

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Die Rolle von ADAM 33-Polymorphismen
bei Asthma bronchiale und Lungenfunktion im Kindesalter**

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

vorgelegt von
Carola Schön
aus
Offenburg
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Michael Kabesch
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Peter Thomas
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. Michael Kabesch
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR
Tag der mündlichen Prüfung:	30.10.2008

Meinen lieben Eltern

1	EINLEITUNG	1
1.1	Asthma im Kindesalter	1
1.1.1	Epidemiologie und klinisches Bild.....	1
1.1.2	Pathogenese des Asthma bronchiale	2
1.1.3	Diagnose	3
1.1.3.1	Lungenfunktionsdiagnostik	4
1.2	Genetische Grundlagen des Asthma bronchiale.....	6
1.3	ADAM 33 Genetik	8
1.4	Struktur und mögliche Wirkungsweise von ADAM 33	9
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Die Populationen	14
2.1.1	Beschreibung der Fall-Kontroll-Gruppe.....	14
2.1.2	Fragebogen (ISAAC).....	15
2.1.3	Hautuntersuchung.....	16
2.1.4	Haut-Prick-Test	16
2.1.5	IgE-Messung.....	17
2.1.6	Lungenfunktionsprüfung und Provokation des Bronchialsystems.....	17
2.1.7	Beschreibung der MAS-Geburtskohorten-Gruppe.....	18
2.1.8	Fragebogen	18
2.1.9	Nabelschnur-IgE	19
2.1.10	Gesamt-IgE-Messung und spezifische IgE-Antikörper.....	19
2.1.11	Urin-Untersuchungen	19
2.1.12	Staub-Proben	20
2.1.13	Lungenfunktionsprüfung und Provokation.....	20
2.2	Material.....	20
2.2.1	Enzyme	20
2.2.1.1	Polymerasen	20
2.2.1.2	sonstige Enzyme	20
2.2.2	Primer	21
2.2.2.1	PCR-Primer	21
2.2.2.2	PEP-Primer	21
2.2.2.3	MALDI-TOF-Primer	21
2.2.3	Lösungen, Puffer und Reagenzien.....	21
2.2.3.1	Lösungen, Puffer, Reagenzien für die DNA-Extraktion	21
2.2.3.2	Lösungen, Puffer, Reagenzien für PCR	22
2.2.3.3	Lösungen, Puffer, Reagenzien für die PEP-Reaktion	22
2.2.3.4	Lösungen, Puffer, Reagenzien für die MALDI-TOF	22
2.2.3.5	Lösungen, Puffer, Reagenzien für die DNA-Gelelektrophorese.....	23
2.2.4	Reaktionskits	23
2.2.5	Sonstige Materialien.....	23
2.2.6	Geräte und Hilfsmittel	23
2.2.7	Computerprogramme.....	24
2.3	Experimentelle Methoden	25
2.3.1	DNA-Extraktion	25
2.3.2	Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben.....	26
2.3.3	Primer-Extension-Preamplification (PEP)	26
2.3.4	Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen	28
2.3.5	Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS.....	29
2.3.5.1	Theoretische Grundlagen.....	29

2.3.5.2	Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF	31
2.3.5.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) im Rahmen der hME-Methode für die MALDI-TOF	32
2.3.5.4	Reinigen des PCR-Produktes (SAP-Reaktion).....	35
2.3.5.5	Primer-Extensions-Reaktion.....	35
2.3.5.6	Aufreinigung der Extensionsprodukte.....	36
2.3.5.7	MALDI-TOF im Rahmen der hME-Methode	36
2.4	Statistische Auswertung	37
2.4.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	37
2.4.2	Assoziationsstudien	38
2.4.2.1	Auswertung von kategorischen Variablen.....	38
2.4.3	Haplotyp-Analysen.....	39
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Assoziationsstudie	41
3.1.1	Analyse von SNP's im ADAM33-Gen	41
3.1.2	Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma	43
3.1.3	Ergebnisse der Assoziationsstudie von SNP's im ADAM33-Gen mit BHR ..	45
3.1.4	Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma <u>und</u> bronchialer Hyperreaktivität.....	47
3.1.5	Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP's im ADAM33-Gen mit Lungen- funktionsparametern	47
3.2	Haplotypanalyse	49
4	DISKUSSION	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
8	TABELLENVERZEICHNIS	75
9	ABKÜRZUNGEN.....	76
10	CURRICULUM VITAE	79
11	DANKSAGUNG	80

1 EINLEITUNG

1.1 Asthma im Kindesalter

1.1.1 Epidemiologie und klinisches Bild

Allergische Erkrankungen stellen weltweit eines der großen gesundheitlichen Probleme dar. Dies gilt sowohl für Erwachsene als auch in noch stärkerem Ausmaß für Kinder. In Westeuropa und den USA stellt das Asthma bronchiale die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter dar, in Deutschland sind etwa 8 – 10 % der Kinder davon betroffen (von Mutius, Martinez et al. 1994). Asthma kann sich in jedem Lebensalter manifestieren, vor allem aber beginnt es im Kindesalter. Mehr als die Hälfte aller Patienten erkrankt vor dem 10. Lebensjahr. Bei 80 % der kindlichen Asthmatiker manifestiert sich die Erkrankung bis zum 1. Schuljahr, bei 45 % bereits im 1. Lebensjahr.

Die genaue Ätiologie von Asthma und anderen allergischen Erkrankungen konnte bisher nicht eindeutig gefunden werden. Vielmehr handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, deren Entstehung multifaktoriell erklärt wird. Epidemiologische Studien haben bestimmte Umwelteinflüsse als Risikofaktoren für die Entstehung von Asthma identifiziert (Martinez, Wright et al. 1995). Jedoch findet sich bei Asthma und Allergien auch eine familiäre Häufung, so dass neben Umwelteinflüssen die Entstehung von Asthma und allergischen Erkrankungen auch durch eine genetische Prädisposition bedingt ist. Diese Vielzahl kausaler Faktoren erklärt die große Variabilität in der Expression der Erkrankung.

Das klinische Bild wird typischerweise durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte expiratorische Dyspnoe bestimmt. Oft ist die erste Manifestation eines Asthmas bei Kleinkindern eine obstruktive Bronchitis, allerdings geht dies später nur bei etwa 15 - 30 % aller Patienten in ein Asthma bronchiale über (Martinez, Wright et al. 1995). In vielen Fällen geht die Neigung zur Entwicklung einer obstruktiven Bronchitis mit fortschreitendem Lebensalter verloren, da sich das Bronchialsystem des Kindes, das in den ersten 3 Lebensjahren noch prädisponiert ist für die Entwicklung

infektassoziiertes Atemwegsobstruktionen, mit dem Älterwerden anatomisch und funktionell weiterentwickelt (Martinez 1995). Klinische Erscheinungsformen variieren von wenig belastenden Symptomen wie leichtem Giemen über anfallsweisen Reizhusten in bestimmten Umweltsituationen (körperliche Belastung, Luftverschmutzung oder Temperaturwechsel) bis hin zum Asthmaanfall, der mit unproduktivem Husten, Engegefühl in der Brust bis hin zur bedrohlichen Atemnot und Überblähung des Thorax einhergeht (Kelly 1996). Typischerweise lassen sich trockene Rasselgeräusche wie Giemen, Pfeifen und Brummen auskultieren. Durch die erschwerte Atmung kann es inspiratorisch zu Einziehungen kommen, die Expiration ist meist verlängert und nicht selten kommt es im Anschluß an einen Asthmaanfall zur Exspektion von zähem, glasigem Sekret. Auch das Entstehen von Atelektasen ist möglich.

1.1.2 Pathogenese des Asthma bronchiale

Bei Asthma handelt es sich um eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung, die durch eine bronchiale Hyperreaktivität (BHR) gegenüber endogenen oder exogenen Stimuli und durch eine reversible Obstruktion der Atemwege charakterisiert ist. Dies zeigt sich klinisch durch anfallsweises Auftreten von giemender Atmung, Atemnot, Engegefühl und Husten. Diese Episoden sind üblicherweise verbunden mit generalisiertem, jedoch variabel erhöhtem Widerstand der Atemwege, der oft reversibel ist, entweder spontan oder infolge therapeutischer Maßnahmen (National Institutes of Health (National Heart 1997)). Grundlage der Obstruktion ist eine bronchiale Hyperreaktivität, die durch verschiedene Faktoren hervorgerufen wird. Die Atemwegsentszündung verursacht außerdem eine gesteigerte Atemwegsempfindlichkeit gegen eine Vielzahl verschiedener Reize, wie z.B. immunologische, physikalisch-chemische oder pharmakologische Reize. Atemwegsinfekte oder körperliche Belastung können beim kindlichen Asthmatiker einen Asthmaanfall auslösen (Romanet-Manent S. 2002). Beim allergischen Asthma wird ein Anfall vor allem durch Allergenkontakte (z.B. Hausstaub, Pollen, Tierhaare) getriggert. Zusätzlich besteht eine signifikante Assoziation mit anderen atopischen Phänomenen wie der Erhöhung des Gesamt-IgE und dem Auftreten spezifischer IgE-

Antikörper gegen zahlreiche ubiquitäre Allergene (Kabesch 2001). Keineswegs alle Patienten mit Asthma bronchiale sind allergisch, jedoch nimmt das Risiko, an Asthma zu erkranken, mit der Höhe des Gesamt-IgE zu (Burrows, Martinez et al. 1989).

Die Assoziation zwischen diesen einzelnen Parametern und Asthma ist unterschiedlich ausgeprägt, was die Komplexität dieser Erkrankung ausmacht.

Ausgelöst wird die Atemwegsobstruktion durch eine Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, sie wird begleitet von Hyperämie, einem Ödem und entzündlicher Infiltration der Schleimhaut. Die Atemwege können durch Schleim und abgelöste Bronchialepithelzellen verstopfen.

Morphologisch findet man eine Atemwegsentzündung mit charakteristischen Befunden wie Epitheldefekten, Hypertrophie glatter Muskelzellen, Proliferation mikrovaskulärer Strukturen, eine verdickte Basalmembran sowie einen vernarbenden Reparaturprozeß und irreversiblen Gewebeschaden (Chetta A 1996), (Ollerenshaw SL 1992; Cokugras H 2001). Bei chronischer Entzündung der Atemwege kommt es zum Umbau der Bronchialwand, was als „airway remodeling“ bezeichnet wird. Es handelt sich typischerweise um strukturelle Veränderungen in Zellen und Geweben in den Luftwegen. Es zeigen sich insbesondere histologische Veränderungen wie eine Zunahme des Bronchialwanddurchmessers durch eine subepitheliale Fibrosierung und dadurch eine Verdickung der Bronchialwand und eine Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur. Ebenso findet man eine Hyperplasie von Myofibroblasten und Gefäßen der Mukosa und Submukosa. Auch ein Schleimhautödem, eine Metaplasie der Mukosa und eine eosinophile Infiltration sind typische Befunde der chronischen Entzündungsreaktion und des Umbaus der Atemwege.

1.1.3 Diagnose

Die Atemwegsobstruktion ist das zentrale Symptom des Asthma bronchiale. Mit geeigneten Messgeräten, wie zum Beispiel dem Babyplethysmographen oder bei größeren Kindern dem Ganzkörperplethysmographen, kann das Ausmass der Obstruktion mit einer Lungenfunktion gemessen werden. Anhand der Anamnese, dem typischen klinischen Bild und Veränderungen in der Lungenfunktion kann die Diagnose eines Asthma bronchiale gestellt werden.

1.1.3.1 Lungenfunktionsdiagnostik

Es findet sich in der Lungenfunktionsanalyse vor allem eine reversible Atemwegsobstruktion. Zur Beurteilung von Schweregrad, Reversibilität und Variabilität der Obstruktion dient die Lungenfunktionsdiagnostik als objektive Messung. Durch regelmäßige Prüfungen der Lungenfunktion können auch Aussagen über den Schweregrad der Erkrankung und das Ansprechen auf eine Asthma-Therapie getroffen werden. Im akuten Anfall zeigen sich ein erhöhter Atemwegswiderstand, eine Verminderung von Vitalkapazität und Spitzenfluss (peak flow, PEF) und ein vergrößertes thorakales Gasvolumen.

Der Nachweis der Atemwegsobstruktion kann spirometrisch durch Messung der Sekundenkapazität (FEV1) und der gleichzeitig gemessenen inspiratorischen Vitalkapazität (VC), mittels Analyse von Fluss-Volumen-Diagrammen oder der Ganzkörper-plethysmographie sowie durch wiederholte Messungen des expiratorischen Spitzenflusses (Peak Flow, PEF) erfolgen (Buhl R 2006).

Die Messung der Einsekundenkapazität und Vitalkapazität erfolgt standardisiert während eines forcierten Expirations-Manövers innerhalb einer Sekunde mittels eines Spirometers (1994 Update). Die Messungen sind wiederholbar, jedoch von der Mitarbeit des Patienten abhängig. Beim Erwachsenen kann die FEV1 als Maß für die Obstruktion der Atemwege dienen, bei jüngeren Kindern ist jedoch aufgrund der mangelnden Mitarbeit ein solches Expirationsmanöver oft nicht gewährleistet und der Wert somit nur eingeschränkt verlässlich. Eine wichtige Kenngröße der Limitierung des Atemflusses ist der Quotient aus FEV1 und inspiratorischer Vitalkapazität (FEV1/VC) (1994 Update). Bei ungehindertem Atemfluss und guter Kooperation werden Werte des FEV1/VC-Quotienten von über 80 % erreicht. Werte, die unterhalb dieses Bereiches liegen weisen auf eine Obstruktion der Atemwege hin.

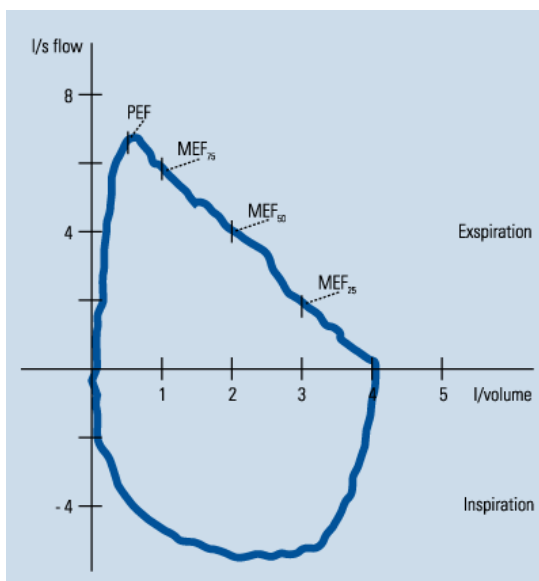
Mittels Peak Flow-Meter, einem handlichen und einfach zu bedienenden Gerät kann der expiratorische Spitzenfluss gemessen werden. Es ist auch in der häuslichen Umgebung zur täglichen Überwachung des Asthma-Schweregrades einsetzbar. Üblicherweise werden die Peak Flow-Werte am Morgen direkt nach dem Erwachen und abends vor dem Schlafengehen gemessen, da hier die Werte am niedrigsten bzw. am höchsten sind. So können tageszeitliche Schwankungen, Unterschiede von Tag zu Tag und auch ein Trend über mehrere Tage beurteilt werden. Eine zirkadiane PEF-

Variabilität von über 20 % können als diagnostisch für ein Asthma bronchiale angesehen werden. Wegen nicht ganz ausreichender Kooperationsfähigkeit sind die Peak Flow-Messungen bei Kindern häufig jedoch nicht aussagekräftig.

Die Fluss-Volumen-Kurve gibt Aufschlüsse über die dynamischen Parameter und lässt somit Rückschlüsse auf das Vorliegen, die Lokalisation und den Grad einer bronchialen Obstruktion zu. Es kann so der maximale Atemfluss bei unterschiedlichen Lungenvolumina gemessen werden. Der Peak-Flow (PEF) misst den maximalen Fluss bei forcierter Ausatmung. MEF 75, 50 und 25 stehen für maximalen expiratorischen Spitzenfluss bei 75, 50 und 25 % der forcierten expiratorischen Vitalkapazität (siehe Abbildung 1).

Je nach Kurvenverlauf erhält man Auskunft über die Art und das Ausmaß der Ventilationsstörung des Patienten. Der PEF- und der MEF75-Wert können als grobes Mass für die Obstruktion der großen Atemwege herangenommen werden, wogegen MEF 50 und 25 eher Auskunft über die atemmechanische Beschaffenheit der kleineren Atemwege liefert.

Abbildung 1: Fluss-Volumen-Kurve Gesunder (aus BDA Manual Asthma, Dr. H. Mitfessel)
PEF= expiratorischer Spitzenfluss, MEF 75, MEF 50 und MEF 25 = maximaler expiratorischer Fluss bei 75, 50 bzw 25 % der forcierten expiratorischen Vitalkapazität



Zum Nachweis oder Ausschluß einer bronchialen Hyperreaktivität können Messungen der Überempfindlichkeit der Atemwege durch inhalative Provokation mit Metacholin oder Histamin oder nach Kaltluftinhalation durchgeführt werden. Ein FEV1-Abfall um mehr als 20 % gilt als diagnostisch für ein Asthma bronchiale (Lindemann H. 2003). Der Nachweis einer bronchialen Hyperreaktivität weist eine hohe Sensitivität im Hinblick auf die Diagnose Asthma auf, bei allerdings niedriger Spezifität (O'Byrne 2000).

Lässt sich eine Obstruktion in der Lungenfunktion nachweisen, so empfiehlt sich ein Bronchospasmodolysetest, z.B. durch Inhalation eines Kurzzeit-Beta-2-Sympathomimetikums. Verbessert sich der FEV1-Wert um 15 – 20 % (d.h. die Obstruktion ist reversibel), so ist dieser als positiv zu bewerten und damit die Diagnose eines Asthma bronchiale nahe liegend.

1.2 Genetische Grundlagen des Asthma bronchiale

Für die Entstehung von Asthma sind weder Gene noch die Umwelt alleine verantwortlich zu machen. Vielmehr ist sie das Resultat aus dem Zusammenspiel von Umwelt und verschiedenen Genen, die den Patienten für eine Asthmaerkrankung anfällig machen. Wenn wichtige Umweltfaktoren auf einen genetisch vorbelasteten Organismus Einfluss nehmen, entsteht Asthma bronchiale (Barnes 1999). Das Risiko für ein Kind, atopische Erkrankungen wie Asthma zu entwickeln ist dann am größten, wenn Eltern oder Geschwister bereits an einer atopischen Erkrankung leiden. Es kann dann mit einer Verdopplung des Erkrankungsrisikos gerechnet werden. Bei so komplexen Erkrankungen wie Asthma mit seiner Vielfalt an klinischen Manifestationsformen ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass nur ein einzelnes Gen für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich ist. Erst die Kombination von verschiedenen, voneinander unabhängigen Genveränderungen scheint für das Auftreten der atopischen Erkrankung verantwortlich zu sein, ohne dass einzelnen Genen ein überproportionaler Anteil an dieser Prädisposition zufällt (Kabesch 2001). Zunächst konnte in Zwillingsstudien eine genetische Komponente bei Asthma gezeigt werden (Duffy, Martin et al. 1990). Der genetische Anteil an der Entstehung von Asthma bronchiale wurde hier auf 75 % geschätzt (Harris, Magnus et al. 1997). Monozygote

Zwillinge, deren Erbgut zu 100 % identisch ist, weisen eine deutlich höhere Konkordanz im Auftreten von allergischen Erkrankungen auf als dizygote Zwillinge (Erbgut nur zu 50% identisch). Eine genetische Beteiligung wurde so für Asthma, atopische Dermatitis, allergische Rhinitis, aber auch für intermediäre Phänotypen wie bronchiale Hyperreaktivität (BHR), Gesamt-IgE und spezifisches IgE gezeigt (Duffy, Martin et al. 1990).

Zur Identifizierung von Genen, die an der Entstehung von Asthma beteiligt sind, gibt es unterschiedliche Methoden: Kopplungsanalysen (linkage studies), Geschwisterpaaranalysen und die Kandidatengen-Methode.

Bei der Kopplungsanalyse handelt es sich um ein Verfahren, bei welchem die Vererbung einzelner Genabschnitte in unterschiedlichen Generationen innerhalb von Familien unter Verwendung von genetischen Markern untersucht wird. Bei diesen sogenannten Mikrosatellitenmarkern handelt es sich um variable DNA-Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sind. In den Familien sollte mindestens ein Kind von Asthma betroffen und die mit allergischen Erkrankungen assoziierten Phänotypen genau definiert sein (Wjst and Wichmann 1995; Daniels, Bhattacharya et al. 1996; Ober, Cox et al. 1998; Meunier, Dizier et al. 2000). In Kopplungsstudien wurden zahlreiche chromosomale Regionen (Loci) des Genoms identifiziert, die eine Kopplung zwischen den Markern und einem bestimmten allergischen Phänotyp aufwiesen. Das für die Krankheit relevante Gen kann dann im Umkreis des betreffenden Markers vermutet werden.

Bei der Geschwisterpaaranalyse werden entweder beide von Asthma betroffenen oder beide nicht betroffenen Geschwister untersucht und miteinander verglichen. Wiederum werden mit Mikrosatellitenmarkern krankheitsrelevante Genregionen eingegrenzt. Mit Assoziationsstudien oder funktionellen Untersuchungen können dann potentiell relevante Gene identifiziert werden.

Ziel einer Kandidatengenstudie ist die Entdeckung von krankheitsrelevanten Risikogenen. Hierfür wurden Gene untersucht, denen eine Beteiligung an der Pathogenese von Asthma und Allergie nachgewiesen werden konnte. Bei nicht verwandten Personen wurden diese Gene dann auf Mutationen untersucht (Baldini, Kabesch et al. 2000; Graves, Kabesch et al. 2000; Kabesch, Baldini et al. 2000; Shirakawa, Deichmann et al. 2000). Wird eine Mutation bei mindestens 3 % einer Bevölkerungsstichprobe gefunden, handelt es sich um einen sogenannten

Polymorphismus. Dieser Polymorphismus (= SNP, single nucleotide polymorphism) ist charakterisiert durch nur einen einzelnen Basenaustausch an einer bestimmten Position. Ansonsten spricht man von einer seltenen genetischen Variante.

Die Isolierung von Kandidatengenomen alleine aufgrund der chromosomalen Lokalisation des Krankheitsgenes nennt man Positionsklonierung (Collins 1992). Nach erfolgreichem Nachweis auf einen genetischen Krankheitsgrund in epidemiologischen Untersuchungen, erfolgt die genetische Kartierung des krankheitsassoziierten Gens auf Basis des Phänotyps in der Regel durch eine Kopplungsanalyse genetischer Marker. Mit Hilfe von Mikrosatelliten, die auf der Basis eines familiären Vererbungsmusters als Marker für eine mit dem Krankheitsphänotyp gekoppelte Genregion dienen, wird die Kandidatengenregion erfasst und immer weiter eingegrenzt. Wenn der DNA-Marker in chromosomaler Nähe zum Locus des Krankheitsgenes liegt (Kopplung), lässt sich bei den betroffenen Familienmitgliedern jeweils eine bestimmte Allel-Variante des Markers nachweisen. Mit Hilfe von familien- oder populationsbasierten Assoziationsstudien gilt es dann die Krankheitsgenregion mit Assoziationsmarkern in Form von Einzelbasenmutationen (SNP's) weiter einzugrenzen. Gelingt auf diese Weise die Isolierung einzelner assoziierter Genloci, werden in einem weiteren Schritt die funktionellen Variationen von Sequenzen des assoziierten Gens durch eine Sequenzierung der entsprechenden Genregionen identifiziert. Zur Validierung der gefundenen Risikomutationen sollte ihre Assoziation mit der Erkrankung anhand der Untersuchung in einer unabhängigen Population bestätigt werden. In sogenannten Assoziationsstudien wird überprüft, ob ein bestimmtes Allel eines Kandidatengens in einer Studienpopulation mit einem bestimmten Phänotyp signifikant häufiger auftritt als in einer Kontrollpopulation.

1.3 ADAM 33 Genetik

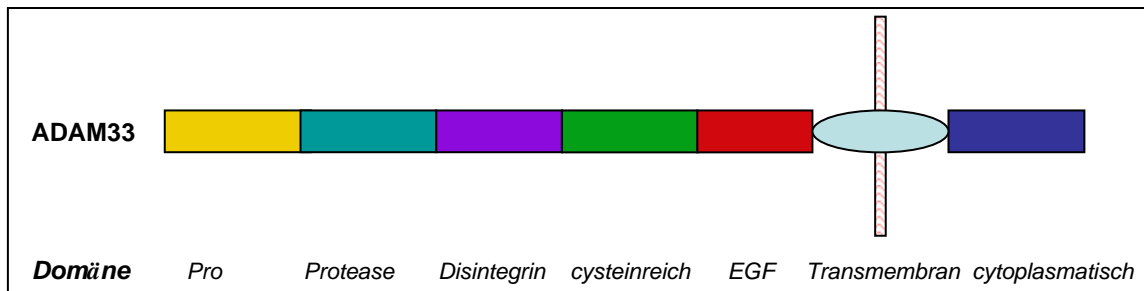
Durch Positionsklonierung wurde 2002 von Van Eerdewegh ein neues Asthma-Suszeptibilitätsgen auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 entdeckt (Van Eerdewegh, Little et al. 2002). Hierfür wurde bei 460 kaukasischen Familien (in UK und USA) eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Die Definition des untersuchten

Phänotyps „Asthma“ beinhaltete zunächst nur die Arzt diagnose Asthma und aktuelle Asthmatherapie. Es fanden sich hierbei 2 Kopplungssignale auf Chromosom 20p13. Um das Kopplungssignal weiter eingrenzen zu können wurde die Definition des Phänotyps genauer charakterisiert. Zur Arzt diagnose Asthma kam nun entweder bronchiale Hyperreagibilität (BHR), erhöhtes Gesamt-IgE oder positive spezifische IgE-Antikörper hinzu. Bei den nun verbleibenden 281 Familien konnte die Untersuchung des Phänotyps Asthma plus BHR eine deutlich erhöhte Assoziation mit dem zweiten gefunden Kopplungssignal zeigen. In der Region dieses zweiten Kopplungssignals liegt ein Mitglied der sogenannten ADAM-Gen-Familie. Es wurden nun 135 Polymorphismen in einer Fall-Kontroll-Studie mit 130 Asthmatikern und 217 Kontrollpersonen durchgeführt und 23 verschiedene Genregionen untersucht, wobei 7 SNP's im ADAM 33 Gen signifikant mit Asthma assoziiert schienen.

1.4 Struktur und mögliche Wirkungsweise von ADAM 33

ADAM 33 (=A Disintegrin And Metalloproteinase) ist eine zinkabhängige Metalloproteinase aus der ADAM-Gen-Familie, die inzwischen 35 Proteine beinhaltet (Primakoff 2000). Alle diese ADAM Proteine haben einen komplexen Strukturaufbau mit einer N-terminalen Signalsequenz, welcher eine Prodomäne, eine Metalloproteinase-Domäne, eine Disintegrin-Domäne, eine Cystin-reiche Domäne, eine EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domäne, eine Transmembran- und eine zytoplasmatische Domäne folgen. So vielfältig wie die Domänenstruktur, sind auch die damit verbundenen potentiellen Funktionen der ADAM's, zu denen Katalyse, Adhäsion, Signalübertragung und Zellfusion gehören (siehe Abbildung 2) (Bjarnason 1995).

Abbildung 2: schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM33



Die Abkürzung ADAM (**A** Disintegrin **A**nd **M**etalloproteinase) spiegelt die Schlüsseldomänen der Proteinfamilie wieder und somit ihre Hauptaufgaben. Die Metalloproteinase-Domäne erfüllt proteolytische Aufgaben, wogegen die Disintegrin-Domäne Adhäsionseigenschaften vermittelt. Die Bezeichnung Disintegrin rührt von den verwandten Schlangengiften (SVMP, Snake Venom Metalloprotease) her. Die löslichen Schlangengifte binden über die Disintegrin-Domäne an das Integrin von Blutplättchen und inhibieren so die Blutplättchenaggregation, was zur Verhinderung der Bindung der Plättchen an Fibrin führt (Gould 1990). ADAM's sind im Organismus ubiquitär verteilt (z.B. im Herz, Leber, Niere, Dick- und Dünndarm, Spermien, Ovar, Gehirn, Thymus, Lunge, Knochen etc.) und sind in verschiedene physiologische Prozesse wie Myoblastenfusion, der Bindung von Spermium und Eizelle und deren Fusion, sowie dem „shedding“ von extrazellulären Protein-Domänen u.v.m. involviert (Wolfsberg 1995), (Wolfsberg 1996).

ADAM 33 gehört zu einer Untergruppe der ADAM-Familie zu der auch ADAM 12, 13 und 19 gehören, die alle proteolytische Aktivität und Adhäsionsfunktion besitzen (Primakoff 2000). Die proteolytische Eigenschaft der Metalloproteinase-Domäne von ADAM 33 wurde in Versuchen mit *Drosophila* nachgewiesen (Garlisi, Zou et al. 2003; Zou, Zhu et al. 2004). Die von den Zellen sezernierten proteolytischen Enzyme bauen Bestandteile der extrazellulären Matrix ab. Dies ist zum Beispiel erforderlich, wenn Zellen die Basalmembran durchdringen müssen. Von essentieller Bedeutung für die Entwicklung und Homöostase eines Organismus sind auch die Wechselwirkungen zwischen Zellen und auch von Zellen mit der Matrix. Zellen müssen während der

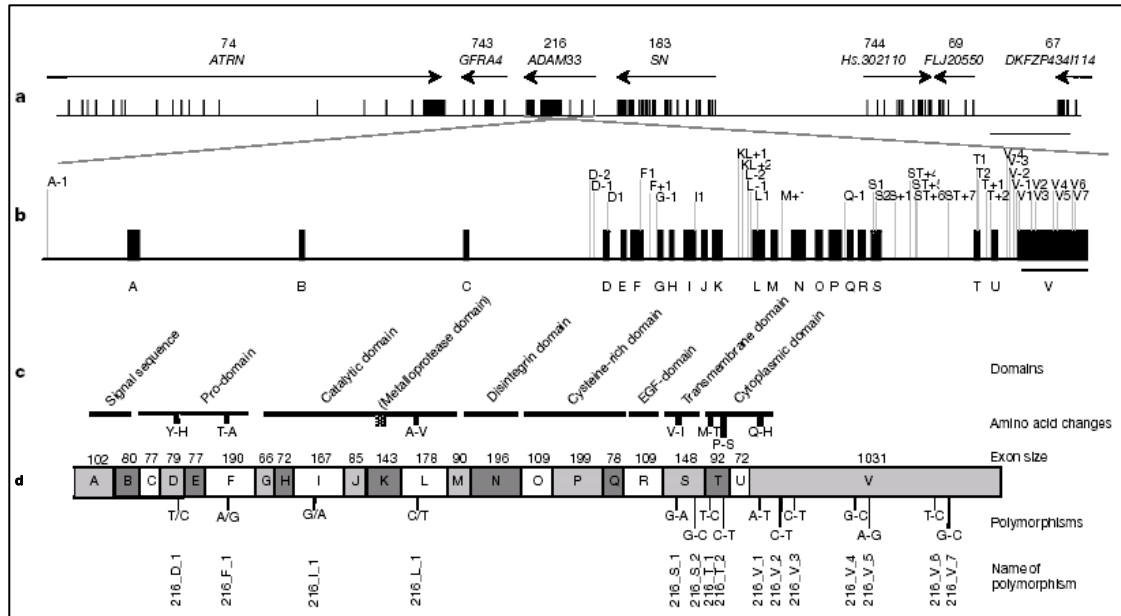
Embryogenese und Morphogenese wandern, adhären, miteinander interagieren und auch fusionieren (Wolfsberg 1995).

Exprimiert wird ADAM 33 vor allen Dingen in der glatten Muskulatur des Bronchialsystems und in Lungenfibroblasten, nicht aber in Epithelzellen, T-Zellen oder Leukozyten (Powell 2004). Die selektive Expression von ADAM33 in mesenchymalen Zellen wie Lungenfibroblasten und glatter Muskulatur des Bronchialsystems und eine beobachtete stärkere Kopplung und Assoziation mit Asthma in Kombination mit bronchialer Hyperreaktivität, deuten darauf hin, dass Abweichungen in der Proteinfunktion eng im Zusammenhang mit veränderter Funktion der Luftwege, im Sinne eines „airway remodeling“ sind. Auch der Nachweis von ADAM33 in glatten Muskelzellen des embryonalen Bronchialsystems deutet darauf hin, dass ADAM 33 bei der Entwicklung von bronchialen, vaskulären und neuronalen Strukturen, deren Funktion, sowie der Differenzierung von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen in diesen Strukturen beteiligt ist. Es spielt also möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung der bronchialen Hyperreaktivität (Van Eerdewegh, Little et al. 2002) durch Proliferation der Fibroblasten und glatten Bronchialmuskulatur, Verdickung der Bronchialwände und somit Obstruktion der Atemwege, vielleicht ausgelöst durch eine veränderte Proteinaktivität.

Im ADAM33-Gen wurden bislang zahlreiche (>55) Polymorphismen identifiziert und im Zusammenhang mit Asthma bronchiale untersucht. Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich vor allen Dingen in der 3'-Region des Gens, in der die transmembranen und cytoplasmatischen Domänen des Proteins kodiert werden, die Polymorphismen häufen.

Die durch van Eerdewegh analysierte Region im Bereich des ADAM33-Gens betrug insgesamt 3518 bp. Strukturell teilt sich das Gen, das sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 (20p13) befindet, in folgende Abschnitte auf (siehe Abbildung 3):

Abbildung 3: Genomkarte ADAM33 (aus van Eerdewegh (Van Eerdewegh, Little et al. 2002)) mit a) angrenzenden Genen, b) Exon/Intron Struktur u. Polymorphismen, c) Domänen-Struktur d. ADAM33 Proteins und d) Lokalisation der SNPs (Exongröße in bp)



Welcher der vielen Polymorphismen primär für die beobachteten Assoziationen von ADAM33 mit Asthma und BHR ursächlich verantwortlich ist, bleibt nach wie vor unklar. Auch ist nicht offensichtlich, ob eine Zunahme oder ein Verlust des entsprechenden Proteins der Entwicklung von Asthma oder BHR zugrunde liegt.

In zahlreichen Fall-Kontroll-Assoziations-Studien, Transmission disequilibrium Tests und Haplotyp-Analysen wurden unterschiedliche Gen-Polymorphismen von ADAM 33, die mit Asthma und bronchialer Hyperreaktivität assoziiert sind, identifiziert (Van Eerdewegh, Little et al. 2002; Lee, Park et al. 2004). Manche Gruppen konnten die entdeckten Assoziationen zwischen SNP's in ADAM 33 und Asthma und/ oder BHR nur bedingt bestätigen (Werner 2004). Allerdings wurde in manchen Studien auch eine fehlende Assoziation von ADAM 33 mit Asthma und BHR gezeigt (Lind, Choudhry et al. 2003; Raby, Silverman et al. 2004). Raby et al postulieren vielmehr, dass sich der asthmarelevante Locus nicht direkt im ADAM 33-Gen befindet, sondern eher in der dem Gen benachbarten genomischen Region (Raby, Silverman et al. 2004). In einer weiteren Studie konnte eine signifikante Assoziation zwischen einem

SNP in der Nähe der 3'-Region und einer massiven jährlichen Abnahme der Lungenfunktion dargestellt werden (Jongepier 2004).

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 10 bereits bekannte und in verschiedenen Studien unterschiedlich signifikant bewertete SNP's von ADAM 33 in einer Fall-Kontroll-Gruppe der ISAAC II-Studie und einer Geburtskohorten-Gruppe der German Multicenter Allergy Study (MAS) mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie genotypisiert. In einer anschließenden Assoziationsstudie und Haplotyp-Analyse wurden die Polymorphismen auf ihre Assoziation mit Asthma bronchiale und Lungenfunktion im Kindesalter untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Die Populationen

2.1.1 Beschreibung der Fall-Kontroll-Gruppe

Zwischen 1995 und 1996 wurde in der westdeutschen Stadt München und den ostdeutschen Städten Leipzig und Dresden eine Querschnittsstudie zur Erforschung von Asthma und Allergie im Kindesalter durchgeführt. Die Untersuchung wurde in allen 3 Städten auf der Grundlage von randomisierten Stichproben aus vierten Klassen der Schulen der Gemeinden vorgenommen. Die grosse Mehrzahl der Kinder in diesen 4. Schulklassen waren im Alter zwischen 9 und 11 Jahren (>95%), sie werden im Folgenden als 9-11-jährige bezeichnet. Die Kinder aus München und Dresden wurden entsprechend dem Protokoll der „International Study of Asthma and Allergies in Childhood“ (ISAAC), Phase II; mittels Elternfragebögen, Hautuntersuchungen, Skin-Prick-Test (SPT), Blutabnahmen, Spirometrie und bronchialem Reiztest untersucht (Weiland, von Mutius et al. 1999). Die 9-11-jährigen Viertklässler aus Leipzig wurden einem ähnlichen Protokoll entsprechend zwischen September 1995 und Mai 1996 untersucht (von Mutius, Weiland et al. 1998). Dieses Protokoll wurde entwickelt, um einen zeitlichen Verlauf hinsichtlich atopischer Erkrankungen zu erfassen und unterscheidet sich deshalb teilweise von den ISAAC-Vorgaben. Auf die Unterschiede wird, falls vorhanden, im Folgenden hingewiesen. Es lagen von insgesamt 1872 Kindern aus München, Dresden und Leipzig sowohl die Blutproben, als auch die Daten der Fragebögen vor. Von allen Erwachsenen und Eltern der an der Studie teilnehmenden Kinder wurde eine schriftliche Einverständniserklärung für die durchgeführten Untersuchungen eingeholt. Die Studie und alle Methoden wurden durch Ethikkomitees der betreffenden Studienzentren überprüft und genehmigt.

Für die hier dargestellte Studie wurden alle Kinder mit positiver Arzt diagnose Asthma und/ oder bronchiale Hyperreagibilität (N = 671, München n = 264, Dresden n = 276, Leipzig n = 131) von der Gesamtpopulation selektioniert. Diesen wurden im Verhältnis 1:2 einer zufällig gewählten Gruppe von gesunden, nicht asthmatischen, nicht

atopischen Kindern ohne Diagnose für bronchiale Hyperreagibilität gegenübergestellt (N = 1342, München n = 528, Dresden n = 552, Leipzig n = 262). Aus dieser gemischten Population wurden schließlich nur Kinder deutscher Herkunft, deren DNA zur Verfügung stand und bei denen Gesamt-IgE im Serum erfolgreich bestimmt worden war, in die Analyse miteingeschlossen (N = 1872, München n = 690, Dresden n = 789, Leipzig n = 393).

2.1.2 Fragebogen (ISAAC)

Alle Fragebögen wurden über die Schulen der betreffenden Gemeinden an die Eltern geschickt und von diesen dann ausgefüllt. Die Fragebögen der Münchner und Dresdner Viertklässler enthielten die ISAAC-Kernfragen nach Symptomen von Asthma, allergischer Rhinitis und atopischem Ekzem (Asher, Keil et al. 1995) (ISAAC Steering Committee (Writing Committee: Beasley R 1998). Den Eltern wurden Fragen gestellt: „Diagnostizierte ein Arzt jemals eine der folgenden Krankheiten bei ihrem Kind: a) Asthma; b) asthmatische, spastische oder obstruktive Bronchitis; c) Bronchitis?“. Kinder wurden dann als Asthmapatienten eingestuft, wenn die Eltern eine ärztliche Asthma-Diagnose angaben, oder wenn laut elterlicher Auskunft der Arzt mehr als einmal „asthmatische, spastische oder obstruktive Bronchitis“ diagnostiziert hatte. Diese Kinder wurden in die Kategorie „akutes Asthma“ aufgenommen, wenn die Eltern zusätzlich ein „Pfeifen“ (wheeze) ihres Kindes in den letzten 12 Monaten angaben. Die Kinder wurden mit „Bronchitis“ klassifiziert, wenn sie von einem Arzt mehr als einmal mit Bronchitis diagnostiziert wurden, die Kriterien für Asthma jedoch nicht erfüllten. Desweiteren wurde nach nächtlichem oder morgendlichem Husten ohne Erkältung, Diagnosen wie Heuschnupfen oder atopischer Dermatitis gefragt. Auch die derzeitigen und früheren Lebensumstände und familiäre Begleitfaktoren der Kinder wurden in detaillierten Fragen abgerufen.

Die Fragebögen für die Leipziger Eltern zeigten nur wenig Unterschiede zu denen der ISAAC-Studie (Weiland, von Mutius et al. 1999).

2.1.3 Hautuntersuchung

Die Haut der teilnehmenden Kinder wurde im Bereich um die Augen, am Hals, an den Beuge- und Streckseiten der Ellenbogen- bzw. Knie-Gelenke, und um die Sprunggelenke auf sichtbare Zeichen einer Dermatitis kontrolliert. Die Untersucher folgten dabei einem strikten vorgegebenen Protokoll mit Fotografien und detaillierten Anwendungshinweisen (Williams HC 1994). Die Untersuchungen der 5 genannten Regionen wurden ausführlich dokumentiert. In der Münchner und Dresdner Population war die ärztliche Diagnose eines atopischen Ekzems oder einer Neurodermitis ausschlaggebend, in der Leipziger Population jedoch wurde lediglich im Fragebogen nach „Hautbeschwerden irgendwann einmal“ gefragt.

2.1.4 Haut-Prick-Test

Alle teilnehmenden Kinder wurden auf die sechs häufigsten Luft-Allergene im Haut-Prick-Test getestet (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Alternaria tenius*, Katzen- oder Hundeschuppen, Gras-, Birken- oder Haselnusspollen oder gemischte Baumpollen) entsprechend dem standardisierten ISAAC Phase II Protokoll. Für die Münchner und Dresdner Gruppe wurden standardisierte Allergen-Extrakte und Kontroll-Lösungen von ALK (Horsholm, Dänemark), für die Leipziger Kinder Standards von Stallerkit, Stallergenes aus Frankreich verwendet. Als Positivkontrolle diente Histamin (10 mg/ml), als Negativkontrolle eine isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%). Die Testung wurde auf der Volarseite des linken Unterarms vorgenommen, die Haut dabei unter der Testlösung mit einer Lanzette eingeritzt, das Ergebnis nach 15 Minuten abgelesen. Für die Auswertung des Prick-Testes war die Größe der jeweils entstandenen Quaddel an der Auftragsstelle verglichen mit der Negativkontrolle ausschlaggebend. Dabei entsprach ein positives Testergebnis einem Quaddeldurchmesser von mehr als 3 mm.

2.1.5 IgE-Messung

Die Messungen des Gesamt-IgE im Serum wurden mit dem Imulite System (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) durchgeführt. Anhand aller IgE-Messungen in der Gesamtpopulation der Analyse (N = 3063) wurden populationsbasierte Perzentilen für IgE-Werte kalkuliert. Die 90. Perzentile (457 IU/ml) wurde als Outcomevariable benutzt.

2.1.6 Lungenfunktionsprüfung und Provokation des Bronchialsystems

Bei den Münchner und Dresdner Kindern wurde die Lungenfunktion mit dem MasterScope Version 4.1 der Firma Jäger (Würzburg, Deutschland) gemessen. Es wurden mindestens 2 Standard-Spirogramme aufgezeichnet. Die höchsten von zwei reproduzierbaren maximalen expiratorischen Atemvolumina in einer Sekunde (FEV1) wurden als Ausgangs-FEV1 gewertet. Bronchiale Hyperreaktivität wurde anhand eines Abfalls des FEV1 nach Inhalation von hyperosmolarer Kochsalzlösung (4,5 %) gemessen. Die Kinder inhalierten die hyperosmolare Kochsalzlösung in Perioden zunehmender Dauer: für 0,5, 1, 2, 4 und 8 Minuten. Eine bestehende Asthmamedikation sollte mindestens 12 Stunden vor der Untersuchung abgesetzt werden. Ein Kind wurde als bronchial hyperreagibel gewertet, wenn a) entweder des FEV1 unter 15 % des vorher ermittelten Ausgangs-FEV1 abfiel, oder b) die Provokation mit hyperosmolarem Kochsalz abgebrochen werden musste, weil das Kind beständig nach Wiederholung der Inhalationen auf einen FEV1-Wert von 85-90 % des Ausgangs-FEV1 abfiel (Weiland, von Mutius et al. 1999).

Bei den Leipziger Kindern wurde die Lungenfunktion mit einem Pneumoskop der Firma Jäger (Würzburg, Deutschland) als forcierte Fluß-Volumen-Kurven gemessen, bis mindestens 3 reproduzierbare Diagramme erzielt waren. Die Messung erfolgte vor und nach einer 4-minütigen Provokation mit minus 15 Grad Celsius kalter und trockener Luft („Kaltluftprovokation“) (von Mutius, Weiland et al. 1998) (Kabesch, Schaal et al. 1999). Bronchiale Hyperreaktivität wurde dann gewertet, wenn das gemessene FEV1 unter die 95%-Perzentile der gemessenen Gesamtpopulation sank (Nicolai, Mutius et al. 1993).

2.1.7 Beschreibung der MAS-Geburtskohorten-Gruppe

In der German Multicenter Allergy Study (MAS) wurden im Jahr 1990 Neugeborene und deren Familien aus 6 Krankenhäusern in 5 deutschen Städten (Berlin, Düsseldorf, Freiburg, Mainz und München) für die Studie rekrutiert. Von insgesamt 7609 Neugeborenen wurden 1314 Kinder von Geburt an bis zum Alter von 10 Jahren nachuntersucht (499 Atopie-Risiko-Kinder mit IgE-Spiegel $\geq 0,9$ kU/l im Nabelschnurblut und/ oder ≥ 2 atopische Familienmitglieder, und 815 zufällig gewählte Kinder ohne Atopie-Risiko) (Kulig, Klettke et al. 2000; Liu, Beaty et al. 2003). Von allen Eltern der an der Studie teilnehmenden Kinder wurde eine schriftliche Einverständniserklärung für jede einzelne durchgeführte Untersuchung eingeholt. Die Studie und alle Methoden wurden durch ein Ethikkomitee überprüft und genehmigt. Bei 888 MAS-Kindern (davon Asthmatiker n=96, nicht-asthmatisch n=792) wurde die DNA aus den Blutproben extrahiert. Alle Kohorten-Mitglieder wurden im Alter von 1, 3, 6, 12, 18 und 24 Monaten und anschließend jährlich nachuntersucht. Es wurden standardisierte Interviews, Fragebögen und körperliche Untersuchungen ähnlich der ISAAC-Studie durchgeführt. In den Interviews wurden die Eltern nach Atopie-Symptomen und atopischen Erkrankungen ihrer Kinder und über Atopien in der Familie befragt. Als atopisch wurden Eltern betrachtet, die entweder Asthma, atopisches Ekzem oder eine Nahrungsmittelallergie (einschließlich allergischer Rhinitis) hatten.

Für die Analyse in der vorliegenden Arbeit wurden alle deutschen Kinder, deren DNA noch zur Verfügung stand (n=824) eingeschlossen.

2.1.8 Fragebogen

Die Fragebögen und Interviews der Multicenter Allergy Studie wurden in Anlehnung an die ISAAC-Studie ausgearbeitet. Sie wurden zunächst an die werdenden Mütter verteilt. Anhand eines kurzen Fragekataloges zu elterlicher Anamnese von Asthma, allergischer Rhinitis und/ oder atopischer Dermatitis wurden Familien selektioniert, die bei positiver elterlicher Anamnese intensiver evaluiert wurden. Während der anfangs 3-monatlichen und halbjährlichen Vorstellungen und Nachuntersuchungen im ersten Studienjahr wurde nach Ernährungsgewohnheiten und Infektionen des Säuglings und auch nach dem

Rauchverhalten der Eltern gefragt. Die Befragung der Eltern erfolgte getrennt nach Mutter und Vater.

Als atopisch wurden Eltern angesehen, wenn sie entweder Asthma, atopisches Ekzem oder eine Nahrungsmittelallergie mit/ oder ohne allergischer Rhinitis angaben.

2.1.9 Nabelschnur-IgE

Die IgE-Bestimmung beim Neugeborenen erfolgte aus Nabelschnurblut. Um festzustellen, dass keine Kontamination mit mütterlichem Blut vorlag, wurde eine gleichzeitige Messung des IgA durchgeführt, da IgA die Plazenta nicht passieren kann und somit in Nabelschnurblut nicht nachweisbar ist. Die Messungen wurden mit dem CAP-RAST-FEIA System (Pharmacia, Deutschland) durchgeführt.

2.1.10 Gesamt-IgE-Messung und spezifische IgE-Antikörper

Im Alter von 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Jahren wurde bei den an der Studie teilnehmenden Kindern sowohl das Gesamt-IgE als auch spezifische IgE-Antikörper gegen die häufigsten Nahrungsmittel- und Inhalationsallergene (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, Hühnereiweiß, Kuhmilch, Soja, Weizen, gemischte Gräser, Birkenpollen und Katzenschuppen) mit CAP-RAST-FEIA (Pharmacia) bestimmt.

2.1.11 Urin-Untersuchungen

Urin-Untersuchungen auf Cotinin-Spiegel wurden im Alter von 1, 2, 3 und 4 Jahren durchgeführt. Cotinin kann als Nachweis für passive Rauchexposition der Kinder herangezogen werden. Die unterste Messgrenze liegt bei 1 ng/ml. (Luck and Nau 1985)

2.1.12 Staub-Proben

Nach einer schriftlichen Anweisung wurden von den Eltern in der häuslichen Umgebung Staubproben gesammelt. Dafür wurden mit dem Staubsauger Areale von 1 m² im Schlafzimmer, Kinder- und Wohnzimmer 3 Minuten lang gesaugt (Dreborg, Einarsson et al. 1995). Diese Proben wurden bei der Nachuntersuchung der Kinder im Alter von 6 und 18 Monaten auf Milben- und Katzenschuppen-Allergenkonzentration hin untersucht. Für die Allergen-Extraktion und Analyse wurde ein Sandwich ELISA von ALK (Kopenhagen, Dänemark) verwendet (Lau, Falkenhorst et al. 1989).

2.1.13 Lungenfunktionsprüfung und Provokation

Im Alter von 7 Jahren wurde bei 645 Kindern (71,5 % der in diesem Alter noch teilnehmenden Kinder, 48 % der Gesamtpopulation) eine Lungenfunktion durchgeführt. Ebenso wurde ein bronchialer Provokationstest mit Histamin bei diesen Kindern veranlasst. (Niggemann, Illi et al. 2001)

2.2 Material

2.2.1 Enzyme

2.2.1.1 Polymerasen

HotStarTaq TM Polymerase (5units/ μ l)	Quiagen, Hilden
Taq-DNA-Polymerase (5U/ μ l)	Quiagen, Hilden
Thermosequenase	Amersham Bioscience, Freiburg, D

2.2.1.2 sonstige Enzyme

Proteinase K	Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, D
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Amersham Bioscience, Freiburg, D

2.2.2 Primer

2.2.2.1 PCR-Primer

Bezogen von Metabion (Planegg/ Martinsried, D), siehe Tabelle 2.5

2.2.2.2 PEP-Primer

N15-Primer von Metabion (Planegg/ Martinsried,D)

2.2.2.3 MALDI-TOF-Primer

Sense-/ Antisense-/ Extensions-Primer von Metabion (Planegg/ Martinsried, D), siehe Tabellen 2.5 und 2.6

2.2.3 Lösungen, Puffer und Reagenzien

2.2.3.1 Lösungen, Puffer, Reagenzien für die DNA-Extraktion

- Ery-Lyse-Puffer: 41.45 g 155 mM NH₄Cl (=isotonisch), Merck, Darmstadt,D
 5 g 10 mM KHCO₃, Merck, Darmstadt, D
 0,5 M EDTA ph=8, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 ad H₂O mit pH=7,4
- Proteinase-K-Puffer: 5 ml Tris 1-molar, pH 7.5, Sigma-Aldrich,
 Steinheim, D
 1 ml 0.5-molares EDTA, ph=8, Sigma-Aldrich,
 Steinheim, D
 ad 500 ml H₂O
- TE-Puffer: 5 ml 1-molares Tris,Sigma-Aldrich, Steinheim, D
 1 ml 0.5-molares EDTA, pH=8, Sigma-Aldrich,
 Steinheim, D
 ad 500 ml H₂O
- SDS 20 % Na-dodecylsulfat, Serva, Heidelberg, D
- EtOH 100 % Ethanol absolut zur Analyse, Merck, Darmstadt,D

2.2.3.2 Lösungen, Puffer, Reagenzien für PCR

-PCR-Puffer, ph (Puffer Y):	200 mM Tris-HCl (pH8.55) 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgCl ₂ ; PeqLab, Erlangen, D
-10x Puffer S:	100 mM Tris-HCl (pH 8.8) 500 mM KCl 0,1 % Tween 15 mM MgCl ₂ ; PeqLab Erlangen, D
-dNTP-Stammlösung 10 mM:	100 µl dATP, 100 µl dCTP, 100 µl dGTP, 100 µl dTTP 600 µl H ₂ O; PeqLab, Erlangen, D
-Betain 5 M	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
-MgCl ₂ 25mM	Promega GmbH, Mannheim, D
-H ₂ O Water Molecular Biology Grade;	Eppendorf AG, Hamburg, D

2.2.3.3 Lösungen, Puffer, Reagenzien für die PEP-Reaktion

-PCR-Puffer, ph (Puffer Y):	200 mM Tris-HCl (pH8.55) 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgCl ₂ ; PeqLab, Erlangen, D
-MgCl ₂ 25mM	Promega GmbH, Mannheim, D
-dNTP-Set, je 2 mM	PeqLab, Erlangen, D
-H ₂ O Water Molecular Biology Grade;	Eppendorf AG, Hamburg, D

2.2.3.4 Lösungen, Puffer, Reagenzien für die MALDI-TOF

-10x PCR Buffer	containing 15 mM MgCl ₂ ; Quiagen, Hilden, D
-4x dNTP's	MBI Fermentas, St. Leonrod, D
-MgCl ₂ 25mM	Promega GmbH, Mannheim, D
-MassExtend Nucleotide Mix Pack	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
-hME MassExtend Nucleotide Mix-Pack	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
-hME-Puffer	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
-3-Punkt-Kalibrant	SEQUENOM, San Diego, CA, USA
- Spectroclean resin	SEQUENOM, San Diego, USA

2.2.3.5 Lösungen, Puffer, Reagenzien für die DNA-Gelelektrophorese

-100bp DNA-Ladder	500 µg/ml, New England Biolabs, Frankfurt a. M., D
-SeaKem LE Agarose	Cambrex Bioscience Rockland, ME, USA
-Ethidiumbromid-Lösung	10 mg EtBr in H ₂ O, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
-Loading dye	30 % Glycerin, Bromphenolblau, Xylenecyanol-FF
-Loading Dye(1:10):	10 µl loading dye, 90 µl Glycerin 30 %
-TBE-Puffer; pH 8.3 (Tris-Borat-EDTA-Puffer):	(10 x Ansatz)
	510 g Tris, Sigma-Aldrich, Steinheim
	275 g Borsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	37.2 g EDTA (pH 8), Sigma-Aldrich, Steinheim
	auf 5000 ml H ₂ O

2.2.4 Reaktionskits

2.2.4.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

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

2.2.5 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 Clusterplates	Quiagen, Hilden, D
-Matrix-Chips	Quiagen, Hilden, D

2.2.6 Geräte und Hilfsmittel

Neben der Standard-Laborausrüstung wurden folgende Geräte verwendet:

-Gel-Dokumentationssystem: KODAK Electrophoresis Documentatiob and Analysis System;Kodak, Stuttgart/ Wangen, D

- Gel-Elektrophoreseapparatur:
 - BIO RAD Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
 - BIO RAD Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- MASSARRAY System (Sequenom, San Diego, USA)
- Massenspektrometer: BIFLEX II-TOF (Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen, D)
- Mikrowelle; Bosch, Stuttgart, D
- PCR-System: Mastercycler; Eppendorf AG, Hamburg, D
 - Tetrad PCR Thermal Cycler MJ Research, Waltham, USA
- Pipettierroboter: Pipettierroboter Multimek 96 (Beckman/Sagain, Unterschleißheim, D)
- Sequenom Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems (Sequenom, San Diego, USA)
- Photometer: eppendorf BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Pipetten: eppendorf Research 10 µl, 20 ml, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (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, D (Köttermann GmbH, Uelze, D)
- Zentrifuge: eppendorf Centrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, D)

2.2.7 Computerprogramme

2.2.7.1 Pipettierroboter

- Gemini 3.5 (Tecan, Crailsheim, D)
- Bioworks (Bekmann Coulter, Fullerton, USA)

2.2.7.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

- Spectro TYPER_RT 2.0.0.3 (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)
- Spectro-Designer, Spectro-Importer, Spectro-Typer

2.2.7.3 Primer und PCR-Bedingungen

- Netprimer (Premierbiosoft International Palo Alto, Californien, USA)
- SpectroDESIGNER (SEQUENOM, San Diego, Californien, USA)

2.2.7.4 Analyse genomischer DNA-Sequenzen

-BioEditSequence Alignment Editor

(Hall 1999, <http://www.mbio.ncsu/BioEdit/biodeit.html>)

2.2.7.5 Datenbanken aus dem Internet

-National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)

-CHIP Bioinformatics Tools (<http://snpper.chip.org/bio/>)

-MAT-Inspector (<http://www.genomatix.de/>)

-FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>)

2.2.7.6 Statistische Programme

-SAS 9.1.3

-SAS/ Genetics

2.3 Experimentelle Methoden

2.3.1. DNA-Extraktion

Die DNA der an der Analyse teilnehmenden Probanden wurde aus den Leukozyten aus EDTA-Vollblut nach folgendem Protokoll von Miller, Dykes und Polesky gewonnen (Miller, Dykes et al. 1988):

-10 ml EDTA-Blut in 50 ml Falcon-Tube überführen und 20 ml Ery-Lyse-Puffer (7.3.1) zugeben

-10 Minuten belassen und gelegentlich schütteln, bis die Erythrozyten lysiert sind

(Umschlagen der Farbe der Blutmischung in klar bis lackfarben)

-Zentrifugieren für 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute

-Überstand abpipettieren, Zellen durch Erschütterung („Reiben am Ständer“) resuspendieren

-nochmals mit 20 ml Erylyse-Puffer auffüllen, schütteln, 7 Minuten lysieren lassen

-Zentrifugieren für 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute

- Überstand abgießen und Leukozyten resuspendieren (s.o.)
 - 5 ml Proteinase-K-Puffer (7.3.1), 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) (7.1.2) und 250 µl 20% SDS (7.3.1) zugeben
 - über Nacht im Wasserbad bei 37 °C inkubieren
 - Proben mit 1500 µl 5molarem NaCl mischen und mindestens 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (4000 rpm) zentrifugieren
 - Überstand in neue 50 ml Falcon-Tubes überführen und mit 20ml unvergälltem 100 %-igem Ethanol (7.3.1) versetzen, danach sofort schwenken und fällen
 - in beschriftete Röhrchen mit Schraubverschluß 500 µl 70 %iges Ethanol vorlegen
 - DNA im Überstand abpipettieren und in Alkohol reinigen
 - Ethanol abpipettieren und das DNA-Palsett lufttrocknen lassen
 - DNA in ca. 150 µl TE-Puffer (ph 8) (7.3.1) lösen und bei + 4 °C aufbewahren.
- Die genomische DNA der beiden Populationen wurde in der vorliegenden Arbeit für alle Genotypisierungen zur Polymorphismus-Detektion im ADAM33-Gen benutzt.

2.3.2 Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben

Der DNA-Gehalt der verwendeten Proben wurde mit einem Eppendorf BioPhotometer gemessen, die Test-DNA wurde durch Verdünnung auf einen Wert von 20 µg dsDNA/ml eingestellt. Die Zielgröße des 260 /280 nm-Wertes lag zwischen 1,7 und 2,0.

2.3.3 Primer-Extension-Preamplification (PEP)

Die Methode der Primer-Extension-Preamplification wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um eine Vermehrung der vorhandenen DNA durchzuführen. Bei der PEP-Reaktion handelt es sich im Prinzip um eine PCR (Polymerase-Kettenreaktion). Mit einem Primer (N15-Primer) (2.2.2.2) wird die Genomsequenz per Zufallsprinzip amplifiziert. N15-Primer stellen eine Mischung unterschiedlicher Primer mit jeweils einer Länge von 15 Basen dar, deren Basenabfolge zufällig festgelegt wurde. Auf Grund der unspezifischen Sequenzen dieser Primer kommt es bei der PEP-Reaktion zur zufälligen Anlagerung am gesamten komplementären DNA-Strang der eingesetzten Probe. Die Amplifikation findet dann zwischen den benachbarten, an den DNA-Strang

angelagerten Primern statt. Die Regionen zwischen den Primern variieren in ihrer Länge und können zum Teil überlappen. Da die Primer sich zufällig über den ganzen DNA-Strang verteilen, ist es mit dieser Methode möglich, fast das gesamte Genom zu amplifizieren. Es werden somit fast 80 % aller Genomregionen der vorhandenen DNA mit einem Minimum von 30 Kopien reproduziert. Durch diese Methode kann die Menge an Gesamt-DNA auf das 40- bis 80-fache gesteigert werden. Im Rahmen genetischer Forschung ist dies wichtig, um möglichst viele Genotypisierungen von einer individuellen DNA-Probe zu erhalten. Zumal auf Grund des Populationsumfangs eine weitere Probenentnahme zu einem späteren Zeitpunkt schwer durchführbar erschien.

Ein Standard-PEP-Ansatz wurde immer nach dem in Tabelle 1 aufgeführten Schema für einen 50 µl-Ansatz pipettiert und unter den in Tabelle 2 allgemein beschriebenen Temperatur-Bedingungen in einem Thermocycler (2.2.6) durchgeführt.

Zur Qualitätskontrolle der PEP-Reaktion wurden einige Proben auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel (2.2.3.5) aufgetragen und zusätzlich eine Kontroll-PCR durchgeführt.

Tabelle 1: Standard-PEP-Ansatz

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
DNA-Template	1,0 µl	(5 ng/µl)
dNTP-Mix	5 µl	(je 2 mM)
PCR-Puffer	5 µl	10 x
MgCl₂	5 µl	25 mM
N15-Primer	10 µl	(200 µM)
Taq-DNA-Polymerase	1 µl	(5 U/µl)
H₂O	ad 50 µl	

Tabelle 2: Allgemeine Temperatur-Bedingungen für die Standard-PEP-Reaktion

Temperatur	Zeit
1. 94 °C	3 min
2. 94°C	1 min
3. 37 °C	2 min
4. 37 °C	1 sec + 0,2 °C/sec R = 2,0 °C/sec
5. go to 4.	Repeat 90
6. 55 °C	4 min
7. go to 2.	Repeat 49
8. 72 °C	5 min
9. Hold 4 °C	

2.3.4 Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

Zur Identifizierung und Kontrolle der DNA-Qualität von PCR-Produkten wurde eine elektrophoretische Auftrennung in entsprechenden Agarose-Gelen (2.2.3.5) durchgeführt. Außerdem konnte mit dieser Methode eine Mengenabschätzung kleiner DNA-Mengen vorgenommen werden. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren unter neutralen pH-Bedingungen negative Ladungen besitzen und somit in einem elektrischen Feld wandern, wobei ihre Geschwindigkeit proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe aufzutrennender DNA-Moleküle. In der Regel wurden PCR-Produkte und Fragmente unter 1,0 kb in einem 3,0%-igen Gel aufgetrennt.

Die Gele zur Trennung von DNA wurden zubereitet, indem die Agarose in TBE-Puffer (2.2.3.5) aufgekocht und vor dem Erhärten bei ca. 60 °C in horizontale Schlitten gegossen wurde. Ein Kamm stellte Vertiefungen her, in die nach dem Erkalten die zu trennende DNA-Lösung gegeben wurde. Die Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (2.2.3.5) zur aufgekochten Agarose-Lösung ermöglichte eine Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht (302 nm). Proben der aufzutrennenden DNA-Lösung wurden mit Ladepuffer (2.2.3.5) versetzt und dem

elektrischen Feld ausgesetzt. Durch Vergleich mit einem Längenstandard definierter Fragmentlängen (100 bp Ladder, New England Biolabs) konnte die Länge der DNA-Moleküle abgeschätzt werden. Zur Dokumentation wurden mit einer Kamera (2.2.6) Aufnahmen der Gele gemacht.

2.3.5 Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS

2.3.5.1 Theoretische Grundlagen

Die matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (MALDI-TOF, **matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight**) wurde als schnelle und empfindliche Absolutmethode zur Bestimmung von Molmassen von Molekülen entwickelt. Sie wird inzwischen aber auch zur Bestimmung und Charakterisierung von Biomolekülen wie Proteine, Peptide, Oligosaccharide und auch Oligonukleotide, mit Molekülmassen zwischen 400 und 350.000 Da eingesetzt.

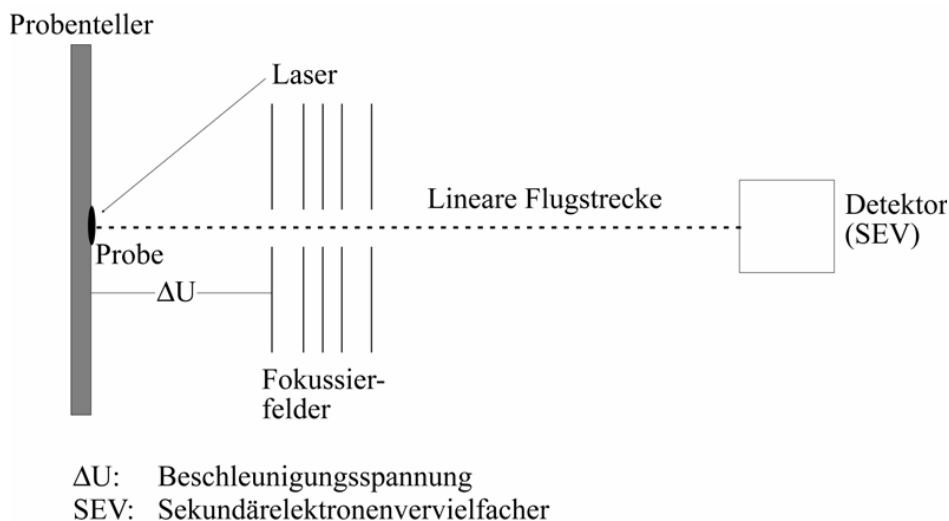
In der vorliegenden Arbeit wurde das MALDI-TOF-Verfahren zur Bestimmung von kleinen DNA-Fragmenten eingesetzt. Dabei können mit Hilfe des MALDI-TOF-Massenspektrometers DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 3 – 30 Basen mit einer Genauigkeit von 0,1 % bis 0,01 % bestimmt werden, wodurch sich ein Massenbereich erschließt, in dem eine SNP-Analyse (SNP = **single nucleotide polymorphism**) durchgeführt werden kann. (Griffin and Smith 2000; Leushner 2001; Storm, Darnhofer-Patel et al. 2003; Gohlke 2004).

Diese Methode hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von effektiven Hochdurchsatzanalysen („high-throughput-methods“) geführt, mit deren Hilfe der Austausch von Einzelbasen (SNP's) im Genom schnell und präzise detektiert werden kann. Hierbei werden in einer komplizierten Verkettung aus Hybridisierung einer SNP-spezifischen Sonde an die DNA und enzymatischer Spaltung, SNP's detektiert. Die abgespaltenen Signalmoleküle werden dann im elektrischen Feld beschleunigt, wobei die Zeit bis zum Aufschlagen auf den Detektor das Molekulargewicht des Signalmoleküls widerspiegelt. Somit ist es möglich mit Hilfe der Massenunterschiede von Polymorphismen Genotypisierungen durchzuführen.

Zur Vorbereitung der Proben wurden zunächst in einer Polymerase-Ketten-Reaktion die Regionen um die Einzelbasenpolymorphismen amplifiziert. In einem zweiten Schritt wurden die PCR-Produkte unter Zusatz einer Shrimp-alkaline-phosphatase (2.2.1.2) von überschüssigen Nukleotiden gereinigt, um dann in einem letzten Schritt, der Extension (hME = homogeneous MassExtend), vervielfältigt zu werden. Um überschüssige Kationen aus der Lösung herauszuziehen, wurden die einzelnen Platten mit Spectroclean (Kationen-Ausstauscher) (2.2.3.4) versetzt. Danach können die Proben für die Analyse im Massenspektrometer (MALDI-TOF MS) auf Matrix-Chips gespottet werden. Mit Hilfe der matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisation werden die Proben in einen gasförmigen Zustand überführt und in das time-of-flight Massenspektrometer transferiert, wo sie von den Matrix-Ionen getrennt und erkannt werden. Dies geschieht unter Vakuum-Bedingungen. Alle Ionen werden physikalisch voneinander entsprechend ihres Masse/ Ladung -Verhältnisses separiert. Ein spezieller Detektor registriert die Ankunftszeit und Intensität der Signale. Matrix-Ionen und leichte Peptide erreichen den Detektor zuerst, gefolgt von schwereren Proteinen in aufsteigender Reihenfolge entsprechend des Masse/ Ladung-Verhältnisses.

Mit der MassArray RT-Software (Sequenom) wurden die Genotypisierungen in real time gecallt. (Weidinger and al. 2004)

Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (nach Griffin and Smith, 2000) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Gohlke, GSF, München)



2.3.5.2 Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF

Die zuvor durch die PEP-Methode (2.3.3) amplifizierte einzelnen Proben der Studienpopulation (DNA-Gehalt 20 ng/μl) wurden nach einem anschließenden Verdünnungsschritt (1:4) mit einer Konzentration von 5 ng/μl auf 96-er Clusterplates (Mutterplatte) überführt. Zur Qualitätssicherung enthielt jede dieser Platten vier Leerproben als Negativkontrolle.

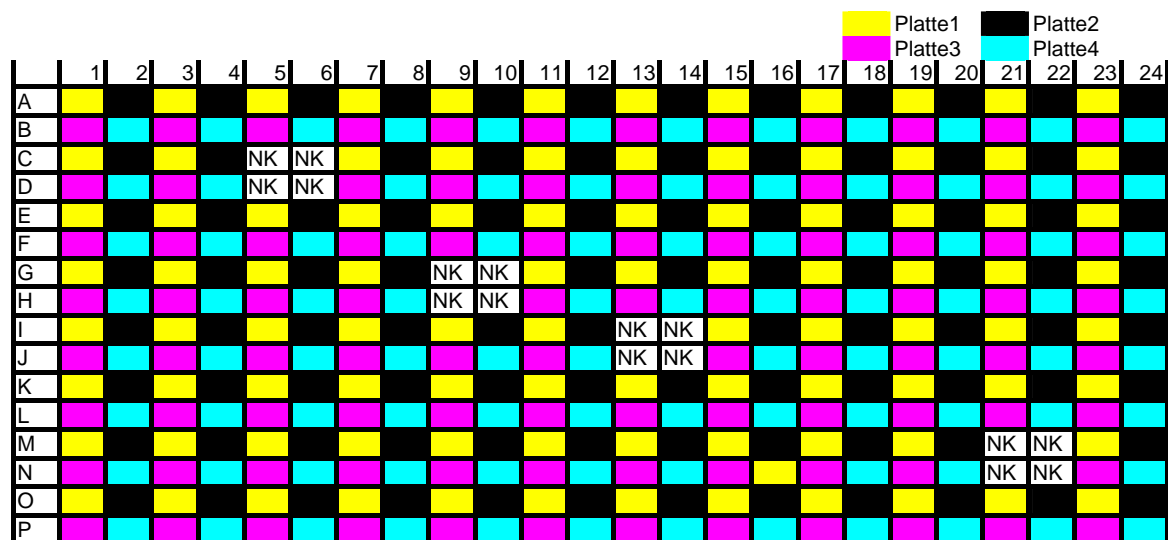
Abbildung 5: Kontrollschema für Mutterplatte, NK=Negativkontrolle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			NK									
C												
D					NK							
E							NK					
F												
G											NK	
H												

4 dieser Mutterplatten wurden zu einer 384 „well“ PCR-Platte (Tochterplatte) nach einem vorgegebenen Schema zusammengefasst. Dabei wurden je 1 μl DNA (5ng/μl) von der Mutterplatte auf die Tochterplatte mit Hilfe eines Pipettierroboters (2.2.6) überführt und über Nacht bei Raumluft getrocknet. Die Gesamtkonzentration der einzelnen Proben betrug nach der Trocknung 5 ng.

Die so hergestellten Tochterplatten wurden in den weiteren Arbeitsschritten im Rahmen der Genotypisierung mittels MALDI-TOF verwendet.

Abbildung 6: Verteilungsmuster von 4 Mutterplatten (96er Platten) auf eine Tochterplatte (384er Platte); NK=Negativkontrolle



2.3.5.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) im Rahmen der hME-Methode für die MALDI-TOF

Bevor ein SNP mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden kann, muss der den Basenaustausch flankierende Bereich mit Hilfe einer PCR vervielfältigt werden, wobei die Primer so gewählt werden, dass PCR-Amplifikate entstehen, die ca. 100 bp groß sind, damit eine möglichst hohe PCR-Effizienz erreicht wird (Griffin and Smith 2000). Anschließend werden die so generierten PCR-Produkte für die Primer-Extensionsproduktion als Template eingesetzt.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, durch die spezifische Nukleinsäure-Sequenzen definierter Länge aus einem heterogenen Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen selektiv vermehrt werden. Vorbedingung ist die Kenntnis der Sequenzen an beiden Enden, an den sich dann zwei kurze Starter-Oligonukleotide („Primer“) an Strang und Gegenstrang anlagern. Die anschließende Amplifikation wird möglich gemacht durch die Verwendung einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase, die durch Temperaturerhöhung nicht denaturiert wird. Die Trennung der DNA in ihre Einzelstränge erfolgt über Erhitzung. Anschließend hybridisieren die Oligonukleotide an die jeweilige DNA-Sequenz und schließlich werden die komplementären Stränge synthetisiert. Durch Wiederholung (hier 44 Zyklen) dieser Vorgänge (Denaturierung

und Synthetisierung) nimmt die Menge an DNA exponentiell zu. Ein Reaktionsansatz zur zyklischen Amplifikation der DNA-Fragmente besteht aus zwei spezifischen Oligonukleotidprimern, hitzestabiler *Taq*-Polymerase, den vier Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, cGTP und cTTP, dem DNA-Template und geeigneten Pufferbedingungen.

Ein Standard-PCR-Ansatz wurde immer nach dem in Tabelle 3 aufgeführten Schema pipettiert, unter den in Tabelle 4 allgemein beschriebenen Temperatur-Bedingungen.

Tabelle 3: Komponenten eines PCR-Ansatzes

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
DNA-Template (in MTP)	luftgetrocknet	(5 ng/ μ l)
dNTP-Mix	0,6 μ l	(je 2 mM)
PCR-Puffer (15mM MgCl₂)	0,6 μ l	(10 x)
MgCl₂	0,24 μ l	(25 mM)
Hinprimer	0,1 μ l	(10 mM)
Rückprimer	0,1 μ l	(10 mM)
<i>Taq</i>-DNA-Polymerase	0,02 -0,05 μ l	(5 U/ μ l)
H₂O	4,34 μ l	

Tabelle 4: Allgemeine Temperatur-Bedingungen einer PCR

Temperatur	Zeit
95 °C	15 min
95 °C	30 sec
56 °C	30 sec (45 Zyklen)
72 °C	1 min
72 °C	10 min
20 °C	hold

Sowohl aus Kosten- als auch aus Zeitersparnis wurde für die PCR eine parallele Vorgehensweise gewählt. Die DNA der Probanden wurde genotypisiert, in dem man

gleichzeitig mehrere Ansätze parallel in einem Reaktionsgefäß analysierte (Multiplex). Entsprechend der Anzahl zu untersuchender SNP's wurden bis zu 5 Primer zur gleichen Zeit in einem Ansatz (Pentaplex) eingesetzt. Die mit Hilfe der SpektroDesigner Software berechneten PCR-Bedingungen waren so spezifiziert, dass sämtliche durchgeführten Amplifikationsreaktionen nicht mehr optimiert werden mussten und nach einem vereinheitlichten Pipettierprotokoll bzw. Temperaturprogramm ablaufen konnten.

In 480-fachem Ansatz wurde ein sogenannter Mastermix nach dem Ansatz für die PCR (Tab 3) hergestellt. Mit dem Pipettierroboter Tecan Robotik wurden von dieser Lösung dann 6 µl auf die 384er Platte übertragen.

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer und ihre genauen Sequenzen.

Tabelle 5: verwendete sense- und anti-sense-Primer für die jeweiligen Polymorphismen

SNP	sense-Primer	anti-sense-Primer
F+1	ACGTTGGTGAAAATACTGGGACTCGAGGC	ACGTTGGATGTGCTGTATCTATAGCCCTCC
M+1	ACGTTGGATGGGGACCAATTAAGGC	ACGTTGGATGTGAGGGCATGGAAGGTTTCAG
S1	ACGTTGGATGAGTCGGTAGCAACACCAGGC	ACGTTGGATGAATCCCCGAGACCATGACAC
S2	ACGTTGGATGAGTCGGTAGCAACACCAGG	ACGTTGGATGACCATGACACCTTCTGCTG
ST+4	ACGTTGGATGGGAGTGAAAAGATGTGCTGG	ACGTTGGATGCCACTTCTCTGCACAAATC
ST+5	ACGTTGGATGAGAGAACTGGGTTAAGGCAG	ACGTTGGATGCCAGCACATCTTTTCACTCC
ST+7	ACGTTGGATGCTGCCCTTGATGATTCCAAG	ACGTTGGATGGGAACATCACAGGAAATGAC
T1	ACGTTGGATGTTCCCTTCTCCCTTCCCTCTC	ACGTTGGATGTTGCTCAGCCCCAAAGATGG
T2	ACGTTGGATGTTCCCTTCTCCCTTCCCTCTC	ACGTTGGATGTTGCTCAGCCCCAAAGATGG
V4	ACGTTGGATGAGAAACAGGAAGGAAGGTCC	ACGTTGGATGTATGGTTCTGACTGAGTCCAC

2.3.5.4 Reinigen des PCR-Produktes (SAP-Reaktion)

Überschüssige Desoxynukleotide der erfolgten PCR-Reaktion werden durch Zusatz des Enzyms SAP (shrimp alkaline phosphatase) (2.2.1.2) zum PCR-Produkt inaktiviert und abgebaut (Weidinger and al. 2004). Dies ist notwendig, da durch die freien Nukleotide andere als die vorher bestimmten Primer-Extensionsprodukte entstehen würden, was problematisch für eine korrekte SNP-Detektion wäre.

2.3.5.5 Primer-Extensions-Reaktion

In der Extensionsphase werden die spezifischen Sequenzen des Polymorphismus vervielfältigt. Die Primer werden deshalb so ausgewählt, dass das Ende des Primers direkt vor dem zu detektierenden SNP liegt.

Nach der Denaturierung lagert sich der spezifische Extensions-Primer an die vorhandenen Einzelstränge an. In einem 10 µl-Ansatz wird unter Zusatz von Thermostenase (2.2.1.1) zur Reaktion die Vermehrung der Sequenzen eingeleitet (Weidinger and al. 2004). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten hME-Extensionsprimer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: verwendete Extensions-Primer

SNP	Extensions-Primer
F+1	ACTCGAGGCCTGTGAATTCC
M+1	GCCGGCTCCCAAGCTCC
S1	CCTGCTGGCCATGCTCCTCAGC
S2	GCTGCCTCTGCTCCCAGG
ST+4	ACAAATCACCTCTGTCACCC
ST+5	ACTCCATACCACTGGTCAGCTG
ST+7	ACTGTCCCCATCCCATC
T1	GGGCGGCGTTCACCCCA
T2	CCCCACAGCCACTGGACAG
V4	CTGAGTCCCACTCCCCTG

2.3.5.6 Aufreinigung der Extensionsprodukte

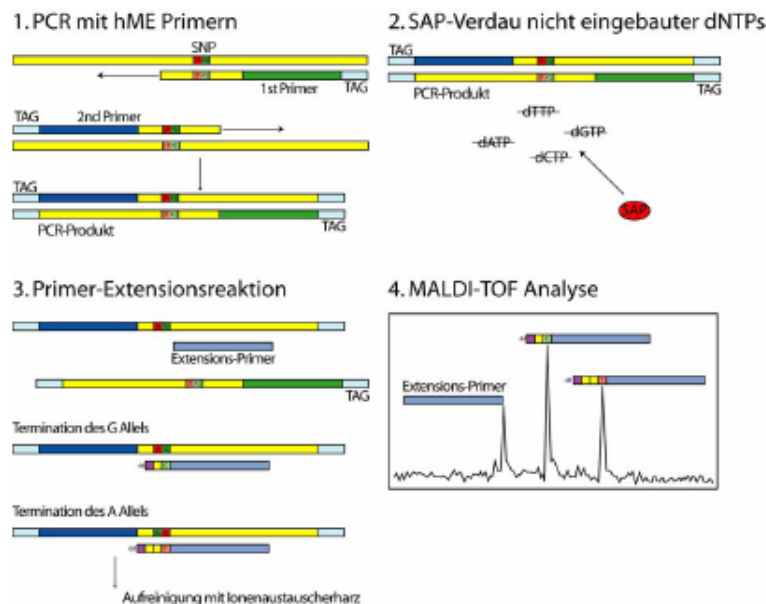
Um den Reaktionspuffer von überschüssigen Salzen zu reinigen werden die entstandenen Extensionsprodukte anschließend mit SpectroCLEAN resin (2.2.3.4), einem Kationen-Austauschharz versetzt. Einzelne Pufferbestandteile oder z.B. Magnesium könnten die anschließende Detektion negativ beeinflussen. Nach einem Standardprotokoll werden Spectroclean und zusätzlich 16 µl einer Resin/ Wasser-Suspension mit Hilfe des Multimek-Pipettierroboters (2.2.6) zupipettiert.

2.3.5.7 MALDI-TOF im Rahmen der hME-Methode

Nach rascher Zentrifugierung (2000 rpm für 3 Minuten) werden 10 nl des Analytengemisches auf einen 384er Spectro-CHIP (Siliziumchip), der mit einer Matrix (3-HPA) überzogen ist, mit dem SpectroPoint Nanodispenser (2.2.6) aufgespottet. Nach Beladung des Chips wird dieser auf einen metallischen Probenträger übertragen und in die Vakuumschleuse des MassARRAYTM Massenspektrometers (2.2.6) eingeführt. Die Vermessung der Proben und Analyse sowie Kalibrierung des Systems erfolgten automatisch nach Standardeinstellungen.

In der folgenden Abbildung (7) ist der Ablauf der hME-Methode zusammengefasst in schematischer Form dargestellt (Gohlke 2004):

Abbildung 7: Schematischer Ablauf der hME-Methode (aus (Gohlke 2004)):



2.4 Statistische Auswertung

2.4.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Als Grundgesetz der Populationsgenetik, beschreibt das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht oder –Gesetz die Verteilung von Erbmerkmalen in einer „idealen“ Population. Diese ideale Population besteht aus diploiden Individuen, die sich zufällig und geschlechtlich paaren und vermehren und deren Generationen sich nicht überlappen. Mutationen kommen nicht vor oder können ignoriert werden, es tritt kein Gendrift, keine Populationsabspaltung und keine Genmigration ein. Die Allelfrequenzen bei Männern und Frauen sind gleich, die Population ist sehr bzw. unendlich groß und die natürliche Selektion betrifft nicht die Allele, die unter Betrachtung sind (das Gen unter Betrachtung hat zwei Allele) (Hartl 2007)

Wenn in einer Population die beiden Allele a und A in den Frequenzen p und q vorhanden sind, dann bleibt dieses Verhältnis auch in den Folgegenerationen erhalten. Im Modell von Hardy-Weinberg gibt es eine mathematische Beziehung zwischen der Allelfrequenz und der Genotypfrequenz, die gegeben ist durch

$$AA = p^2, Aa = 2pq, aa = q^2,$$

wobei p und q die Allelfrequenzen von A und a , p^2 , $2pq$ und q^2 die Häufigkeit der jeweiligen Genotypen darstellen. Es gilt: $p + q = 1$.

Die Frequenzen der Gleichungen konstituieren das Hardy-Weinberg-Equilibrium (=HWE). Ist das HWE nicht erfüllt, so deutet dies auf eine Verletzung der Modellannahmen (s.o.) hin, grobe Abweichungen vom HWE lassen in der Praxis meist auf ein Problem bei der Genotypisierung schliessen.

Als Test auf Abweichung vom HWE wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet, bei dem die erwarteten Häufigkeiten aus den beobachteten Allelfrequenzen abgeleitet werden.

Signifikante Abweichungen vom HWE deuten auf ein technisches Problem bei der Genotypisierung hin. Daher wurde das HWE zur Überprüfung der Qualität der Genotypisierung verwendet werden.

2.4.2 Assoziationsstudien

2.4.2.1 Auswertung von kategorischen Variablen

Mit verschiedenen Chi-Quadrat-Tests sowie mittels Armitage-Trend-Test wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den Genotypen der ADAM33-SNP's mit bestimmten Phänotypen besteht. Dabei wurde dem dominanten (dominant auf dem seltenen Allel) Modell von Sasieni (Sasieni 1997) gefolgt, bei welchem der heterozygote mit dem homozygot polymorphen Genotyp zusammengefasst wird, was dann zu einem Vierfelder-Chi-Quadrat-Test führt. Es soll eine potenzielle Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp entdeckt werden.

Als Effektmaß der Tests wird die Odds Ratio (= OR) angegeben, die das Chancenverhältnis zwischen zwei Gruppen darstellt, eine Krankheit zu bekommen. Bei einer OR für Asthma von 2 für die Gruppen mit Mutation bedeutet dies: das Risiko an Asthma zu erkranken ist in der Gruppe mit Mutation doppelt so hoch wie in der Gruppe ohne Mutation.

Odds Ratios werden stets mit einem Konfidenzintervall von 95 % angegeben.

2.4.2.2 Auswertung von quantitativen Variablen

Mit der univariaten Varianzanalyse wurden signifikante Unterschiede von Lungenfunktionsparametern getestet. Hierfür wird von einer Nullhypothese ausgegangen, die besagt, dass es keine Mittelwertunterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen, in unserem Fall Genotypen, gibt. Getestet werden die Mittelwertunterschiede in einem rezessiven Modell unter Verwendung des t-Tests. Im rezessiven Modell werden der Wildtyp und der heterozygote Genotyp gemeinsam betrachtet und mit dem homozygot polymorphen Genotyp verglichen.

2.4.3 Haplotyp-Analysen

Ein Haplotyp ist eine Kombination von eng miteinander gekoppelten genetischen Markern (SNP's) auf einem Chromosom, die höchstwahrscheinlich zusammen vererbt werden. Mit Haplotyp-Analysen kann ein noch größerer Teil der genetischen Varianz in einem Kandidatengen erfasst werden. Ebenso werden Interaktionen zwischen verschiedenen SNP's aufgedeckt. Bei der Untersuchung der Haplotypen wurden verschiedene Methoden angewandt. Zum einen wurde nach Schätzung der Haplotyp-Frequenzen durch den EM-Algorithmus (= expectation-maximisation) die Haplotyp-Analyse für alle sogenannten „tagging SNP's“ durchgeführt. Dies sind SNP's, zwischen denen ein hoher Zusammenhang besteht, die man dann in Blöcke zusammenfasst und dann lediglich jeweils einen SNP pro Block für die Genotypisierung auswählt. Als Maß für den allelischen Zusammenhang wird hierbei das Linkage Disequilibrium (=LD, Kopplungsungleichgewicht) verwendet. Ein hohes Kopplungsungleichgewicht (LD) zwischen zwei Polymorphismen bedeutet einen hohen Zusammenhang zwischen diesen SNP's. Deshalb wird das LD häufig auch als „allelic association“ bezeichnet. Diese Analysen des Kopplungsungleichgewichtes wurden mit dem Programm Haploview (Barret 2005) durchgeführt. Als zweites wurde die Methode der Haplotyp Trend Regression angewandt, welche von Zaykin, Westfall et al. entwickelt wurde (Excoffier 1995), (Zaykin, Westfall et al. 2002). Es wird die Assoziation von Haplotyp-Frequenzen

anstatt von individuellen Haplotypen mit verschiedenen diskreten und kontinuierlichen Phänotypen untersucht. Die Methode fokussiert sich auf das Testen der Nullhypothese, dass es keine Haplotyp-Assoziationen gibt.

2.4.5 Korrektur für multiples Testen

Werden in einer statistischen Analyse mehr als ein Parameter und mehrere Hypothesen getestet, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein möglicher, aber nicht vorhandener Unterschied aufgedeckt wird (Fehler 1. Art). Ebenso gering ist jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass ein tatsächlich vorhandener Unterschied aufgedeckt wird (Power des Testes, Fehler 2. Art (Bland 1995)). Um diese Effekte zu vermeiden, wurde eine Korrektur für multiples Testen nach der Bonferroni-Methode angewandt. Sie besagt, dass man das multiple Signifikanzniveau von α einhält, wenn man die einzelnen Tests jeweils zum Niveau α/κ durchführt. Hierbei handelt es sich um κ Tests (möglicherweise abhängige Tests, z.B. Signifikanztests bezüglich mehrerer Zielvariablen der gleichen Stichprobe). Alternativ kann man auch die einzelnen p-Werte mit κ multiplizieren, um für multiples Testen adjustierte p-Werte zu erhalten (Bender 2002).

Die gesamte statistische Analyse wurde mit dem SAS Statistik Programm (Version 9.1.3) und dem SAS/ Genetics Modul durchgeführt.

Die beiden Studienpopulationen sind bereits in früheren Studien rekrutiert, befragt und untersucht worden. Die DNA aller Probanden lag in extrahierter Form vor und wurde für die Analysen der vorliegenden Studie verwendet. Selbst durchgeführt wurden sämtliche Genotypisierungen und die dafür notwendigen Vorbereitungen. Alle dargestellten Methoden und Laborprotokolle wurden gemeinsam durch Doktoranden und Mitarbeiter der AG Asthmagene im Dr. von Haunerschen Kinderspital München erarbeitet und sind öffentlich im Internet unter www.asthmagene.de verfügbar (Lenz 2006).

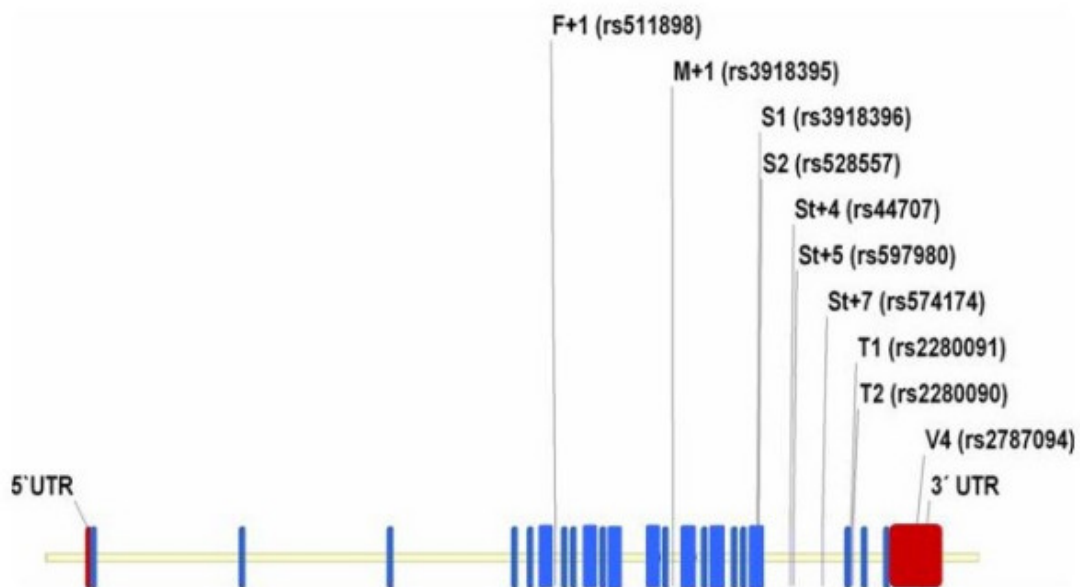
3 ERGEBNISSE

3.1 Assoziationsstudie

3.1.1 Analyse von SNP's im ADAM33-Gen

Das ADAM33-Gen liegt im Bereich zwischen 9.08 und 13.36 cM und erstreckt sich über einen 2.5 Mb-großen Bereich. Es besteht aus 22 Exons und wird in Richtung der 5'-Region transkribiert. Von den bereits bekannten und zahlreich untersuchten Polymorphismen im ADAM33-Gen, wurden 10 Polymorphismen, die wiederholt in unterschiedlichen Studien mit Asthma assoziiert waren, für die Genotypisierung in der vorliegenden Arbeit ausgewählt und untersucht. Diese 10 Polymorphismen befinden sich hauptsächlich in der 3'-Region des ADAM33-Gens (siehe Abb. 3.1).

Abbildung 8: Position der untersuchten SNP's im ADAM33-Gen



22 Exons (blau), untranslated region (rot). Nomenklatur der SNP's in Anlehnung an die Erstbeschreibung durch Van Eerdewegh et al., in Klammern (rs-Nummer)

Alle Polymorphismen sind in der aktuellen Version der SNP-Datenbank bereits beschrieben (<http://snpper.chip.org/biol/>). Dabei wird jedem bekannten SNP eine Identifikationsnummer (rs-Nummer) zugewiesen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Bezeichnung und Lokalisation der SNP's im ADAM33-Gen

SNP	rs-Nummer	Allele	Position im Gen	Minor Allel Frequenz (MAF) Fall-Kontroll	Minor Allel Frequenz (MAF) Geburtskohorte	call Rate (%)
F+1	rs511898	G/A	Intron	0.38	0.36	93.73
M+1	rs3918395	G/T	Intron	0.15	0.13	92.03
S1	rs3918396	G/A	ORF	0.09	0.09	92.99
S2	rs528557	G/C	ORF	0.28	0.28	91.88
ST+4	rs44707	A/C	Intron	0.41	0.41	92.58
ST+5	rs597980	C/T	Intron	0.44	0.45	93.81
ST+7	rs574174	G/A	Intron	0.19	0.19	93.66
T1	rs2280091	T/C	ORF	0.16	0.14	93.77
T2	rs2280090	C/T	ORF	0.16	0.14	93.95
V4	rs2787094	C/G	3'UTR	0.22	0.23	93.84

Die Rate an erfolgreichen Genotypisierungen in der Gesamtpopulation lag zwischen 91.9% und 94 % (= „call Rate“, siehe Tabelle 3.1). In der Fall-Kontroll-Gruppe lag die call Rate zwischen 90.9 % und 93.7 % und in der Geburtskohorten-Gruppe zwischen 92.1% und 94.3 %.

In einer Assoziationsstudie wurde nun die Auswirkung der untersuchten Polymorphismen auf die Entstehung von Asthma und asthmaassoziierten Erkrankungen (hier bronchiale Hyperreaktivität) und Auswirkungen auf verschiedene Lungenfunktionsparameter untersucht. Dabei wird das Auftreten der SNP's innerhalb der Studienpopulationen (2.1.1 und 2.1.7) untersucht.

In beiden Populationen befanden sich alle SNP's im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Dies dient im Rahmen der statistischen Analyse zur Qualitätskontrolle. Der Hardy-Weinberg-Test überprüft den korrekten Ablauf des Genotypisierungsprozesses und vergleicht die tatsächlich beobachteten Frequenzen mit den erwarteten Werten aus dem entsprechenden mathematischen Gesetz (Hardy-Weinberg-Gesetz: $p^2+2pg+q^2 = 1$). Die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen (homozygot oder heterozygot) bleiben von Generation zu Generation im Normalfall konstant. Ist dies nicht der Fall, so lässt dies in erster Linie auf Genotypisierungsprobleme schließen.

In weiterführenden statistischen Analysen wurden die Polymorphismen bezüglich der oben erwähnten Phänotypen jeweils einem χ^2 -Test unterzogen. Die Untersuchungen liefen im Rahmen eines dominanten Modells, bei dem der Wildtyp gegen heterozygote Merkmalsträger und Probanden mit zwei polymorphen Allelen gemeinsam getestet wurde.

Ebenso waren die Allelfrequenzen (siehe Tabelle 3.1) in den Studienpopulationen aus Ost- und Westdeutschland vergleichbar mit den kaukasischen Populationen aus bereits veröffentlichten Studien (Van Eerdewegh, Little et al. 2002).

3.1.2 Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma

In beiden Studienpopulationen wurden die Assoziationen zwischen den ADAM33-Polymorphismen und dem Phänotyp Asthma untersucht. Bei beiden Studienpopulationen war die Erhebung der Daten in Bezug auf Asthma im gleichen Alter (Fall-Kontroll-Gruppe: Alter der Kinder 9 – 11 Jahre; Geburtskohorten-Gruppe: Alter der Kinder 10 Jahre) und mit dem gleichen Fragebogen entsprechend dem Protokoll der „International Study of Asthma and Allergies in Childhood“ (ISAAC), Phase II erfolgt. Die Assoziationsanalyse mit Asthma fand also bei gleichaltrigen Kindern statt.

Weder in der Fall-Kontroll-Gruppe, noch in der Geburtskohorten-Gruppe noch in einer aus beiden Gruppen gemischten Stichprobe („pooled sample“, Querschnittstudie) konnte eine signifikante Assoziation zwischen den getesteten SNP's und „positiver Arzt diagnose Asthma“ gefunden werden. Dennoch war das Risiko nicht-atopisches Asthma (definiert als „positive Arzt diagnose Asthma“ ohne positiven Haut-Prick-Test) zu entwickeln bei Trägern des polymorphen A-Allels im SNP S1 (OR = 1.53, 95%CI 1.01 – 2.31, p = 0,042) und bei Trägern des polymorphen G-Allels im SNP V4 (OR = 1.44, 95%CI 1.03 – 2.01, p = 0,016) deutlich erhöht. Gleichzeitig zeigte sich ein deutlich erniedrigtes Risiko für die Entwicklung von nicht-atopischem Asthma bei Trägern des polymorphen T-Allels im SNP M+1 (OR = 0.60, 95%CI 0.40 – 0.91, p = 0.016). Die Resultate mit Angabe der Risiko-Ratio-Werte („odds ratio“ = OR), dem dazugehörigen Konfidenzintervall und dem p-Wert sind in den Tabellen 8 bis 10 dargestellt.

Tabelle 8: Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma (Arztdiagnose) in der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)

<i>Asthma Fall-Kontroll-Gruppe</i>	OR	95%CI	p-Wert
F+1	0.92	0.72 – 1.17	0.052
M+1	0.86	0.65 – 1.13	0.269
S1	1.23	0.90 – 1.69	0.201
S2	0.99	0.78 – 1.26	0.949
ST+4	1.04	0.81 – 1.34	0.766
ST+5	0.94	0.73 – 1.22	0.649
ST+7	1.11	0.86 – 1.42	0.428
T1	0.96	0.74 – 1.25	0.762
T2	0.95	0.73 – 1.24	0.711
V4	1.22	0.95 – 1.55	0.115

Tabelle 9: Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma (Arztdiagnose) in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe (n=824)

<i>Asthma Geburtskohorten-Gruppe</i>	OR	95%CI	p-Wert
F+1	0.94	0.58 – 1.52	0.795
M+1	0.94	0.53 – 1.65	0.819
S1	1.16	0.64 – 2.10	0.635
S2	0.97	0.60 – 1.56	0.893
ST+4	1.31	0.79 – 2.18	0.292
ST+5	0.80	0.48 – 1.33	0.384
ST+7	1.16	0.71 – 1.89	0.549
T1	0.92	0.53 – 1.60	0.764
T2	0.88	0.50 – 1.55	0.666
V4	0.82	0.51 – 1.34	0.439

Tabelle 10: Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma (Arztdiagnose) in der Querschnittsstudie (n=2.696)

<i>Asthma Querschnittsstudie</i>	OR	95%CI	p-Wert
F+1	0.92	0.74 – 1.15	0.478
M+1	0.89	0.70 – 1.14	0.351
S1	1.20	0.90 – 1.58	0.210
S2	0.99	0.80 – 1.22	0.908
ST+4	1.10	0.87 – 1.37	0.432
ST+5	0.89	0.71 – 1.12	0.338
ST+7	1.10	0.88 – 1.38	0.384
T1	0.97	0.76 – 1.23	0.804
T2	0.96	0.76 – 1.22	0.731
V4	1.11	0.90 – 1.38	0.329

3.1.3 Ergebnisse der Assoziationsstudie von SNP's im ADAM33-Gen mit BHR

Mit dem Hintergrund, dass van Eerdewegh in der Erstveröffentlichung zeigte, dass auch die bronchiale Hyperreaktivität (BHR) mit ADAM 33 assoziiert ist, wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls eine separate Analyse dieses Phänotyps vorgenommen.

Im Gegensatz zur Diagnose Asthma, die in beiden Studienpopulationen in annähernd gleichem Alter (siehe 3.1.2) erhoben wurde, wurde die Überprüfung der bronchialen Hyperreaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen. Während in der Fall-Kontroll-Gruppe die Lungenfunktionsprüfung und Provokation des Bronchialsystems (mit hypertoner Kochsalzlösung oder Kaltluft, siehe 2.1.6) im Alter von 10 Jahren durchgeführt wurde, standen diese Daten der Untersuchungen der Geburtskohorten-Gruppe nur im Alter von 7 Jahren zur Verfügung. Hier wurde ein bronchialer Provokationstest mit Histamin durchgeführt (siehe 2.1.13). Die Assoziationsanalyse der Polymorphismen in Bezug auf bronchiale Hyperreaktivität (BHR) wurde deshalb in beiden Studienpopulationen nur getrennt untersucht.

Auch bei der Betrachtung des Subphänotyps „bronchiale Hyperreaktivität“ waren keine signifikanten Assoziationen mit den untersuchten SNP's zu beobachten.

Die Resultate mit Angabe der Risiko-Ratio-Werte („odds ratio“ = OR), dazugehörigem Konfidenzintervall und dem p-Wert sind in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

Tabelle 11: Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit BHR in der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)

BHR <i>Fall-Kontroll-Gruppe</i>	OR	95%CI	p-Wert
F+1	1.27	0.96 – 1.69	0.095
M+1	1.18	0.88 – 1.59	0.274
S1	1.27	0.90 – 1.81	0.175
S2	1.29	0.98 – 1.69	0.073
ST+4	0.99	0.74 – 1.32	0.956
ST+5	0.95	0.71 – 1.28	0.748
ST+7	1.20	0.90 – 1.59	0.209
T1	1.20	0.90 – 1.60	0.213
T2	1.21	0.91 – 1.62	0.196
V4	1.13	0.85 – 1.49	0.402

Tabelle 12: Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit BHR in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe (n=824)

BHR <i>Geburtskohorten-Gruppe</i>	OR	95%CI	p-Wert
F+1	1.01	0.63 – 1.61	0.962
M+1	1.03	0.61 – 1.74	0.919
S1	1.19	0.67 – 2.14	0.552
S2	1.00	0.63 – 1.59	0.989
ST+4	1.08	0.67 – 1.74	0.762
ST+5	1.20	0.71 – 2.00	0.495
ST+7	1.15	0.72 – 1.84	0.562
T1	1.12	0.67 – 1.88	0.662
T2	1.14	0.68 – 1.91	0.622
V4	1.13	0.71 – 1.78	0.608

3.1.4 Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma und bronchialer Hyperreaktivität

Da in der Erstveröffentlichung über Polymorphismen bei ADAM33 in der Studie von Van Eerdewegh (Van Eerdewegh, Little et al. 2002) der größte Effekt der SNP's bei Individuen mit Asthma und gleichzeitig bestehender bronchialer Hyperreaktivität gesehen wurde, untersuchten wir diesen speziellen Phänotyp ebenfalls in der Fall-Kontroll-Gruppe. Wiederum konnte kein Polymorphismus eine statistische Signifikanz in der Assoziationsstudie zeigen.

Die Resultate mit Angabe der Risiko-Ratio-Werte („odds ratio“ = OR), dazugehörigem Konfidenzintervall und dem p-Wert sind in der Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma und BHR in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe

<i>Asthma und BHR Geburtskohorten-Gruppe</i>	OR	95%CI	p-Wert
F+1	1.61	0.90 – 2.88	0.105
M+1	1.46	0.84 – 2.54	0.177
S1	1.10	0.54 – 2.25	0.789
S2	1.72	0.99 – 3.00	0.052
ST+4	1.22	0.69 – 2.18	0.490
ST+5	0.91	0.51 – 1.60	0.731
ST+7	0.96	0.55 – 1.70	0.901
T1	1.50	0.87 – 2.59	0.141
T2	1.51	0.88 – 2.61	0.134
V4	1.31	0.76 – 2.26	0.332

3.1.5 Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP's im ADAM33-Gen mit Lungenfunktionsparametern

Als Basis-Lungenfunktionsparameter gelten allgemein FVC (=forcierte Vitalkapazität), FEV1 (=forciertes expiratorisches 1-Sekunden-Volumen), MEF25, MEF50 und MEF75 (=maximaler expiratorischer Flow bei 25, 50 oder 75 % der Vitalkapazität). Diese

Parameter wurden im Rahmen der ISAAC Phase II-Studie in der Fall-Kontroll-Gruppe erhoben und wurden nun in einer weiteren Assoziationsstudie mit ADAM33-SNP's (siehe Tabelle 14) untersucht. Bei den Kindern mit Asthma und/ oder BHR war die forcierte Vitalkapazität (FVC) bei Trägern der S2, T1 und T2-Polymorphismen erhöht, während das forcierte 1-Sekunden-Volumen bei Trägern von S2 und M+1-Polymorphismen erhöht war. Ebenso fand sich bei Individuen mit polymorphem C-Allel im S2-SNP, nicht jedoch bei S1, ein gesteigerter maximaler expiratorischer Flow (MEF75).

Bei Kindern ohne Asthma oder BHR (Kontrollen) wurden negative Effekte auf die MEF50 bei Trägern von ST+5 beobachtet, bei Trägern des M+1 oder S2-SNP's war der maximale expiratorische Flow sogar erhöht (siehe Tabelle 15).

Tabelle 14: Lungenfunktionsparameter aller Kinder mit Asthma (Arztdiagnose) und/oder BHR aus der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)

SNP		N ¹⁾	MEF ₇₅ (%) Mittelwert±SD	MEF ₅₀ (%) Mittelwert±SD	MEF ₂₅ (%) Mittelwert±SD	FEV I(%) Mittelwert±SD	FVC(%) Mittelwert±SD
F+1	Wildtyp	165	89.82 ± 29.66	89.47 ± 22.54	91.40 ± 16.28	97.65 ± 11.44	97.64 ± 11.03
	heterozygot	232	91.86 ± 32.06	91.22 ± 22.23	94.48 ± 18.53	99.32 ± 10.57	99.80 ± 10.02
	homozygot	64	92.61 ± 23.45	90.28 ± 17.19	97.32 ± 18.00	98.56 ± 10.75	98.16 ± 10.75
M+1	Wildtyp	317	90.75 ± 30.97	89.70 ± 22.29	93.19 ± 17.82	98.17 ± 11.43*r	98.12 ± 11.05
	heterozygot	128	91.28 ± 28.43	91.51 ± 22.15	95.56 ± 17.50	99.01 ± 9.86	99.86 ± 9.83
	homozygot	4	109.34 ± 23.03	98.95 ± 12.38	95.75 ± 23.07	109.31 ± 9.13	105.89 ± 9.71
S1	Wildtyp	359	90.57 ± 30.08	90.00 ± 21.74	93.23 ± 17.00*v	98.29 ± 10.86	98.46 ± 10.72
	heterozygot	86	94.29 ± 31.08	92.01 ± 24.43	97.23 ± 21.03	99.63 ± 11.23	99.58 ± 10.02
	homozygot	4	73.47 ± 16.07	76.17 ± 10.97	78.46 ± 11.72	90.84 ± 5.11	96.06 ± 1.40
S2	Wildtyp	215	91.22 ± 31.50	89.69 ± 22.15	92.14 ± 17.03*d	97.50 ± 11.49*d	96.97 ± 11.23 *v*d
	heterozygot	202	91.30 ± 29.78	91.43 ± 22.16	96.12 ± 18.27	99.76 ± 10.73	100.55 ± 9.99
	homozygot	31	95.31 ± 21.52	90.93 ± 22.04	94.54 ± 20.57	99.55 ± 9.27	98.70 ± 9.25
ST+4	Wildtyp	158	90.05 ± 29.28	89.70 ± 22.41	93.18 ± 18.52	98.08 ± 10.38	99.09 ± 10.01
	heterozygot	223	92.00 ± 29.50	91.32 ± 22.23	94.83 ± 18.14	99.06 ± 11.75	98.61 ± 11.11
	homozygot	65	92.97 ± 34.91	90.22 ± 22.04	93.93 ± 14.12	98.68 ± 10.03	98.59 ± 11.39
ST+5	Wildtyp	136	92.47 ± 31.51	91.10 ± 20.52	94.37 ± 15.25	99.26 ± 10.00	99.38 ± 10.88
	heterozygot	236	91.87 ± 29.26	91.02 ± 23.37	94.65 ± 19.04	98.79 ± 11.61	98.62 ± 10.58
	homozygot	88	87.50 ± 29.64	87.41 ± 20.55	91.39 ± 17.77	97.13 ± 10.41	98.48 ± 10.15
ST+7	Wildtyp	285	90.28 ± 29.48	90.36 ± 21.92	93.30 ± 16.83	98.67 ± 10.93	99.10 ± 10.49
	heterozygot	158	94.26 ± 31.56	91.07 ± 22.55	94.99 ± 19.60	98.98 ± 11.11	98.63 ± 10.92
	homozygot	16	82.30 ± 24.76	82.94 ± 17.26	95.38 ± 16.31	93.87 ± 9.08	95.04 ± 7.62
T1	Wildtyp	315	90.42 ± 31.04	89.55 ± 22.40	93.32 ± 17.78	98.07 ± 11.38	98.12 ± 10.83*d
	heterozygot	135	92.59 ± 28.08	92.22 ± 21.39	95.50 ± 17.87	99.42 ± 9.78	100.10 ± 9.98
	homozygot	8	98.09 ± 27.48	90.95 ± 23.47	91.61 ± 19.64	103.91 ± 11.37	103.30 ± 8.53
T2	Wildtyp	317	90.60 ± 31.04	89.61 ± 22.34	93.37 ± 17.71	98.13 ± 11.36	98.14 ± 10.80*d
	heterozygot	135	92.59 ± 28.08	92.22 ± 21.39	95.50 ± 17.87	99.42 ± 9.78	100.10 ± 9.98
	homozygot	8	98.09 ± 27.48	90.95 ± 23.47	91.61 ± 19.64	103.91 ± 11.37	103.30 ± 8.53
V4	Wildtyp	267	91.58 ± 30.15	89.98 ± 21.82	93.12 ± 17.14	98.24 ± 11.04	98.22 ± 10.82
	heterozygot	163	89.70 ± 30.05	89.71 ± 22.19	94.63 ± 18.60	98.57 ± 10.65	99.20 ± 10.23
	homozygot	26	95.52 ± 30.38	97.28 ± 24.60	96.90 ± 19.51	101.03 ± 11.93	99.82 ± 10.29

signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) von Lungenfunktionsparametern zwischen einzelnen Genotypen sind **fettgedruckt**

*v markiert signifikante Unterschiede in der Varianzanalyse

*d markiert signifikante Unterschiede in t-Test (dominantes Modell)

*r markiert signifikante Unterschiede in t-Test (rezessives Modell)

N¹⁾ bezieht sich auf den ersten Lungenfunktionsparameter. Minimale Abweichungen von N sind bei anderen Parametern möglich.

Tabelle 15: Lungenfunktionsparameter aller Kinder ohne Asthma oder BHR aus der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)

SNP		N ¹⁾	MEF ₇₅ (%) Mittelwert±SD	MEF ₅₀ (%) Mittelwert±SD	MEF ₂₅ (%) Mittelwert±SD	FEV ₁ (%) Mittelwert±SD	FVC(%) Mittelwert±SD
F+1	Wildtyp	291	98.48 ± 25.83	97.93 ± 19.80	99.22 ± 17.82	100.59 ± 9.86	98.28 ± 10.49
	heterozygot	348	101.46 ± 30.46	99.08 ± 21.41	100.69 ± 17.83	101.76 ± 10.29	99.08 ± 10.26
	homozygot	111	99.44 ± 29.96	99.63 ± 20.23	101.52 ± 19.80	101.38 ± 10.75	98.47 ± 10.38
M+1	Wildtyp	522	99.25 ± 27.06	98.22 ± 20.12	99.46 ± 17.92	101.06 ± 10.11	98.46 ± 10.51
	heterozygot	201	101.97 ± 32.25	100.01 ± 21.94	102.51 ± 18.60	102.10 ± 10.69	99.39 ± 10.29
	homozygot	12	95.45 ± 35.80	104.74 ± 19.55	104.98 ± 13.31	98.63 ± 8.56	96.65 ± 8.30
S1	Wildtyp	627	100.12 ± 29.00	99.05 ± 20.58	100.58 ± 17.89	101.18 ± 10.28	98.67 ± 10.52
	heterozygot	116	98.23 ± 27.90	97.01 ± 21.40	99.16 ± 19.84	101.78 ± 10.41	99.29 ± 10.11
	homozygot	6	95.19 ± 21.20	98.62 ± 16.03	103.61 ± 13.45	103.74 ± 10.25	100.20 ± 11.22
S2	Wildtyp	381	99.51 ± 26.91	98.44 ± 20.04	98.82 ± 17.78*d	100.94 ± 10.08	98.34 ± 10.67
	heterozygot	292	101.59 ± 31.92	99.11 ± 22.33	101.88 ± 18.68	102.09 ± 10.56	99.55 ± 10.28
	homozygot	62	97.76 ± 25.55	100.37 ± 16.24	101.35 ± 16.99	102.51 ± 9.76	98.97 ± 9.91
ST+4	Wildtyp	257	100.02 ± 28.64	98.04 ± 20.98	100.06 ± 17.63	101.58 ± 9.86	99.20 ± 9.75
	heterozygot	365	100.09 ± 28.74	99.28 ± 21.10	101.17 ± 19.05	101.39 ± 10.50	98.55 ± 10.50
	homozygot	114	98.52 ± 28.40	98.83 ± 18.79	98.41 ± 16.62	100.07 ± 10.09	98.18 ± 11.43
ST+5	Wildtyp	222	100.79 ± 31.48	101.33 ± 20.02*d	101.79 ± 17.87	101.33 ± 10.00	98.98 ± 10.29
	heterozygot	380	99.54 ± 28.10	97.52 ± 21.27	99.77 ± 18.20	100.85 ± 10.58	98.12 ± 10.82
	homozygot	148	99.48 ± 25.81	97.72 ± 19.54	99.23 ± 18.08	102.19 ± 9.46	99.74 ± 9.19
ST+7	Wildtyp	507	100.34 ± 28.71	99.01 ± 20.67	100.26 ± 17.65	101.40 ± 10.17	98.93 ± 10.29
	heterozygot	213	98.76 ± 29.25	98.00 ± 20.58	100.11 ± 19.04	100.65 ± 9.99	98.01 ± 10.35
	homozygot	32	101.56 ± 24.74	98.45 ± 20.33	99.70 ± 19.21	103.37 ± 12.14	100.57 ± 12.16
T1	Wildtyp	531	99.34 ± 27.07	98.23 ± 20.15	99.49 ± 18.08	101.07 ± 10.13	98.58 ± 10.53
	heterozygot	205	101.94 ± 32.34	99.58 ± 21.96	101.97 ± 18.39	101.81 ± 10.47	99.12 ± 10.14
	homozygot	15	95.29 ± 31.85	103.19 ± 18.07	101.58 ± 14.14	101.17 ± 9.28	98.59 ± 8.47
T2	Wildtyp	532	99.31 ± 27.05	98.23 ± 20.13	99.51 ± 18.07	101.07 ± 10.12	98.57 ± 10.52
	heterozygot	204	102.01 ± 32.41	99.58 ± 22.01	101.92 ± 18.42	101.80 ± 10.49	99.09 ± 10.16
	homozygot	15	95.29 ± 31.85	103.19 ± 18.07	101.58 ± 14.14	101.17 ± 9.28	98.59 ± 8.47
V4	Wildtyp	474	100.07 ± 28.66	98.91 ± 21.18	100.74 ± 18.35	101.32 ± 10.45	98.76 ± 10.49
	heterozygot	249	99.87 ± 29.37	98.91 ± 19.75	99.86 ± 17.75	101.62 ± 9.80	99.16 ± 10.07
	homozygot	35	99.31 ± 25.64	96.87 ± 19.30	100.16 ± 19.15	100.29 ± 11.81	96.95 ± 12.34

signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) von Lungenfunktionsparametern zwischen einzelnen Genotypen sind **fettgedruckt**

*v markiert signifikante Unterschiede in der Varianzanalyse

*d markiert signifikante Unterschiede in t-Test (dominantes Modell)

*r markiert signifikante Unterschiede in t-Test (rezessives Modell)

N¹⁾ bezieht sich auf den ersten Lungenfunktionsparameter. Minimale Abweichungen von N sind bei anderen Parametern möglich.

3.2 Haplotypanalyse

In einem weiteren Schritt der Datenauswertung wurden sogenannte Haplotypen (=Kombinationen verschiedener SNP's) zwischen einzelnen Polymorphismen gebildet. Die möglichen Kombinationen der verschiedenen Polymorphismen in Wildtyp- bzw. polymorpher Form und deren Auswirkung auf Asthma und/ oder bronchiale Hyperreaktivität wurden in beiden Studienpopulationen und der Gesamtpopulation analysiert. Die Haplotypfrequenzen für alle einfachen ADAM33-Haplotypen, die aus den 8 SNP's F+1, S1, S2, ST+4, ST+5, ST+7, T1 und V4, und aus allen 10 SNP's gebildet wurden, sind in Tabelle 16 bis 17 aufgelistet.

Tabelle 16: Haplotypen und deren Frequenzen in der Fall-Kontroll-Gruppe

	F+1	M+1 ²	S1	S2	ST4	ST+5	ST+7	T1	T2 ²	V4	Frequenzen ³
H1	G	G	G	G	A	T	G	T	C	C	31.42% (31.43%)
H2	G	G	G	G	C	C	G	T	C	C	16.66% (16.67%)
H3	A	T	G	C	A	C	G	C	T	C	14.67% (14.67%)
H4	G	G	G	G	C	C	G	T	C	G	11.02% (11.01%)
H5	A	G	A	C	A	T	A	T	C	G	7.73 % (7.73%)
H6	A	G	G	G	C	C	A	T	C	C	6.68 % (6.70%)
seltene¹											11.82% (11.80%)

- 1) seltene sind alle Haplotypen mit einer geschätzten Frequenz < 0.03 in der gemischten Stichprobe
- 2) SNP's, die später ausgeschlossen wurden
- 3) Die Haplotyp-Frequenzen der 8-SNP-Haplotypen, in Klammern Frequenz der 10-SNP-Haplotypen

Tabelle 17: Haplotypen und deren Frequenzen in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe

	F+1	M+1 ²	S1	S2	ST4	ST+5	ST+7	T1	T2 ²	V4	Frequenzen ³
H1	G	G	G	G	A	T	G	T	C	C	32.21% (32.24%)
H2	G	G	G	G	C	C	G	T	C	C	16.54% (16.62%)
H3	A	T	G	C	A	C	G	C	T	C	12.50% (12.20%)
H4	G	G	G	G	C	C	G	T	C	G	11.48% (11.48%)
H5	A	G	A	C	A	T	A	T	C	G	8.12 % (8.12%)
H6	A	G	G	G	C	C	A	T	C	C	6.06 % (6.07%)
seltene¹											13.10 % (13.27%)

- 1) seltene sind alle Haplotypen mit einer geschätzten Frequenz < 0.03 in der gemischten Stichprobe
- 2) SNP's, die später ausgeschlossen wurden
- 3) Die Haplotyp-Frequenzen der 8-SNP-Haplotypen, in Klammern Frequenz der 10-SNP-Haplotypen

Da die Polymorphismen M+1, T1 und T2 eine sehr hohe Kopplungsrate und damit eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für gemeinsames Auftreten der SNP's aufwiesen, wurden SNP M+1 und T2 von der Haplotyp-Bildung ausgeschlossen.

Der Haplotyp H4 (G-G-G-C-C-G-T-G) zeigte ein schwache, nicht signifikante Assoziation mit Asthma (Arzt Diagnose) in der Fall-Kontroll-Gruppe (OR=1.27, 95% CI (0.99 – 1.64), $p = 0.063$) aber nicht in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe. In der Untersuchung der Gesamtpopulation war dieser Haplotyp signifikant (OR=1.28, 95%CI 1.02 – 1.60, $p=0.033$).

Die Resultate mit Angabe der Risiko-Ratio-Werte („odds ratio“ = OR), dazugehörigem Konfidenzintervall und dem p-Wert sind in den Tabellen 18 bis 20 dargestellt.

Tabelle 18: Haplotypen und Assoziationen mit Asthma (Arzt Diagnose), Fall-Kontroll-Gruppe

	Haplotyp	Odds Ratio und 95% CI	p-Wert
H1	G-G-G-A-T-G-T-C	0.97 (0.81 – 1.15)	0.735
H2	G-G-G-C-C-G-T-C	0.99 (0.80 – 1.24)	0.939
H3	A-G-C-A-C-G-C-C	0.90 (0.71 – 1.15)	0.406
H4	G-G-G-C-C-G-T-G	1.27 (0.99 – 1.64)	0.063
H5	A-A-C-A-T-A-T-G	1.22 (0.90 – 1.66)	0.191
H6	A-G-G-C-C-A-T-C	0.92 (0.65 – 1.30)	0.638

Tabelle 19: Haplotypen und Assoziationen mit Asthma (Arzt Diagnose), MAS-Geburtskohorten-Gruppe

	Haplotyp	Odds Ratio und 95% CI	p-Wert
H1	G-G-G-A-T-G-T-C	0.83 (0.58 – 1.19)	0.317
H2	G-G-G-C-C-G-T-C	1.04 (0.67 – 1.63)	0.847
H3	A-G-C-A-C-G-C-C	0.84 (0.49 – 1.45)	0.531
H4	G-G-G-C-C-G-T-G	1.18 (0.70 – 2.00)	0.528
H5	A-A-C-A-T-A-T-G	0.78 /0.41 – 1.46)	0.430
H6	A-G-G-C-C-A-T-C	1.50 (0.82 – 2.72)	0.184

Tabelle 20: Haplotypen und Assoziationen mit Asthma (Arztdiagnose), Gesamtpopulation

	Haplotyp	Odds Ratio und 95% CI	p-Wert
H1	G-G-G-A-T-G-T-C	0.92 (0.78 – 1.08)	0.293
H2	G-G-G-C-C-G-T-C	1.02 (0.84 – 1.25)	0.804
H3	A-G-C-A-C-G-C-C	0.91 (0.73 – 1.13)	0.402
H4	G-G-G-C-C-G-T-G	1.28 (1.02 – 1.60)	0.033
H5	A-A-C-A-T-A-T-G	1.09 (0.83 – 1.43)	0.517
H6	A-G-G-C-C-A-T-C	1.03 (0.76 – 1.38)	0.867

4 DISKUSSION

ADAM 33 wurde als erstes Kandidatengen für Asthma bronchiale durch Positionsklonierung entdeckt und untersucht. Es spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Asthma bronchiale und bronchialer Hyperreaktivität im Kindesalter und hat Einfluss auf die Veränderung der Lungenfunktion. Ursprünglich wurden 37 Polymorphismen im ADAM 33 Gen identifiziert und 15 dieser SNP's dann in einer englischen und amerikanischen Studienpopulation durch die Gruppe von van Eerdewegh (Van Eerdewegh, Little et al. 2002) genotypisiert. Doch selbst innerhalb dieser beiden Populationen waren unterschiedliche SNP's mit der Diagnose Asthma oder mit bronchialer Hyperreaktivität (BHR) assoziiert. Signifikantere Assoziationen und stärkere Effekte konnten bei den Probanden mit dem Vorliegen der Kombination Asthma und BHR in der Erstuntersuchung durch van Eerdewegh gefunden werden. Zugrunde liegend war die Hypothese, dass ADAM 33 seine Wirkung über lungenspezifische Mechanismen ausübt und somit eine Rolle bei der Pathogenese von Asthma spielt. Unterstützt wurde diese Annahme dadurch, dass ADAM 33 in glatten Muskelzellen des bronchialen und vaskulären Systems der Lunge exprimiert wird. Auch wurde spekuliert, ob ADAM 33 möglicherweise als Zytokin-aktivierende Protease fungiert oder auch eine Proliferation der glatten Bronchialmuskulatur auslöst. Weniger Einfluss scheinen die bislang bekannten Polymorphismen von ADAM 33 auf die atopische Entzündungsreaktion beim Asthma bronchiale zu nehmen, sondern mehr auf die organspezifischen Veränderungen bei der Erkrankung.

Die Untersuchung der Assoziation von mehreren Polymorphismen von ADAM 33 mit Asthma und bronchialer Hyperreaktivität bei Kindern diene als Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Hierfür wurden 10 bereits bekannte und in unterschiedlichen Studien als signifikant bewertete Polymorphismen in 2 großen Studienpopulation (n=2696) mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie genotypisiert. Knapp 700 der eingeschlossenen Kinder hatten Asthma als Arztdiagnose und/ oder eine bronchiale Hyperreaktivität (BHR). In keiner der in der vorliegenden Arbeit analysierten Populationen konnte eine

statistisch signifikante Assoziation mit den untersuchten Polymorphismen und der Arzt diagnose Asthma gezeigt werden. Bei Probanden, die neben der Arzt diagnose Asthma auch eine bronchiale Hyperreaktivität zeigten, konnte ein gewisser Trend, jedoch kein signifikanter Effekt der Polymorphismen von ADAM 33 beobachtet werden. Auch in der Originalstudie zu ADAM 33 von van Eerdewegh wurden die meisten signifikanten Assoziationsergebnisse in der Gruppe gesehen, die sowohl Asthma als auch eine bronchiale Hyperreaktivität hatten (Van Eerdewegh, Little et al. 2002). In unserer Fall-Kontroll-Gruppe erreichten diese Assoziationen keine statistische Signifikanz.

In den durchgeführten Haplotyp-Analysen zeigte lediglich der Haplotyp H4 (G-G-G-C-C-G-T-G) einen geringen Effekt auf die Entwicklung von Asthma in der Fall-Kontroll-Gruppe, jedoch keinen Effekt auf die Entstehung von bronchialer Hyperreaktivität. In der Geburtskohorten-Gruppe ließ sich für diesen Haplotyp H4 keine Signifikanz für die untersuchten Phänotypen zeigen. Bei der Untersuchung der Gesamtpopulation war der Haplotyp H4 dann aber signifikant mit der Diagnose Asthma assoziiert.

Betrachtet man nun die Assoziationen der Polymorphismen in Bezug auf verschiedene Lungenfunktionsparameter, zeigt sich ein ganz anderes Bild. Nur hinsichtlich der Veränderung von Parametern wie FEV1, FVC, MEF 25, 50 und 75 zeigten einzelne Polymorphismen eine signifikante Assoziation bei Kindern mit Asthma in der Fall-Kontroll-Gruppe.

Nach Korrektur für multiples Testen verloren diese Assoziationen jedoch ihre Signifikanz.

Unter dem Aspekt der Replikation von Daten auf dem Niveau einer Populationsuntersuchung bleibt die Rolle von ADAM 33 Polymorphismen bei der Entstehung von Asthma weiter kontrovers. Selbst die Studien, die eine positive Assoziation zwischen ADAM 33 SNP's und atopischen Phänotypen aufzeigen, sind inhomogen in ihren Ergebnissen. Diese Inkonsistenz bei der Reproduktion der Assoziationen könnte verschiedene Gründe haben. Allerdings wurden in den verschiedenen Studien nicht immer die gleichen SNP's untersucht, so dass die Möglichkeit besteht, dass in den ethnisch unterschiedlichen Populationen jeweils andere SNP's eine für die Entstehung von Asthma ursächliche Rolle spielen. Möglicherweise sind hierfür aber auch ein oder mehrere noch unbekannte, bisher nicht identifizierte

SNP's oder Haplotypen für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich. Oder ein gänzlich anderes Gen (ob nun bekannt oder neu), welches in der Nähe zu ADAM33 liegt, bedingt die Veränderungen und die Anfälligkeit für Asthma, die sich dann in den Studien als positive Assoziation äußert.

Zum einen könnte auch die Heterogenität der einzelnen Populationen Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Replikationsstudien sein. Howard und Mitarbeiter genotypisierten 8 SNP's von ADAM33 in 4 verschiedenen ethnischen Populationen (holländisch, weiße Amerikaner, hispanisch und afroamerikanisch) und fanden eine große Variabilität in der Assoziation zwischen den einzelnen ethnischen Gruppen und den unterschiedlichen ADAM 33 Polymorphismen. Kein SNP zeigte durchgehend bei allen Populationen eine signifikante Assoziation mit Asthma oder einem spezifischen Asthma-Phänotyp. Allerdings waren in den einzelnen Gruppen unterschiedliche SNP's signifikant mit der Anfälligkeit für Asthma assoziiert. Ebenso waren in den 4 Populationen signifikante Assoziationen mit einem oder mehreren atopischen Phänotypen beobachtet worden. Auch hier waren jeweils unterschiedliche Polymorphismen relevant. In keiner der 4 Gruppen waren die einzelnen Polymorphismen nach der Korrektur für multiples Testen statistisch signifikant mit Asthma assoziiert, lediglich ein einzelner SNP behielt seine Signifikanz. (Howard 2003). Im Gegensatz dazu konnten in einer asiatischen Studie von Noguchi und Mitarbeiter nach der Genotypisierung von 23, auch in der Erstveröffentlichung von van Eerdewegh untersuchten SNP's, 3 signifikant mit Asthma assoziierte Polymorphismen gefunden werden. Es fand sich jedoch kein signifikant assoziierter Haplotyp in dieser Studie. Untersucht wurden 155 Familien mit wenigstens einem an atopischem Asthma erkranktem Kind (mit positivem RAST für *Dermatophagoides farinae*, Milben). Die untersuchte japanische Population zeigte jedoch deutlich signifikante Unterschiede in der Allelfrequenz im Vergleich mit der von van Eerdewegh untersuchten kaukasischen Population. Ebenso zeigten sich unterschiedliche Allelfrequenzen (wenn auch geringer) im Vergleich mit einer koreanischen (Lee, Park et al. 2004) Population, bei der kein untersuchter SNP signifikant mit Asthma assoziiert war, obwohl weitläufig angenommen wird, dass Japaner und Koreaner sich genetisch nicht sehr stark unterscheiden. Eine andere japanische Population zeigte aber ähnliche Allelfrequenzen.

Lind und Mitarbeiter haben zum Beispiel in Studien mit ausschließlich hispanisch abstammenden Probanden (mexikanisch, puertoricanisch) keine Assoziationen von ADAM 33 Polymorphismen mit Asthma beobachten können (Lind, Choudhry et al. 2003). Bei den untersuchten Studienpopulationen handelte es sich um Probanden, die im Rahmen der Genetics of Asthma in Latino American Study (GALA) rekrutiert wurden. In den Vereinigten Staaten haben Puertoricaner die höchste Prävalenz, Morbidität und Mortalität für Asthma, im Gegensatz dazu Mexikaner die niedrigste. Umso mehr erstaunt es, dass in keiner der beiden Gruppen signifikante Assoziationen gefunden wurden. Es zeigten sich weder in der mexikanischen noch in der Gesamtpopulation Hinweise für Assoziationen von einzelnen SNP's mit dem Schweregrad von Asthma, mit dem Ansprechen auf einen Bronchodilatator oder mit der Höhe des Gesamt-IgE. In der puertoricanischen Population fanden sich lediglich 2 SNP's mit einer moderaten, aber nicht signifikanten Assoziation. Nicht bewertet wurde in dieser Studie die bronchiale Hyperreaktivität.

Auch das unterschiedliche Vorkommen von Polymorphismen oder Unterschiede in der Haplotypstruktur zwischen den ethnischen Gruppen könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Replikationsergebnisse sein. Für eine Vielzahl von Genen konnten diese Unterschiede nachgewiesen werden. Bei ADAM 33 wurde dies bisher jedoch noch nicht genügend untersucht. In einer neueren Studie von Hersh und Mitarbeiter wurden insgesamt 98 SNP's in 5 verschiedenen Genen (ADAM33, DPP10, GPR154, HLA-G und PHF11), die alle durch Positionsklonierung entdeckt wurden, untersucht. Analysiert wurden die Assoziationen mit Asthma, bronchialer Hyperreaktivität und Gesamt-IgE in 2 unabhängigen Populationen- Eine Studienpopulation bestand aus in Costa Rica lebenden Kindern, die andere Population wurde aus dem Childhood Asthma Management Program (CAMP) rekrutiert. Eingeschlossen wurden weiße nordamerikanische Kinder nicht spanischer Abstammung. In beiden Populationen waren nur 3 Polymorphismen des Genes GPR154 mit Asthma assoziiert. Die Polymorphismen von ADAM33 zeigten weder Assoziationen mit Asthma, bronchialer Hyperreaktivität noch mit erhöhtem Gesamt-IgE. Die Ergebnisse dieser Untersuchung unterstützen lediglich die Relevanz des Genes GPR154 bei der Pathogenese von Asthma, zeigen aber auch, wie groß die Herausforderung der Replikation von genetischen Assoziationen mit einer Erkrankung wie Asthma ist. Insbesondere gilt dies für die sogenannten Kandidatengene, die durch Kopplungsanalysen oder

Positionsklonierung entdeckt wurden. Die biologische Funktion dieser Gene (wie auch die von ADAM33) bei der Pathogenese von Asthma oder anderen atopischen Erkrankungen ist weiterhin nahezu unbekannt (Hersh 2007).

Eine weitere Erklärung für die Differenz der Replikationsergebnisse könnte sein, dass Asthma in den verschiedenen Studien unterschiedlich definiert wurde. So forderte die Definition von Asthma bei der Untersuchung von van Eerdewegh (Van Eerdewegh, Little et al. 2002) die Kriterien Arzt diagnose Asthma und eine aktuell bestehende medikamentöse Asthmatherapie. Zur Überprüfung der bronchialen Hyperreaktivität wurde eine Provokation mit Metacholin durchgeführt und ein Abfall von 20 % des FEV1 als positiv bewertet. Die Referenzwerte für Gesamt-IgE wurden altersspezifisch festgelegt. Bei Lind und Mitarbeiter (Lind, Choudhry et al. 2003) wurden Probanden in die Studie eingeschlossen, die anhand eines vorgegebenen Studienprotokolls in Patienten mit mildem oder moderatem bis schwerem Asthma eingeteilt wurden. Die Klassifizierung des Schweregrades erfolgte nach Beantwortung von 4 Fragen hinsichtlich der Medikation, den Asthma-Symptomen und der Einsekundenkapazität (FEV1). Bei allen Probanden war die Diagnose Asthma durch einen Arzt gestellt worden, fast alle hatten eine aktuelle Asthmatherapie und 2 oder mehr Asthma-Symptome (wie z.B. Husten, Kurzatmigkeit oder Pfeifen) in den letzten 2 Jahren. Raby und Mitarbeiter (Raby, Silverman et al. 2004) forderten für die Diagnose Asthma eine bronchiale Hyperreaktivität auf Metacholin (Abfall von FEV1 um 20 %) und eines oder mehrere der folgenden Kriterien (alle für wenigstens 6 Monate innerhalb des Jahres vor der Rekrutierung): (1) Asthmasymptome mindestens zweimal pro Woche, (2) mindestens zweimal pro Woche Benutzung eines inhalativen Bronchodilatators, und (3) tägliche Einnahme von Asthamedikamenten. In der japanischen Studie von Noguchi (Noguchi, Ohtsuki et al. 2006) wurde Asthma in Anlehnung an die Vorgaben des National Institutes of Health, USA, (1997) durch folgende Kriterien festgelegt: (1) 2 oder mehr Episoden von Wheezing (Pfeifen) und Kurzatmigkeit während des vergangenen Jahres und (2) Reversibilität des Pfeifens und der Dyspnoe entweder spontan oder durch eine Therapie mit einem Bronchodilatator. In diese Studie wurden allerdings nur Kinder mit atopischem Asthma eingeschlossen, die einen positiven RAST-Test für *Dermatophagoides farinae* (Milben) hatten. Dennoch zeigten sich gerade in dieser japanischen Population signifikante Assoziationen von 3 SNP's mit Asthma. In einer weiteren Studie mit erwachsenen Probanden durch Foley und Mitarbeiter (Foley 2007) wurden Patienten mit mittelschwerem (moderatem) oder schwerem

Asthma eingeschlossen. Die Kriterien für moderates Asthma waren (1) durch Fluticason-Spray oder Äquivalent (200 bis 1000 µg/Tag) gut eingestellte Erkrankung mit oder ohne langwirksamen Beta-Agonisten, und (2) 2 oder weniger Steroidstöße in den vergangenen 12 Monaten und kein Steroidstoss in den letzten 3 Monaten (nicht mehr als 30 Tage orale Steroideinnahme), und (3) FEV1 größer als 70 % und größer 90% des persönlichen besten Ergebnisses der letzten 2 Jahre, und (4) nicht mehr als eine ungeplante oder notfallmäßige Vorstellung beim Arzt. Für schweres Asthma waren 1 von 2 Hauptkriterien und 2 oder mehr Nebenkriterien notwendig. Hauptkriterien waren: (1) orale Steroidtherapie mehr als 6 Monate des vergangenen Jahres oder (2) hochdosierte inhalative Steroidtherapie (> 1000µg/Tag Fluticason) und eine zusätzliche Therapie (langwirksamer Beta-2-Agonist, Leukotrien-Rezeptor-Antagonist, Theophyllin). Nebenkriterien waren: (1) täglicher Gebrauch von kurzwirksamen Beta2-Agonisten, (2) persistierende Obstruktion (FEV1 < 70% und FEV1/FVC Quotient < 80 %, (3) eine notfallmäßige Vorstellung beim Arzt in den letzten 12 Monaten, (4) mehr als 3 Steroidstöße in den letzten 12 Monaten, (5) Verschlechterung nach Steroidreduktion (25% Dosisreduktion) oder (6) ein lebensbedrohlicher Asthmaanfall in den letzten 3 Jahren. In dieser Studie wurden allerdings keine Polymorphismen von ADAM33 untersucht, sondern die Expression von ADAM33 Protein in Bronchialbiopsien.

So könnten die genetischen Varianten von ADAM 33 einen sehr variablen Einfluss auf die verschiedenen Asthmaformen haben. Also mehr Beeinflussung durch ADAM 33 von Asthmaformen, die weniger mit Atopie, sondern eher mit lungenspezifischen Mechanismen vergesellschaftet ist. Auch unsere Daten weisen daraufhin, dass die bisher bekannten ADAM 33 Polymorphismen nur einen geringen Einfluss auf die typische Form des kindlichen Asthmas, die sehr stark mit Atopie korreliert ist (wie in den meisten kindlichen Studienpopulationen), haben. Vielmehr wurde beobachtet, dass eine ganze Anzahl von SNP's mit nicht-atopischem Asthma und auch Basis-Lungenfunktionsparametern assoziiert sind. Doch auch diese Assoziationen scheinen eher einem komplexen Schema zu unterliegen, da nicht immer die gleichen SNP's mit nicht-atopischem Asthma oder Veränderungen der Lungenfunktion assoziiert waren.

Wie in neueren Studien gezeigt wurde, haben ADAM 33 Polymorphismen bei Erwachsenen mit Asthma möglicherweise eine andere Rolle als bei Kindern. Werner und Mitarbeiter genotypisierten 15 ADAM 33 Polymorphismen bei einer

familienbasierten und einer adulten Fall-Kontroll-Population und beobachteten dabei variable Assoziationen zwischen den SNP's und Asthma bei den jeweiligen Gruppen, auch im Hinblick auf die in der Erstveröffentlichung (van Eerdewegh (Van Eerdewegh, Little et al. 2002)) erhobenen Daten zu den Assoziationen (Werner 2004). Auch in zwei sehr großen Studien von Lind (Lind, Choudhry et al. 2003) und Raby (Raby, Silverman et al. 2004) konnten keine Assoziationen zwischen einzelnen ADAM 33 Polymorphismen oder Haplotypen und kindlichem Asthma nachgewiesen werden. Es wurden in diesen Studien leider nicht über die Effekte von ADAM 33 auf nicht-atopisches kindliches Asthma berichtet. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse der japanischen Studie von Noguchi ja gerade bei Kindern mit atopischem Asthma signifikante Assoziationen mit 3 ADAM33 Polymorphismen.

In einer Studie von Foley und Mitarbeiter wurde die Expression von ADAM33 und auch ADAM8 in Bronchialbiopsien von erwachsenen Asthmapatienten untersucht (Foley 2007). Hier konnte gezeigt werden, dass das ADAM33 Protein umso stärker exprimiert wird, je schwerer der Patient an Asthma erkrankt ist. So war die Expression von ADAM33 im untersuchten Biopsiematerial in der Patientengruppe mit moderatem und schwerem Asthma signifikant höher als bei Patienten mit milder Asthmaform oder bei den Kontrollpersonen.

Schließlich bleibt noch, die Unterschiede in den Studienpopulationen in Bezug auf Gen-Umwelt-Interaktionen zu betrachten, die möglicherweise einige der beobachteten diskrepanten Ergebnisse zwischen den Replikationsstudien erklären könnten. Auch bei anderen Genen konnte dies als Ursache für inkonsistente Ergebnisse bei Replikationsstudien gefunden werden. Es ist jedoch nicht geklärt, welcher der zahlreichen Umweltfaktoren mit ADAM 33 Genetik interagiert und ob diese Faktoren auch die Assoziationen zwischen ADAM 33 und Asthma beeinflussen können. Passivrauchen scheint keinen Einfluss auf diese Assoziationen zu haben. Nicht zu vernachlässigen sind unterschiedliche Phänotypen von Asthma in den verschiedenen Populationen und auch die Umweltbedingungen, in denen die Probanden aufwachsen und leben. In der Studie von Lind wurden 2 in den Vereinigten Staaten lebende Latinogruppen untersucht, eine puertoricanische mit der höchsten Prävalenz für Asthma und eine mexikanische mit der niedrigsten. Die Gruppen leben in den gleichen Verhältnissen und unter den gleichen Umweltbedingungen. Dennoch fand sich für keine

der beiden Populationen eine signifikante Assoziation mit Asthma. Auch in der Untersuchung von Hersh (Hersh 2007), in der 2 Populationen aus sehr unterschiedlichen Lebens- und Umweltbedingungen miteinander verglichen wurden, konnten bei annähernd gleicher Allelfrequenz (trotz unterschiedlicher Abstammung) keine Assoziationen mit ADAM33 Polymorphismen gefunden werden. Eine Studienpopulation bestand aus europäisch-amerikanischen Kindern, die andere aus hispanischen Kindern, die im Central Valley von Costa Rica aufgewachsen sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass spezielle, bisher nicht bekannte Umweltbedingungen und auch eine andere Ernährung in Japan eine Rolle dabei spielen, dass in der Untersuchung von Noguchi bei den an atopischem Asthma erkrankten Kindern signifikante Assoziationen von ADAM33 Polymorphismen mit Asthma gesehen wurden.

Spekulieren lässt sich auch über die Funktion, die ADAM33 bei der Pathogenese von Asthma spielt. Da ADAM33 hauptsächlich in mesenchymalen Zellen wie Lungenfibroblasten und glatter Muskulatur des Bronchialsystems vorkommt, weist die beobachtete starke Kopplung und Assoziation mit Asthma in Kombination mit bronchialer Hyperreaktivität verstärkt daraufhin, dass eine veränderte Proteinfunktion von ADAM33 zu einer Veränderung der Luftwege im Sinne eines „airway remodeling“ führen könnte. Also beispielsweise die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten beeinflusst, wenn eine Zunahme der ADAM33 Funktionen oder der ADAM 33 Proteinproduktion vorliegt. Ebenso möglich ist aber auch, dass der Verlust von ADAM33 Funktionen zum Remodeling führt, falls eine normale ADAM33 Funktion sonst die Atemwege vor gesteigerten Reparaturprozessen schützt. Dies führt dann zu subepithelialer Fibrose, die in einer deutlichen Einbuße der Lungenfunktion mündet. (Jongepier 2004). Haitchi et al konnten 2004 erstmals nachweisen, dass ADAM33 schon in embryonalem Lungengewebe vorliegt. Dies unterstützt die Hypothese, dass ADAM33 auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von bronchialen, vaskulären und neuronalen Strukturen der Atemwege und bei der Differenzierung von mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Es gibt leider keine Daten über die Expression von ADAM33 im weiteren Verlauf der menschlichen Entwicklung der Lunge in utero oder postpartum (Haitchi 2005). In einer weiteren Studie konnten Haitchi und Mitarbeiter jedoch bei Mäusen zeigen, dass die

ADAM33 mRNA Expression während der Embryonalzeit ansteigt und bis ins Erwachsenenalter hinein bestehen bleibt (Haïtchi 2003). So konnten Jongepier und Mitarbeiter bei Patienten mit Asthma bronchiale einen signifikanten Abfall der Einsekundenkapazität (FEV1) im Verlauf der Erkrankung mit ADAM33 Polymorphismen assoziieren. Bei den Patienten waren über einen Zeitraum von 20 Jahren Lungenfunktionsparameter gesammelt worden. So scheinen ADAM33 Polymorphismen auch hinsichtlich der Progression von Asthma eine Relevanz zu haben (Jongepier 2004). Also fungieren ADAM33 Polymorphismen möglicherweise nicht als Auslöser von Asthma bronchiale, sondern als ein modifizierender Faktor bei der Erkrankung hinsichtlich Chronizität und Schweregrad.

Martin und Mitarbeiter (Martin 2008) konnten in einer aktuellen Studie bei ADAM33 knockout Mäusen darstellen, dass sich nach Allergen-Sensibilisierung und Exposition keine Veränderung des Asthma-Phänotyps, inklusive bronchiale Hyperreaktivität, zeigte. Allerdings wurden keine Effekte auf das remodeling von glatten Bronchialmuskulaturzellen untersucht. So besteht nach wie vor die Möglichkeit, dass ADAM33 beim Allergen-getriggerten Umbau von glatten Muskelzellen eine Rolle spielen könnte. Hierfür wäre allerdings ein sogenanntes „chronisches Modell“ von Mäusen notwendig, also Mäuse die schon längere Zeit Asthma haben. Neben ADAM33 können noch eine Vielzahl anderer Gene durch ihre Variationen Einfluss auf die Veränderungen der glatten Bronchialmuskulatur nehmen (Martin 2008).

Doch scheinen dies nicht die einzigen Funktionen von Veränderungen im ADAM33 Protein zu sein. Cheng und Mitarbeiter haben in einer japanischen Population Assoziationen von ADAM33 Polymorphismen mit allergischer Rhinitis nachgewiesen (Cheng 2004). In einer aktuellen Studie von Lesueur und Mitarbeiter wurde ADAM33 erstmals sogar als neues Kandidatengen für Psoriasis genannt. Die Daten zeigten, dass verschiedene ADAM 33 Haplotypen stark mit dem Auftreten von Psoriasis assoziiert scheinen. Die Daten konnten allerdings in einer unabhängigen Kontrollpopulation nicht repliziert werden (Lesueur 2007).

In der Tabelle 21 sind 11 aktuelle Studien hinsichtlich ihrer Assoziationsergebnisse von ADAM33 Polymorphismen mit Asthma und anderen atopischen Phänotypen

zusammengefasst. Hersh und Mitarbeiter (Hersh 2007) haben die Daten von sogenannten Follow-up-Studien zu ADAM33 zusammengestellt und miteinander verglichen.

Tabelle 21: Vergleich verschiedener Studien von ADAM33 Polymorphismen und ihren Assoziationsergebnissen mit Asthma oder einem anderen Phänotyp (in Anlehnung an (Hersh 2007))

(n= Anzahl, ns= nicht signifikant, ja= signifikantes Ergebnis):

Studie: Erstautor	Studien-Population cc=Fall-Kontroll fa=Familienstudie	n= Fall/ Kontroll Familien(Ind.)	n= SNP	Assoziation mit Asthma		weitere Phänotypen	Assoziations- ergebnisse
				SNP	Haplotyp		
Lind (Lind, Choudhry et al. 2003)	Puertoricaner(cc) Mexikaner (cc) Puertor./Mexikaner (fa)	183/ 165 190/ 160 583 fa (1840)	6 6 6	ns ns ns	ns ns ns	IgE IgE	ns ns
Raby (Raby, Silverman et al. 2004)	weiße US-Amerikaner (fa) Afroamerikaner (fa) US Spanier (fa)	474 fa (1462) 66 fa (203) 47 fa (149)	17 17 17	ns ns T1, T+1	ns ns ja	IgE, BHR IgE, BHR IgE BHR	ns ns T1, T+1 ns
Werner (Werner 2004)	Deutsche (fa) Deutsche (cc)	171 fa (732) 48 / 499	15 15	F+1, ST+4 ST+5 ST+7	ja ja	IgE BHR IgE BHR	F+1, ST+5 F+1, S2 ST+7 ST+5
Howard (Howard 2003)	Holländer (cc) Afroamerikaner (cc) US-Amerikaner weiß (cc) US Spanier (cc)	153/ 124 160/ 256 219/ 225 112/ 126	8 8 8 8	ST+7,V4 S2 ST+7, T1, T2 S2, T2	ja ja ja ja	IgE IgE IgE IgE	ns ns ns ns
Lee (Lee, Park et al. 2004)	Koreaner (cc)	326/ 151	5	ns	ja	BHR	T1
Blakey (Blakey, Halapi et al. 2005)	Isländer (cc) Engländer (fa)	348/ 262 60 fa (240)	13 13	ns ns			
Schedel (Schedel 2006)	Deutsche weiß (cc) Deutsche weiß (Kohorte)	624/ 1248 824 Kinder	10 10	ns ns	ja ja	BHR BHR	ns ns
Noguchi (Noguchi, Ohtsuki et al. 2006)	Japaner (fa)	155 fa (538)	23	S+1, St+4, T2	ns	IgE	ns
Wang (Wang 2006)	Chinesen (cc)	296/ 270	3	ns	ns		
Hirota (Hirota 2006)	Japaner (cc)	504/ 651	14	S2, T1, T2, V-3	ja	IgE	ns
Kedda (Kedda 2006)	Australier weiß (cc)	612/ 473	10	ns	ja		

In knapp 50 % der Studien sind signifikante Assoziationen gefunden worden, jedoch waren nie die gleichen Polymorphismen im ADAM33 Gen mit Asthma, bronchialer Hyperreaktivität oder Erhöhung des Gesamt-IgE assoziiert.

Eingeschlossen in diese Metaanalyse sind alle in der englischsprachigen Literatur veröffentlichten Studien, die genetische Assoziationen mit ADAM33 und Asthma oder atopischen Phänotypen (z.B. bronchiale Hyperreaktivität, erhöhtes Gesamt-IgE) untersucht haben. Die Populationen hatten dabei eine minimale Größe von 100 Fällen und 100 dazugehörigen Kontrollen oder aber wenigstens 100 Familien. Als signifikante Assoziation wurde gewertet, wenn der p-Wert weniger als 0,05 betrug. Kombinationen wie z.B. Asthma plus bronchiale Hyperreaktivität wurden bei der Metaanalyse nicht berücksichtigt (Hersh 2007).

Raby und Mitarbeiter (Raby, Silverman et al. 2004) belegten, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass die negativen Replikationsstudien zu geringe Fallzahlen hatten, um eine Assoziation mit Asthma aufzuzeigen. Aber auch mit großen Probandenzahlen, wie in unserer Studie, mag die Möglichkeit, ein relatives Risiko von dieser Bedeutung erkennen zu können, eingeschränkt sein.

Weiter ist es sogar möglich, dass die bisher bekannten ADAM 33 Polymorphismen nur stellvertretend für viele noch nicht entdeckte SNP's im ADAM 33 Gen sind, die vielleicht verantwortlich für die beobachteten aber doch unterschiedlichen Signale von diesem Locus sind. Eventuell ist aber auch das Zusammenspiel von verschiedenen anderen Genen mit ADAM33 ursächlich für die gefundenen Assoziationen. Bis heute sind mittlerweile 5 Gene (ADAM 33 (Van Eerdewegh, Little et al. 2002), PHF11 (Zhang 2003), DDP10 (Allen 2003), GPR154 (SPSR1) (Laitinen 2004) und HLA-G (Nicolae 2005)) als potentielle „Asthmagene“, die durch Positionsklonierung gefunden wurden, bekannt. Bei nur 2 von diesen Genen (GPR154 (NSPR1) und PHF11) konnten die Assoziationsergebnisse bisher in Folgestudien bestätigt werden.

Es bedarf sicherlich noch vieler, vor allen Dingen auch funktioneller Studien, um mehr Einblick in die Aufgaben und die Wirkungsweise von ADAM33 und auch in die Interaktionen mit anderen Genen zu bekommen. Asthma bleibt auch in Zukunft eine multifaktorielle und polygenetische Erkrankung mit großer Herausforderung an Wissenschaft und Forschung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter. Die genaue Ätiologie einer solch komplexen Erkrankung wie Asthma bronchiale bleibt nach wie vor unklar und kann nur multifaktoriell erklärt werden. So scheinen neben Umwelteinflüssen auch eine genetische Prädisposition eine große Rolle zu spielen. In der Asthmaforschung sind in den letzten Jahren sogenannte Kandidatengene in den wissenschaftlichen Vordergrund gerückt. ADAM 33 wurde durch Positionsklonierung von van Eerdewegh 2002 als neues Asthma-Suszeptibilitätsgen auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 entdeckt. Einige untersuchte Polymorphismen zeigten signifikante Assoziationen mit Asthma und bronchialer Hyperreaktivität.

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 der bisher bekannten und signifikanten Polymorphismen in ADAM33 mit Hilfe der MALDI-TOF-Methode an zwei großen Populationen (eine Asthma-Fall-Kontroll-Population mit 1872 Kindern im Alter von 9-11 Jahren und eine Geburtskohorten-Population mit 824 Kindern im Alter von 10 Jahren) und einer gemischten Stichprobe (Querschnittsstudie) genotypisiert. Die Polymorphismen wurden im Anschluss auf Assoziationen mit Asthma und bronchialer Hyperreaktivität und die Auswirkungen auf die Lungenfunktion untersucht.

In keiner der beiden untersuchten Studienpopulationen konnte eine signifikante Assoziation zwischen den getesteten SNP's und Asthma gefunden werden. Nur das Risiko, nicht-atopisches Asthma zu entwickeln, war bei Trägern des polymorphen A-Allels im SNP S1 und bei Trägern des polymorphen G-Allels im SNP V4 deutlich erhöht. Ein deutlich erniedrigtes Risiko für die Entwicklung von nicht-atopischem Asthma zeigte sich bei Trägern des polymorphen T-Allels im SNP M+1. Auch die Untersuchung von bronchialer Hyperreaktivität und der Verknüpfung der beiden Phänotypen (Asthma plus BHR) zeigte keine signifikanten Assoziationen mit den untersuchten SNP's.

Bei Kindern mit Asthma und/ oder BHR war die forcierte Vitalkapazität (FVC) bei Trägern der S2, T1 und T2-Polymorphismen, FEV1 bei Trägern von S2 und M+1-Polymorphismen erhöht. Ein gesteigertes MEF75 fand sich bei Individuen mit polymorphem C-Allel im S2-SNP.

Bei der Haplotyp-Analyse zeigte der Haplotyp H4 (G-G-G-C-C-G-T-G) in der Gesamtpopulation eine signifikante Assoziation mit Asthma.

ADAM 33 spielt möglicherweise eine, wenn auch geringe, Rolle bei der Entstehung von Asthma bronchiale und bronchialer Hyperreaktivität im Kindesalter und hat Einfluss auf die Veränderungen der Lungenfunktion. Die genaue Funktion von ADAM33 ist jedoch nach wie vor unklar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

"American Thoracic Society. Standardization of Spirometry." (Update 1994).
Am J Respir Crit Care Med 102: 1107-1136.

Allen, M., Heinzmann, A., Noguchi, E., Abecasis, G., Broxholme, J., Ponting, C.P., Bhattacharyya, S., Tinsley, J., Zhang, Y., Holt, R., Jones, E.Y., Lench, N., Carey, A., Jones, H., Dickens, N.J., Dimon, C., Nicholls, R., Baker, C., Xue, L., Townsend, E., Kabesch, M., Weiland, S.K., Carr, D., von Mutius, E., Adcock, I.M., Barnes, P.J., Lathrop, G.M., Edwards, M., Moffatt, M.F., Cookson, W.O. (2003). "Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14."
Nat Genet 35: 258-263.

Asher, M. I., U. Keil, et al. (1995). "International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods."
Eur Respir J 8(3): 483-91.

Baldini, M., M. Kabesch, et al. (2000). "Detection Of Four Novel Polymorphisms In The CD14 Promoter And Association Of Their Haplotypes With Total Serum IGE Levels."
Am J Respir Crit Care Med 161: A928.

Barnes, K. C. (1999). "Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy."
Clin Exp Allergy 29(Suppl 4): 47-51.

Barret, J. (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps."
Bioinformatics 21: 263-265.

Bender, R., Lange, St., Ziegler, A. (2002). "Multiples Testen."
Dtsch Med Wochenschr 127: T4-T7.

Bjarnason, J. B. u. F., J. W. (1995). "Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins."
Methods Enzymol 248: 345-368.

Blakey, J., E. Halapi, et al. (2005). "Contribution of ADAM33 polymorphisms to the population risk of asthma."
Thorax 60(4): 274-276.

Bland, J. M., Altmann, D.G. (1995). "Multiple significance tests: The Bonferroni method."
Br med j 310: 170.

Buhl R, e. a. (2006). "Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma."
Pneumologie 60: 139-183.

Burrows, B., F. D. Martinez, et al. (1989). "Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens."
N Engl J Med 320(5): 271-7.

- Cheng, L., Enomoto, T., Hirota, T., Shimizu, M., Takahashi, N., et al. (2004). "Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen."
Clin Exp Allergy 34: 1192-1201.
- Chetta A, F. A., Del Donno M, Consigli GF, Bertorelli G, Pesci A et al.. (1996). "Bronchial responsiveness to distilled water and methacholine and its relationship to inflammation and remodeling of the airways in asthma."
Am J Respir Crit Care Med 153: 910-917.
- Cokugras H, A. N., Seekin, Camicioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F (2001). "Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma."
Thorax 56: 25-29.
- Collins, F. (1992). "Positional cloning: let's not call it reverse anymore."
Nat.Genet. 1: 3-6.
- Daniels, S. E., S. Bhattacharya, et al. (1996). "A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma."
Nature 383(6597): 247-50.
- Dreborg, S., R. Einarsson, et al. (1995). "Dust sampling for determination of allergen content."
Allergy 50: 188-189.
- Duffy, D. L., N. G. Martin, et al. (1990). "Genetics of asthma and hay fever in Australian twins."
Am Rev Respir Dis 142(6 Pt 1): 1351-8.
- Excoffier, L. (1995). "Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population."
Mol Biol Evol 12: 921-927.
- Foley, S. C., Mogas, A. K., Olivenstein, R., Fiset, P.O., Chakir, J., Bourbeau, J., Ernst, P., Lemière, C., Martin, J.G., Hamid, Q. (2007). "Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma."
J Allergy Clin Immunol 119: 863-871.
- Garlisi, C. G., J. Zou, et al. (2003). "Human ADAM33: protein maturation and localization."
Biochem Biophys Res Commun 301(1): 35-43.
- Gohlke, H. (2004). Genetische Assoziationen von SNP'2 in IL1RN mit Asthma bronchiale. München, Technische Universität, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
- Gould, R. J., Polokoff, M. A., Friedman, P. A., Huang, T. F., Holt, J. C., Cook, J. J. , Niewiarowski, S. (1990). "Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms."
Proc Soc Exp Biol Med 195: 168-171.

- Graves, P. E., M. Kabesch, et al. (2000). "A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children."
J Allergy Clin Immunol 105(3): 506-13.
- Griffin, T. J. and L. M. Smith (2000). "Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry."
Trends Biotechnol 18(2): 77-84.
- Haitchi, H. M., Powell, R.M., Wilson, D.I., Holgate, S.T., Davies, D.E. (2003). "ADAM33 expression in embryonic mouse lung."
Am J Respir Crit Care Med 167:A377.
- Haitchi, M. H., Powell, R.M., Shaw, T.J., Howarth, P.H., Wilson, S.J., Wilson, D.I., Holgate, S.T., Davies, D.E. (2005). "ADAM33 expression in asthmatic airways and human embryonic lungs."
Am J Respir Crit Care Med 171: 958-965.
- Harris, J. R., P. Magnus, et al. (1997). "No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins."
Am J Respir Crit Care Med 156(1): 43-9.
- Hartl, D. L., Clark, A.G. (2007). Principles of population genetics.
- Hersh, C. P., Raby, B.A., Soto-Quirós, M.E., Murphy, A.J., Avila, L., Lasky-Su, J., Sylvia, J.S., Klandermann, B.J., Lange, Ch., Weiss, S.T., Celedón, J.C. (2007). "Comprehensive testing of positionally cloned asthma genes in two populations." Am J Respir Crit Care Med 176: 849-857.
- Hirota, T., Hasegawa, K., Obara, K., Matsuda, A., Akahoshi, M., Nakashima, K., Shirakawa, T., Doi, s., Fujita, K., Suzuki, Y., et al. (2006). "Association between ADAM33 polymorphisms and adult asthma in a Japanese population."
Clin Exp Allergy 36: 884-891.
- Howard, T. D., Postma, D.S., Jongepier, H., Moore, W.C., Koppelman, G.H., Zheng, S.L., Xu, J., Bleeker, E.R., Meyers, D.A. (2003). "Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations."
J Allergy Clin Immunol 112: 717-722.
- ISAAC Steering Committee (Writing Committee: Beasley R, K. U., von Mutius E, Pearce N) (1998). "Worldwide variations in the prevalence of atopic diseases: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)."
Lancet 351: 1225-32.
- Jongepier, H., Boezen, H., Dijkstra, A., Howard, T., Vonk, J., Koppelman, G., Zheng, S. Meyers, D., Bleeker, E. and Postma, D.S. (2004). "Polymorphisms in the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function decline in asthma."
Clin Exp Allergy 34: 757-760.

- Kabesch, M. (2001). "Asthma und Allergie: Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren."
Monatsschr Kinderheilkd 149(2): 94-105.
- Kabesch, M., M. Baldini, et al. (2000). "Lack Of Association Between The I117T Polymorphism In The GM-CSF Gene And Asthma Phenotypes In Two Populations."
Am J Respir Crit Care Med 161: A602.
- Kabesch, M., W. Schaal, et al. (1999). "Lower prevalence of asthma and atopy in Turkish children living in Germany."
Eur Respir J 13(3): 577-82.
- Kedda, M. A., Duffy, D.L., Bradley, B., O'Hehir, R.E., Thompson, P.J. (2006). "ADAM33 haplotypes are associated with asthma in a large Australian population."
Eur J Hum Genet 14: 1027-1036.
- Kelly, Y. (1996). "Clinical significance of cough and wheeze in the diagnosis of asthma."
Arch Dis Child 75: 489.
- Kulig, M., U. Klettke, et al. (2000). "Development of seasonal allergic rhinitis during the first 7 years of life."
J Allergy Clin Immunol 106(5): 832-9.
- Laitinen, H., Polvi, A., Rydman, P., Vendelin, J., Pulkkinen, V., Salmikangas, P., Makela, S., Rehn, M., Pirskanen, A., Rautanen, A., Zucchelli, M., Gullsten, H., Leino, M., Alenius, H., Petays, T., Haahtela, T., Laitinen, A., Laprise, C., Hudson, T.J., Laitinen, L.A., Kere, J. (2004). "Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits."
Science 304: 300-304.
- Lau, S., G. Falkenhorst, et al. (1989). "High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults."
J Allergy Clin Immunol 84(5 Pt 1): 718-25.
- Lee, J. H., H. S. Park, et al. (2004). "ADAM33 polymorphism: association with bronchial hyper-responsiveness in Korean asthmatics."
Clin Exp Allergy 34(6): 860-5.
- Lenz, A., Schedel, M., Depner, M., Woitsch, B., Hara, S., Trinks, M., Kormann, M.S.D., Kabesch, M. (2006). Standard operating procedures of asthmagene.de.
- Lesueur, F., Oudot, T., Heath, S., Foglio, M., Lathrop, M., Prud'homme, J-F., Fischer, J. (2007). "ADAM33, a new candidate für psoriasis susceptibility."
PLoS ONE 2(9): e906.
- Leushner, J. (2001). "MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics."
Expert Rev Mol Diagn 1(1): 11-8.

- Lind, D. L., S. Choudhry, et al. (2003). "ADAM33 is not associated with asthma in Puerto Rican or Mexican populations."
Am J Respir Crit Care Med 168(11): 1312-6.
- Lindemann H., L. W. (2003). Lungenfunktionsdiagnostik im frühen Kindesalter. Stuttgart, Kohlhammer.
- Liu, X., T. H. Beaty, et al. (2003). "Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study."
Journal of Allergy and Clinical Immunology 112(2): 382-388.
- Luck, W. and H. Nau (1985). "Nicotine and cotinine concentrations in serum and urine of infants exposed via passive smoking or milk from smoking mothers."
J Pediatr 99: 763-9.
- Martin, G. M., Taisuke, J. (2008). "Genetic differences in airway smooth muscle function."
Proc Am Thorac Soc 5: 73-79.
- Martinez, F. D. (1995). "Viral infections and the development of asthma."
Am J Respir Crit Care Med 151(5): 1644-7.
- Martinez, F. D., A. L. Wright, et al. (1995). "Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates."
N Engl J Med 332(3): 133-8.
- Meunier, F., M. H. Dizier, et al. (2000). "Genome-wide search for specific response to allergens in the French EGEA study."
Am J Respir Crit Care Med 161: A600.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells."
Nucleic Acid Res 16(3): 1215.
- National Institutes of Health (National Heart, L. a. B. I. (1997). "Guidelines for the diagnosis of asthma."
NIH Publication Nr 97-4051 A.
- Nicolae, D., Cox, N.J., Lester, L.A., Schneider, D., Tan, Z., Billstrand, C., Kuldane, S., Donfack, J., Kogut, P., Patel, N.M., Goodenbour, J., Howard, T., Wolf, R., Koppelman, G.H., White, S.R., Parry, R., Postma, D.S., Meyers, D., Bleeker, E.R., Hunt, J.S., Solway, J., Ober, C. (2005). "Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21."
Am J Hum Genet 76: 349-357.
- Nicolai, T., E. V. Mutius, et al. (1993). "Reactivity to cold-air hyperventilation in normal and in asthmatic children in a survey of 5,697 schoolchildren in southern Bavaria."
Am Rev Respir Dis 147(3): 565-72.

- Niggemann, B., S. Illi, et al. (2001). "Histamine challenges discriminate between symptomatic and asymptomatic children. MAS-Study Group. Multicenter Allergy Study."
Eur Resp J 17: 246-253.
- Noguchi, E., Y. Ohtsuki, et al. (2006). "ADAM33 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in a Japanese population."
Clinical & Experimental Allergy 36: 602-608.
- O'Byrne, P. (2000). Asthma. London, Clark TJH, Godfrey S, Lee TH.
- Ober, C., N. J. Cox, et al. (1998). "Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma."
Hum Mol Genet 7: 1393-8.
- Ollerenshaw SL, W. A. (1992). "Characteristics of the inflammation in biopsies from large airways of subjects with asthma and subjects with chronic airway limitation."
Am Rev Respir Dis 145: 922-927.
- Powell, R. M., Wicks, J., Holloway, J. W., Holgate, S.T., Davies, D. E. (2004). "The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol 31: 13-21.
- Primakoff, P. (2000). "The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity."
Trends Genet 16: 83-87.
- Raby, Silverman, et al. (2004). "ADAM33 polymorphisms and phenotype associations in childhood asthma."
The Journal of Allergy and Clinical Immunology 113(6): 1071-1078.
- Romanet-Manent S., C. D., Magnan A., Lanteaume A., Vervloet D and E. C. Group (2002). "Allergic versus nonallergic asthma: what makes the difference?"
Allergy 57: 607-613.
- Sasieni, P. (1997). "From genotypes to genes: doubling the sample size."
Biometrics 53: 1253-1261.
- Schedel, M., Depner, M., Schoen, C., Weiland, S.K., Vogelberg, C., Niggemann, B., Lau, S., Illig, T., Klopp, N., Wahn, U., et al. (2006). "The role of polymorphisms in ADAM33, a disintegrin and metalloprotease 33, in childhood asthma and lung function in two German populations."
Respir Res 7: 91.
- Shirakawa, I., K. A. Deichmann, et al. (2000). "Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling."
Immunol Today 21(2): 60-4.
- Storm, N., B. Darnhofer-Patel, et al. (2003). "MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping."
Methods Mol Biol 212: 241-62.

- Van Eerdewegh, P., R. D. Little, et al. (2002). "Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness."
Nature.
- von Mutius, E., F. Martinez, et al. (1994). "Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany."
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149(2): 358-364.
- von Mutius, E., S. K. Weiland, et al. (1998). "Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany."
Lancet 351: 862-6.
- Wang, P., Liu, Q.J., Li, J.S., Wei, C.H., Guo, C.H., Gong, Y.Q. (2006). "Lack of association between ADAM33 gene and asthma in a Chinese population."
Int J Immunogenet 33: 303-306.
- Weidinger, S. and e. al. (2004). "Association of a STAT6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults."
J Med Genet 41(9): 658-663.
- Weiland, S. K., E. von Mutius, et al. (1999). "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.
- Werner, M., Herborn, N., Gohlke, H., Altmüller, J., Knapp, M., Heinrich, J., Wjst, M. (2004). "Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33."
Clin Exp Allergy 34: 26-31.
- Williams HC, B. P., Strachan D, Hay RJ. (1994). "The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. II. Observer variation of clinical diagnosis and signs of atopic dermatitis."
British Journal of Dermatology 131(3): 397-405.
- Wjst, M. and H. E. Wichmann (1995). "Collaborative study on the genetics of asthma in Germany."
Clin Exp Allergy 2: 23-5.
- Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. P. J., Primakoff, P., Myles, D. G., White, J. M. (1995). "ADAM, a Widely Distributed and Developmentally Regulated Gene Family Encoding Membrane Proteins with A Disintegrin And Metalloprotease Domain."
Dev Biol 169: 378-383.
- Wolfsberg, T. G., White, J. M. (1996). "ADAMs in fertilization and development."
Dev Biol 180: 389-401.
- Zaykin, D. V., P. H. Westfall, et al. (2002). "Testing Association of Statistically Inferred Haplotypes with Discrete and Continuous Traits in Samples of Unrelated Individuals."
Human Heredity 53(2): 79-91.

Zhang, Y., Leaves, N.I., Anderson, G.G., Ponting, C.P., Broxholme, J., Holt, R., Edser, P., Bhattacharyya, S., Dunham, A., Adcock, I.M., Pulleyn, L., Barnes, P.J., Harper, J.I., Abecasis, G., Cardon, L., White, M., Burton, J., Matthews, L., Mott, R., Ross, M., Cox, R., Moffatt, M.F., Cookson, W.O. (2003). "Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma." Nat Genet 34: 181-186.

Zou, J., F. Zhu, et al. (2004). "Catalytic activity of human ADAM33." J Biol Chem 279(11): 9818-30.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1** (S.5): Fluss-Volumen-Kurve (aus BDA Manual Asthma, Dr. H. Mitfessel)
- Abbildung 2** (S.10): Schematische Darstellung der Domänenstruktur von ADAM33
- Abbildung 3** (S.12): Genomkarte ADAM33 aus (Van Eerdewegh, Little et al. 2002) (van Eerdewegh)
- Abbildung 4** (S.30): Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (nach Griffin and Smith, 2000)
- Abbildung 5** (S.31): Kontrollschema für Mutterplatte, NK=Negativkontrolle
- Abbildung 6** (S.32): Verteilungsmuster von 4 Mutterplatten (96er Platten) auf eine Tochterplatte (384er Platte)
- Abbildung 7** (S.37): Schematischer Ablauf der hME-Methode (aus Gohlke, 2004)
- Abbildung 8** (S.41): Position der untersuchten SNP's im ADAM33-Gen

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 (S.27):	Standard-PEP-Ansatz
Tabelle 2 (S.28):	Allgemeine Temperatur-Bedingungen für die Standard-PEP-Reaktion
Tabelle 3 (S.33):	Komponenten eines PCR-Ansatzes
Tabelle 4 (S.33):	Allgemeine Temperatur-Bedingungen einer PCR
Tabelle 5 (S.34):	verwendete sense- und anti-sense-Primer für die jeweiligen Polymorphismen
Tabelle 6 (S.35):	verwendete Extensions-Primer
Tabelle 7 (S.42):	Bezeichnung und Lokalisation der SNP's im ADAM33-Gen
Tabelle 8 (S.44):	Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma (Arzt Diagnose) in der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)
Tabelle 9 (S.44):	Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma (Arzt Diagnose) in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe (n=824)
Tabelle 10 (S.45):	Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma (Arzt Diagnose) in der Querschnittsstudie (n=2.696)
Tabelle 11 (S.46):	Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit BHR in der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)
Tabelle 12 (S.46):	Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit BHR in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe (n=824)
Tabelle 13 (S.47):	Assoziationen der SNP's im ADAM33-Gen mit Asthma und BHR in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe
Tabelle 14 (S.48):	Lungenfunktionsparameter aller Kinder mit Asthma (Arzt Diagnose) und/oder BHR aus der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)
Tabelle 15 (S.49):	Lungenfunktionsparameter aller Kinder ohne Asthma oder BHR aus der Fall-Kontroll-Gruppe (n=1.872)
Tabelle 16 (S.50):	Haplotypen und deren Frequenzen in der Fall-Kontroll-Gruppe
Tabelle 17 (S.50):	Haplotypen und deren Frequenzen in der MAS-Geburtskohorten-Gruppe
Tabelle 18 (S.51):	Haplotypen und Assoziationen mit Asthma (Arzt Diagnose), Fall-Kontroll-Gruppe
Tabelle 19 (S.51):	Haplotypen und Assoziationen mit Asthma (Arzt Diagnose), MAS-Geburtskohorten-Gruppe
Tabelle 20 (S.52):	Haplotypen und Assoziationen mit Asthma (Arzt Diagnose), Gesamtpopulation
Tabelle 21 (S.62):	Vergleich verschiedener Studien von ADAM33 Polymorphismen und ihren Assoziationsergebnissen mit Asthma oder einem anderen Phänotyp

9 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
AR	Atopische Rhinitis, Heuschnupfen
asPCR	Allel- spezifische Polymerase- Kettenreaktion
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CI	Konfidenzintervall
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FEV ₁	Forciertes Einsekundenvolumen
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
G	Guanin
HCl	Salzsäure
hME	Homogenous Mass Extension
H ₂ O	Wasser
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
Ig E	Immunglobulin E
ISAAC	International study of asthma and allergies in childhood

kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
LD	Linkage Disequilibrium
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight
MAS	Multicenter Allergy Study
Mb	Megabasenpaare
MEF	maximaler expiratorischer Flow
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MT, auch Tm	Melting Temperature / Schmelztemperatur
n	Nano
n=	Anzahl
nm	Nanometer
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEF	Peak expiratory flow
PEP	Primer Extension Preamplification
POL	Polymorphismus
rpm	round per minute
SAP	Shrink alkaline phosphatase
SDS	sosdium dodecyl sulphate
sec	Sekunden
SNP	Single- Nucleotid- Polymorphismus
SPT	Skin- Prick- Test
T	Thymin
Tab.	Tabelle

taq	thermus aquaticus
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
VC	Vitalkapazität
VE	Variable element
WT	Wildtyp (der in der Grundmenge häufigere)

CURRICULUM VITAE

Name: Carola Schön
Geburtsdatum: 24. Oktober 1967
Geburtsort: Offenburg/ Baden
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1974 – 1978 Grundschohle in Offenburg/ Baden
 1978 – 1987 Grimmelshausen-Gymnasium in Offenburg
 Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Note: 1.9)

Akademischer Werdegang

1987 – 1993 Medizinstudium an der Albert-Ludwig-Universität Freiburg
 08/1989 Physikum
 03/1991 1. Staatsexamen
 03/1993 2. Staatsexamen
 1993 – 1994 Praktisches Jahr:
 BUMC, Boston, MA, USA, Chirurgie
 LMU München, Klinik für Innere Medizin
 LMU München, Dr. v. Haunersches Kinderspital
 1994 3. Staatsexamen (Note 2.66)

Beruf

01/1995 AIP im Dr. von Haunerschen Kinderspital (LMU München)
 07/1996 Approbation als Ärztin
 Seit 07/1996 Assistenzärztin im Dr. von Haunerschen Kinderspital
 (LMU München)
 05/2004 Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin

Promotion

2005 – 2008 Promotion im Fachbereich Humangenetik/Pädiatrie („Die Rolle von ADAM33 Polymorphismen bei Asthma und Lungenfunktion“), LMU München, Betreuer:
 PD Dr. med. M. Kabesch

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, durch deren Unterstützung die Dissertation ermöglicht wurde und gelingen konnte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Michael Kabesch für die Bereitstellung des Themas, für die fachliche Anleitung, ausdauernde Betreuung und kritischen Kommentare. Dank seiner Diskussions- und Hilfsbereitschaft war es möglich, die Ergebnisse zu veröffentlichen. Vor allem dankbar bin ich für sein Vertrauen in mein Können und dass er mir das „Handwerk“ der Molekulargenetik sehr gut beigebracht hat.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Allergogenetik sei herzlich gedankt für die fachliche Betreuung und die immer angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Laune. Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei Michaela Schedel bedanken, für ihre Geduld und Ausdauer bei der Durchführung der Genotypisierungen in der GSF und die netten Mitfahrgelegenheiten dort hin. Besonders aber für ihre sowohl hohen fachlichen und menschlichen Kompetenzen, als auch ihre immerwährende Hilfestellung, die die Durchführung des Projektes und die Veröffentlichung der Ergebnisse möglich machten.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Wilfried Peters für die fachliche Unterstützung im Labor und die stets guten Vor- und Ratschläge. Ilona Dahmen und Anja Pleiss danke ich für ihre Bereitschaft, in jeglicher Situation helfend zur Seite zu stehen. Michael Korman gebührt der Dank für Rat und Tat am Computer. Vielen Dank auch an David Carr und Martin Depner, die mich bei der statistischen Auswertung nicht allein gelassen haben. Auch allen Mit-Doktoranden möchte ich für das gute Arbeitsklima im Labor und die netten Kubusfeste danken.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Geschwistern, allen Freunden und Kollegen, die mich all die Jahre unterstützt haben und alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die an mich glauben und mir alles ermöglichten.