadzadeh, M. et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2880-5 (2005).
54. Revets, H., Pynaert, G., Grooten, J. & De Baetselier, P. Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J Immunol* **174**, 1097-103 (2005).
55. Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* **122**, 107-18 (2005).
56. Sudowe, S., Ludwig-Portugall, I., Montermann, E., Ross, R. & Reske-Kunz, A.B. Prophylactic and therapeutic intervention in IgE responses by biolistic DNA vaccination primarily targeting dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 196-203 (2006).
57. Manetti R, A.F., Tomasevic L et al. . Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type I-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferone-alpha and interleukin-12. *Eur J Immunol* **25**, 2656-2660 (1999).
58. Parronchi, P. et al. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* **163**, 5946-53 (1999).
59. Tighe, H. et al. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* **106**, 124-34 (2000).
60. Simons, F.E., Shikishima, Y., Van Nest, G., Eiden, J.J. & HayGlass, K.T. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 1144-51 (2004).
61. Amedei, A. et al. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest* **116**, 1092-101 (2006).
62. Brugnolo, F. et al. The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4+ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 380-8 (2003).
63. Fili, L. et al. Redirection of allergen-specific TH2 responses by a modified adenine through Toll-like receptor 7 interaction and IL-12/IFN release. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 511-7 (2006).
64. Szabo, S.J. et al. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **295**, 338-42 (2002).



65. Allen, J.D. et al. Novel murine homeo box gene on chromosome 1 expressed in specific hematopoietic lineages and during embryogenesis. *Genes Dev* **5**, 509-20 (1991).
66. Kennedy, M.A., Rayner, J.C. & Morris, C.M. Genomic structure, Promotor sequence, and revised translation of human homeobox gene HLX1. *Genomics* **22**, 348-55 (1994).
67. Lints, T.J., Hartley, L., Parsons, L.M. & Harvey, R.P. Mesoderm-specific expression of the divergent homeobox gene Hlx during murine embryogenesis. *Dev Dyn* **205**, 457-70 (1996).
68. Zheng, W.P. et al. Up-regulation of Hlx in immature Th cells induces IFN-gamma expression. *J Immunol* **172**, 114-22 (2004).
69. Yamashita, M. et al. Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *J Biol Chem* **277**, 42399-408 (2002).
70. Shirakawa, I. et al. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* **21**, 60-4 (2000).
71. Grunig, G. et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* **282**, 2261-3 (1998).
72. Wills-Karp, M. The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits. *Respir Res* **1**, 19-23 (2000).
73. Wills-Karp, M. et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* **282**, 2258-61 (1998).
74. Romagnani, S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* **36**, 1357-66 (2006).
75. Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* **18**, 263-6 (1997).
76. Moller, D.R. et al. Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. *J Immunol* **156**, 4952-60 (1996).
77. Frostegard, J. et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* **145**, 33-43 (1999).
78. Eder, W., Ege, M.J. & von Mutius, E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* **355**, 2226-35 (2006).
79. Büchele G., R.P., Weinmayr G., Keil U., Leupold W., von Mutius E., Weiland S. Assessing bronchial responsiveness to hypertonic saline using the stepwise protocol of phase two of the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC II). *Pediatr Pulmonol* **42**, 131-140 (2007).
80. Weiland, S.K. et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J* **14**, 862-70 (1999).
81. Braun-Fahrlander, C. et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* **29**, 28-34 (1999).
82. Von Ehrenstein, O.S.e.a. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* **30**, 187-93 (2000).
83. Riedler, J., Eder, W., Oberfeld, G. & Schreuer, M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* **30**, 194-200 (2000).
84. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-80 (2001).
85. Eder, W. et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 482-8 (2004).



86. Feijen, M., Gerritsen, J. & Postma, D.S. Genetics of allergic disease. *Br Med Bull* **56**, 894-907 (2000).
87. Kabesch M. Asthma und Allergie: Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren. . . *Monatsschrift, Kinderheilkunde* **149**, 94-105 (2001).
88. Kabesch, M. Candidate genes and the genetic epidemiology of asthma. *Paediatr Respir Rev* **5 Suppl A**, S23-5 (2004).
89. Li, X., Wills-Karp, M. & Ewart, S. Investigating Gata3 as a positional candidate gene for allergic asthma in a murine model. *Int J Immunogenet* **33**, 333-7 (2006).
90. Pykalainen, M. et al. Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* **115**, 80-7 (2005).
91. Finotto, S. et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* **295**, 336-8 (2002).
92. Raby, B.A. et al. T-bet polymorphisms are associated with asthma and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 64-70 (2006).
93. Chung, H.T. et al. Association analysis of novel TBX21 variants with asthma phenotypes. *Hum Mutat* **22**, 257 (2003).
94. Ylikoski, E. et al. Association study of 15 novel single-nucleotide polymorphisms of the T-bet locus among Finnish asthma families. *Clin Exp Allergy* **34**, 1049-55 (2004).
95. Akahoshi, M. et al. Functional Promotor polymorphism in the TBX21 gene associated with aspirin-induced asthma. *Hum Genet* **117**, 16-26 (2005).
96. Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215 (1988).
97. Weiland, S.K. et al. Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods. *Eur Respir J* **24**, 406-12 (2004).
98. [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de).
99. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-8 (1992).
100. Karas, M.a.F.H. "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301 (1988).
101. Griffin, T.J.S., L. M. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol* **18**, 77-84 (2000).
102. Sasieni, P. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* **53**, 1253-1261 (1997).
103. [www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d13/13a.htm](http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d13/13a.htm).
104. Hartl, D.a.A.C. Principles of population genetics. (1997).
105. [www.schiller-gymnasium-berlin.de](http://www.schiller-gymnasium-berlin.de).
106. Tunon de Lara, J. Sensitization of human airways: what is the role of immunoglobulin-E? *Clin. Exp. Allergy* **28**, 660-663 (1998).
107. Izuhara, K. & Shirakawa, T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int J Mol Med* **3**, 3-10 (1999).
108. Caramori, G. et al. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur Respir J* **18**, 466-73 (2001).
109. Nakamura, Y. et al. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 215-22 (1999).
110. Ray, A. & Cohn, L. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* **104**, 985-93 (1999).
111. Yamashita, N. et al. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L1045-51 (2006).

112. Vargaftig, B.B. & Singer, M. Leukotrienes mediate murine bronchopulmonary hyperreactivity, inflammation, and part of mucosal metaplasia and tissue injury induced by recombinant murine interleukin-13. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 410-9 (2003).
113. Venkayya, R. et al. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 202-8 (2002).
114. Schnyder, B. et al. Biochemical and morphological characterization of vascular and lymphocytic interleukin-4 receptors. *Am J Pathol* **149**, 1369-79 (1996).
115. van der Velden, V.H., B.A. Naber, A.F. Wierenga-Wolf, R. Debets, H.F. Savelkoul, S.E. Overbeek, H.C. Hoogsteden, and M.A. Versnel. Interleukin 4 receptors on human bronchial epithelial cells; an in vivo and in vitro analysis of expression and function. *Cytokine* **10**, 803-813 (1998).
116. Amrani, Y. & Panettieri, R.A., Jr. Cytokines induce airway smooth muscle cell hyperresponsiveness to contractile agonists. *Thorax* **53**, 713-6 (1998).
117. Hakonarson, H., Maskeri, N., Carter, C. & Grunstein, M.M. Regulation of TH1- and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J Clin Invest* **103**, 1077-87 (1999).
118. Walzl, G. et al. Prior exposure to live Mycobacterium bovis BCG decreases Cryptococcus neoformans-induced lung eosinophilia in a gamma interferon-dependent manner. *Infect Immun* **71**, 3384-91 (2003).
119. Hofstra, C.L. et al. Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**, 826-35 (1998).
120. Dahl, M.E., Dabbagh, K., Liggitt, D., Kim, S. & Lewis, D.B. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat Immunol* **5**, 337-43 (2004).
121. Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R.H. & Umetsu, D.T. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* **103**, 175-83 (1999).
122. Kumar, R.K., Herbert, C., Webb, D.C., Li, L. & Foster, P.S. Effects of anticytokine therapy in a mouse model of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 1043-8 (2004).
123. Gurujeyalakshmi, G. & Giri, S.N. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res* **21**, 791-808 (1995).
124. Hyde, D.M., Henderson, T.S., Giri, S.N., Tyler, N.K. & Stovall, M.Y. Effect of murine gamma interferon on the cellular responses to bleomycin in mice. *Exp Lung Res* **14**, 687-704 (1988).
125. Wen, F.Q. et al. Interleukin-4- and interleukin-13-enhanced transforming growth factor-beta2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 484-90 (2002).
126. Saito, A., Okazaki, H., Sugawara, I., Yamamoto, K. & Takizawa, H. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* **132**, 168-76 (2003).
127. Pene, J. et al. Modulation of IL-4-induced human IgE production in vitro by IFN-gamma and IL-5: the role of soluble CD23 (s-CD23). *J Cell Biochem* **39**, 253-64 (1989).

128. Coffman, R.L. & Carty, J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* **136**, 949-54 (1986).
129. Miyamoto, M. et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* **54**, 903-13 (1988).
130. Barnes, K.C. et al. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 485-91 (1999).
131. Itoh, S., Harada, H., Nakamura, Y., White, R. & Taniguchi, T. Assignment of the human interferon regulatory factor-1 (IRF1) gene to chromosome 5q23-q31. *Genomics* **10**, 1097-9 (1991).
132. Mansur, A.H., Bishop, D.T., Markham, A.F., Britton, J. & Morrison, J.F. Association study of asthma and atopy traits and chromosome 5q cytokine cluster markers. *Clin Exp Allergy* **28**, 141-50 (1998).
133. Tang, M.L., Coleman, J. & Kemp, A.S. Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-atopic children with asthma. *Clin Exp Allergy* **25**, 515-21 (1995).
134. Ying, S., Durham, S.R., Corrigan, C.J., Hamid, Q. & Kay, A.B. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**, 477-87 (1995).
135. Jan Koolman, R.K.H. Taschenatlas der Biochemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York* **2. überarbeitete und erweiterte Auflage**(1998).
136. Markus Koch, M.W., Christine Reuter, Marion Herma, Hartwig Schütte, Norbert Suttorp, Helen Collins, Stefan Kaufman. Role of Local Pulmonary IFN- $\gamma$  Expression in Murine Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**, 211-219 (2006).
137. Strachan P.D., B.B.K., Anderson H.R. Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national British cohort. *BMJ* **312**, 1195-1199 (1996).
138. von Mutius, E., Martinez, F.D., Fritsch, C., Nicolai, T., Reitmair, P., Thiemann, H. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* **308**, 692-695 (1994).
139. Krämer, U., Heinrich, J., Wjst, M., Wichmann, H.E. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* **353**, 450-454 (1999).

**9 TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Verwendete Primer-Paare und die dazugehörigen Puffer-Bedingungen für die PCR ..... 40

Tabelle 2: Komponenten eines PCR-Ansatzes..... 41

Tabelle 3: Allgemeine Temperaturbedingungen einer PCR ..... 41

Tabelle 4: Alle verwendeten Sequenzier-Primer ..... 45

Tabelle 5: Allgemeine Temperaturbedingungen für die Sequenzierreaktion. .... 46

Tabelle 6: Verwendete Sense-, Antisense- und hME-Primer für die 15 genotypisierten SNPs des HLX1-Gens..... 53

Tabelle 7: Standard Mastermix für die PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode ..... 54

Tabelle 8: Standardprotokoll für die PCR-Reaktion im Rahmen der hME-Methode..... 54

Tabelle 9: Standard Mastermix für die SAP-Reaktion im Rahmen der hME-Methode ..... 55

Tabelle 10: Standard Mastermix für die Primer-Extention Reaktion im Rahmen der hME Methode..... 56

Tabelle 11: Untersuchte Bereiche des HLX1-Gens und deren Länge in bp ..... 66

Tabelle 12: Bezeichnung und Lokalisation der SNPs im HLX1-Gen ..... 67

Tabelle 13: HWE-Ergebnisse der SNPs für die Dresden-Population ..... 75

Tabelle 14: Assoziation der SNPs mit Asthma bronchiale in der Dresdenpopulation..... 77

Tabelle 15: Assoziation der SNPs mit atopischem Asthma in der Dresdenpopulation ..... 78

Tabelle 16: Assoziation der SNPs mit nicht-atopischem Asthma in der Dresdenpopulation.. 79

Tabelle 17: Assoziation der SNPs mit Atopie in der Dresdenpopulation ..... 80

Tabelle 18: Daten der weiterführenden Analyse des HLX1-Gens mit einer Abrissgrenze von  $r^2=0,8$  im Linkage Disequilibrium ..... 82

Tabelle 19: Haplotypfrequenzen der Dresden Population und die Assoziation der Haplotypen mit Asthma bronchiale. .... 83

Tabelle 20: Haplotypfrequenzen der Dresden Population und die Assoziation der Haplotypen mit atopischem Asthma. .... 84

Tabelle 21: Haplotypfrequenzen der Dresden Population und die Assoziation der Haplotypen mit nicht-atopischem Asthma..... 84

Tabelle 22: Allelspezifische Bindeverhalten der Transkriptionsfaktoren ..... 90

**10                    ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Pathomechanismen des Asthma bronchiale..... 7

Abbildung 2: Die T-Helferzellendifferenzierung. .... 10

Abbildung 3: Die Th<sub>1</sub>-Zellendifferenzierung..... 12

Abbildung 4: Graphische Darstellung der Funktionen von T-bet..... 14

Abbildung 5: Graphische Darstellung der HLX1-Funktionen..... 18

Abbildung 6: Die Th<sub>2</sub>-Zellendifferenzierung..... 20

Abbildung 7: Beispiel für eine eindeutig analysierbare Sequenz. .... 47

Abbildung 8: Schematische Darstellung des MALDI-TOF Massenspektrometers. .... 49

Abbildung 9: Schematische Darstellung der hME-Reaktion im Rahmen der MALDI-TOF  
Analyse..... 50

Abbildung 10: Aufbau des Pipettierschemas für eine 96er Platte..... 51

Abbildung 11: Aufbau des Pipettierschemas für eine 384er Platte..... 52

Abbildung 12: Beispiel für eine statistische Auswertungstabelle ..... 58

Abbildung 13: Schematische Darstellung des HLX1-Genoms..... 66

Abbildung 14: Schematische Darstellung des HLX-Gens mit den identifizierten SNPs. .... 69

Abbildung 15: Hypervariabler Bereich in der 5'UTR ..... 70

Abbildung 16: Kopplungskarte (Linkage Map) der HLX1-SNPs der Screening-Population.. 71

Abbildung 17: Graphische Darstellung des Linkage Disquilibrium..... 73

Abbildung 18: Vista-Browser Analyse des HLX1-Gens ..... 86

**11 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

APC	Antigenpräsentierende Zellen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
CDS	Codierende Sequenz
cm	Centimeter
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
FEV <sub>1</sub>	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
Fwd	Forward
g	Formelzeichen für die Erdbeschleunigung, Gravitationskonstante ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
GATA-3	GATA binding protein 3
HLX1	H2.0-like homeobox 1
hME	Homogeneous-Mass-Extent
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
H <sub>2</sub> O	Formelzeichen für Wasser
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

IL-4R $\alpha$	Interleukin-4-Rezeptor
IL-12R $\beta$ 2	Interleukin-12-Rezeptor
IRF	IFN regulatory factor
ISSAC	International study of asthma and allergies in childhood
JAK	Januskinase
kb	Kilobasen
LD	Linkage Disequilibrium
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAF	Minor allele frequency
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NC	Negativcontrol
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
OD260/OD280	Quotient der Extinktionen zur Bestimmung der Reinheit von DNA-Lösungen
OR	Odds ratio
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomol
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
Rev	Reverse
SAP	Shrimp alkaline phosphatase

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

sec	Sekunde
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T-Zellrezeptor
Th <sub>0</sub>	Unspezifische T-Helferzellen
Th <sub>1</sub>	T-Helferzellen des Typs 1
Th <sub>2</sub>	T-Helferzellen des Typs 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tregs	T regulatorische Zellen
U	Unit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolett
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar



### 12 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt für die Bereitstellung der Doktorandenstelle im Forschungszentrum „Kubus“ des Dr. von Haunerschen Kinderspitals.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. med. Michael Kabesch für die Überlassung des interessanten Themas der vorliegenden Dissertation, die professionelle Betreuung und die Unterstützung und Geduld bei der Ausarbeitung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Ein großes Lob und vielen Dank geht an meine Mentorin und Freundin Frau Dr. rer. nat. Michaela Schedel. Sie stand mir bedingungslos mit Rat und Tat zur Seite, weswegen ich ihr einen großen Teil dieser Arbeit zu verdanken habe. Ich hätte mir keine bessere Mentorin vorstellen können.

Ich danke ganz besonders den Mitarbeitern des Labors der Allergogenetik: Frau Ilona Dahmen, Frau Anja Pleiss, Frau Dipl. biol. Kathrin Suttner für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung ihrer Daten, Herrn Martin Depner für die statistische Auswertung und allen Doktoranden, allen voran Frau Dr. med. Anna Pieper für ihre Hilfe.

Ich danke meiner Familie Dorothee und Peter Oltersdorf, die mir die Kraft und den Halt geben und mich in all meinen Vorhaben unterstützen und meinem Bruder Marc Ruoff, der immer an mich glaubt und der es schafft, mich in guten und schlechten Zeiten ganz besonders zu motivieren.

Ein großer Dank gilt Herrn Volker Hartmann für seine unendliche Geduld und Gelassenheit und seiner großen Hilfe diese Arbeit fertigzustellen.

Bedanken möchte ich mich auch ganz recht herzlich bei Frau Friederike Scharrel, die in kürzester Zeit meine Arbeit auf Rechtschreibung und Grammatik korrigiert hat.

Vielen Dank geht an alle meine Freunde für die jahrelange Unterstützung und die Ausdauer, mir in allen Lebenslagen zur Seite zu stehen.

**13                   LEBENS LAUF**

**Angaben zu meiner Person**

Geburtstag:                   12. Februar 1975  
Geburtsort:                   Tübingen  
Staatsangehörigkeit:       deutsch  
Familienstand:               ledig

**Schulbildung / Berufsbildung**

1985 – 1991                   Grund- und Realschule, Münsingen  
09/1991 – 07/1995           Abitur, Ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Reutlingen  
10/1996 – 07/1999           Ausbildung zur Medizinisch-technischen-Assistentin,  
Fachhochschule und Berufskolleg NTA,  
Staatlich anerkanntes Berufskolleg Prof. Dr. Grübler, Isny i.A.

**Berufserfahrung**

08/1999 – 12/2001           MTA am Pathologischen Institut der LMU München,  
Forschungsgruppe Prof. Dr. Nerlich,  
daraus hervorgegangene Publikationen:

- Immunhistochemical analysis of major TGF- $\beta$ -isoforms and their receptors in laryngeal carcinomas (2001)  
Virchow Arch 439: 531-539
- Molecular analysis of TGF- $\beta$ s and their receptors in human keratinocyte cell lines of different biological behaviour (2002)  
International journal of molecular medicine, 10: 371-376
- High frequency of TGF- $\beta$ -receptors-II Mutations in microdissected tissue samples from laryngeal squamous cell carcinomas (2003)  
Laboratory Investigation Vol. 83, No. 8, p.1241

02/2002 – 10/2004           Nacht- und Wochenendbereitschaftsdienste als MTA im  
klinisch-chemischen Notfall-Labor des Rotkreuzkrankenhauses  
München, Laborgemeinschaft Becker, Olgemüller & Kollegen

### **Hochschulstudium**

Abgeschlossenes Studium der Humanmedizin an der LMU München

04/2000 – 08/2002	Vorklinisches Studium
08/2002	Physikum
08/2003	1. Staatsexamen
03/2006	2. Staatsexamen
05/2007	3. Staatsexamen
06/2007	Approbation als Ärztin

### **Praktisches Jahr**

04/2006 – 07/2006	Innere Medizin: Klinikum München Schwabing, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie, Infektiologie und Immunologie
08/2006 – 11/2006	Urologie: Solothurner Spitäler AG, Kantonsspital Olten / Schweiz
12/2006 – 03/2007	Chirurgie: Klinikum München Schwabing, Schwerpunkt Chirurgische Intensivstation

### **Berufserfahrung**

09/2007 – 12/2007	Assistenzärztin in der II. Medizinischen Klinik, Klinik für Hämatologie und Onkologie, Prof. Dr. Schlimok, Zentralklinikum Augsburg
04/2008 – 09/2008	Allergogenetische Forschung am Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München, PD Dr. Michael Kabesch