

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

**Die Rolle von Polymorphismen in den Genen STAT-1, Interleukin-15 und
Interleukin-15 Rezeptor α bei der Entstehung von atopischen Erkrankungen im
Kindesalter**

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

vorgelegt von

Lena Steudemann

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Kabesch
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Tim M. Strom

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Peter Kufer
Prof. Dr. Helmut Diepolder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Asthma bronchiale im Kindesalter	1
1.1.1. Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2. Klinisches Erscheinungsbild.....	2
1.1.3. Formen des Asthma bronchiale und potentielle Auslöser von Asthmaanfällen..	3
1.2. Weitere atopische Erkrankungen.....	3
1.2.1. Atopische Dermatitis	3
1.2.2. Allergische Rhinitis.....	4
1.3. Pathoimmunologie atopischer Erkrankungen	4
1.3.1. Die Sensibilisierung gegenüber Aeroallergenen.....	4
1.3.2. Die unspezifische Immunreaktion gegenüber Allergenen.....	5
1.3.3. Die Rolle der T-Lymphozyten in der Immunantwort.....	6
1.3.4. Das Th ₁ -Th ₂ -Paradigma und die allergische Reaktion am Beispiel des allergischen Asthma bronchiale	7
1.3.5. Die Rolle von NKT- und γδ T-Zellen in der allergischen Pathoimmunologie	9
1.3.6. Pathoimmunologische Besonderheiten der atopischen Dermatitis	10
1.4. Funktion und Interaktion von IL-15, IL-15Rα und STAT-1.....	11
1.4.1. Übersicht über den IL-15-Signalweg	12
1.4.2. Vorkommen von IL-15.....	13
1.4.3. Effekte von IL-15 auf T-Lymphozyten.....	14
1.4.4. Effekte von IL-15 auf NK- und NKT-Zellen	15
1.4.5. Effekte von IL-15 auf neutrophile Granulozyten	15
1.4.6. Effekte von IL-15 auf dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen.....	15
1.4.7. Effekte von IL-15 auf weitere Zellen des Immunsystems und auf Zellen in der Haut	16
1.4.8. Antiapoptotische Wirkung von IL-15.....	17
1.4.9. Die Rolle von IL-15Rα bei der IL-15-Signaltransduktion.....	17
1.4.10. STAT-1	20
1.5. Die genetische Komponente	22
1.5.1. Molekulargenetische Grundlagen.....	23
1.5.2. Das Gen IL-15	24
1.5.3. Das Gen IL-15Rα.....	25
1.5.4. Das Gen STAT-1	26
1.6. Ziel dieser Arbeit	27

2. Material und Methoden	28
2.1. Probanden / Population.....	28
2.1.1. Population für das Mutationsscreening	28
2.1.2. Population für die Genotypisierung	28
2.2. DNA-Extraktion	30
2.2.1. Aussalzmethode	30
2.2.2. FlexiGene-Kit	31
2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
2.4. Aufreinigung des PCR-Produkts.....	35
2.5. Agarosegelelektrophorese.....	35
2.6. Bestimmung der DNA-Konzentration.....	36
2.7. Mutationsscreening	36
2.7.1. Sequenzierreaktion nach der Didesoxymethode nach Sanger	36
2.7.2. Ethanolfällung	37
2.7.3. Kapillargelelektrophorese.....	38
2.7.4. Auswertung der Sequenzen.....	38
2.8. Bestimmung der SNPs für die Genotypisierung.....	40
2.9. PEP-PCR	41
2.10. Multiple Displacement Amplification (MDA)	42
2.11. Genotypisierung	43
2.11.1. Versuchsplanung	43
2.11.2. Vorbereitung der Platten	44
2.11.3. PCR	45
2.11.4. Abbau überschüssiger dNTPs	47
2.11.5. Primer-Extensions-Reaktion	47
2.11.6. Aufbereitung der Platten für die MALDI-TOF.....	50
2.11.7. MALDI-TOF-Analyse.....	50
2.11.8. Genotypisierung durch die TaqMan® Allelunterscheidung.....	51
2.12. Statistik	53
2.12.1. Hardy-Weinberg-Equilibrium	53
2.12.2. Rechenmodelle	54
2.12.3. Odd's Ratio und Signifikanztests	54
2.12.4. Analyse der IgE-Werte	55
2.12.5. Haplotypanalyse	55
2.13. Phylogenetischer Vergleich	56

2.14. Strukturanalyse	57
2.14.1. Strukturanalyse der im Promotorbereich und in den Introns lokalisierten SNPs ..	57
2.14.2. Strukturanalyse der in den Exons lokalisierten SNPs mit Aminosäureaustausch	58
2.15. Material	58
2.15.1. Reagenzien und Chemikalien	58
2.15.2. Enzyme.....	59
2.15.3. Lösungen und Puffer.....	60
2.15.4. Reagenziensysteme (Kits)	61
2.15.5. Verbrauchsmaterialien	61
2.15.6. Geräte.....	62
2.15.7. Datenbanken	63
2.15.8. Software	63
3. Ergebnisse	64
3.1. IL-15 – der Weg von der Mutation zur Assoziation	65
3.1.1. Für das Gen IL-15 analysierte SNPs.....	65
3.1.2. Genotypisierung und Bildung von Haplotypen.....	66
3.1.3. Assoziationsanalyse der einzelnen SNPs und der Haplotypen	66
3.2. IL-15R α – der Weg von der Mutation zur Assoziation.....	68
3.2.1. Mutationsscreening des IL-15R α -Gens	68
3.2.2. Genotypisierung.....	68
3.2.3. Assoziationsanalyse der einzelnen SNPs	70
3.2.4. Haplotypanalyse	73
3.3. STAT-1 – der Weg von der Mutation zur Assoziation	75
3.3.1. Für das Gen STAT-1 analysierte SNPs.....	75
3.3.2. Genotypisierung.....	75
3.3.3. Assoziationsanalyse der einzelnen SNPs	77
3.3.4. Haplotypanalyse	80
3.4. Phylogenetischer Vergleich	82
3.5. Strukturanalyse der in den Exons lokalisierten SNPs	85
3.6. Strukturanalyse der in den Introns lokalisierten SNPs	90
3.7. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse	92

4. Diskussion.....	93
4.1. Kritische Betrachtung des Studienaufbaus	94
4.2. Die IL-15-Signalkaskade und ihre Rolle im atopischen Kontext.....	98
4.3. Bedeutung unserer Ergebnisse für die Zukunft.....	105
5. Zusammenfassung	107
6. Quellenverzeichnis	109
7. Anhang	118
7.1. Genkarten	118
7.2. Kodierung der Aminosäuren.....	118
8. Abkürzungsverzeichnis.....	119
9. Tabellenverzeichnis.....	124
10. Abbildungsverzeichnis.....	126
11. Danksagung	128
12. Lebenslauf.....	129
13. Publikationen	130

1. Einleitung

1.1. Asthma bronchiale im Kindesalter

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Funktionsstörung der Atemwege, die wiederholte Episoden mit pfeifendem Atemgeräusch, Atemlosigkeit, Brustenge und trockenem Husten verursacht.^{1,2} Es stellt in den westlichen Industrienationen eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter dar.^{3,4}

Der Krankheitsbeginn liegt bei Knaben überwiegend vor, bei Mädchen vorwiegend nach der Pubertät, sodass im Kindesalter mehr Knaben, in der Adoleszenz aber beide Geschlechter ungefähr gleich häufig betroffen sind.^{5,6}

Auf dem Boden einer Entzündung entsteht sowohl eine Obstruktion der Atemwege als auch eine erhöhte Empfindlichkeit des betroffenen Gewebes gegenüber verschiedenartigen unspezifischen Stimuli^{1,2}; diese bronchiale Entzündung, die bronchiale Hyperreagibilität und die endobronchiale Obstruktion stellen die für das Asthma charakteristische Symptomtrias dar. Die Obstruktion entsteht dabei durch das Zusammenspiel aus Bronchospasmus, inflammatorischem Schleimhautödem und reaktiver Hypersekretion der Atemwege.⁷ Längerfristig können diese Veränderungen auch im anfallsfreien Intervall eine bronchiale Hyperreagibilität, einen reaktiven Umbau und letztendlich auch eine chronische irreversible Obstruktion der Luftwege bedingen.^{8,9}

Epidemiologische Vergleichsstudien zeigen sowohl weltweite, aber auch starke regionale Unterschiede bezüglich der Inzidenz und Prävalenz.^{1,3,10} In Deutschland sind etwa 10 % der Kinder erkrankt^{3,4}, wobei die Prävalenz des Asthmas neben den genannten geographischen Unterschieden auch von den Lebens- und Umweltbedingungen abhängig zu sein scheint. Aus der Beobachtung, dass Kinder, die mit vielen Geschwistern aufwachsen, seltener an Asthma erkranken als gleichaltrige Einzelkinder, entwickelte sich die sogenannte Hygienehypothese: diese Hypothese besagt, dass der beobachtete protektive Effekt aus der quantitativ höheren Exposition gegenüber Keimen und Infekten in kinderreichen Familien resultiert.¹¹ Weitere Studien bestätigten diese Hypothese, indem sie zeigten, dass Kinder, die durch andere Faktoren früh vielen Keimen und Infekten ausgesetzt werden – beispielsweise durch den frühen Besuch einer Kinderkrippe oder das Aufwachsen auf einem Bauernhof – ebenfalls seltener an Asthma und anderen atopischen Erkrankungen leiden.¹² Die Hygienehypothese geht also davon aus, dass die beinahe konstante subklinische Exposition gegenüber mikrobiellen Substanzen – welche durch verschiedene Umweltfaktoren hervorgerufen werden kann – für die Reifung des Immunsystems sowie für den Schutz vor einer allergischen Sensibilisierung und damit vor einer nachfolgenden atopischen Krankheit

wichtig ist. Durch einen unterschweligen, andauernden immunologischen Reiz in Form der beschriebenen Expositionswegs könnte das Immunsystem eher in eine T₁-gerichtete („nichtallergische“) Immunantwort gelenkt und somit zur Toleranzentwicklung gegenüber ubiquitären Umweltstoffen stimuliert werden, sodass auch andere Antigene eher durch das gestärkte T₁-Immunsystem als durch das allergieauslösende T₂-Immunsystem abgefangen werden könnten.^{12,13,14} Dabei scheint eine solche oben beschriebene ständige unterschwellige Stimulierung des angeborenen Immunsystems vor einer allergischen Sensibilisierung vor einer solchen und damit vor den assoziierten atopischen Erkrankungen zu schützen, *nach* einer bereits erfolgten Sensibilisierung aber zu einer allergischen Reaktion zu führen.^{1,15}

1.1.2. Klinisches Erscheinungsbild

Klinisch äußert sich ein Asthmaanfall bei Kindern vor allem durch einen trockenen Husten, durch Dyspnoe und / oder Tachypnoe und durch ein verlängertes, von unterschiedlichen Atemgeräuschen begleitetes Exspirium.⁷

Die Kinder sitzen meist aufrecht, um die Atemhilfsmuskulatur einsetzen zu können: hierdurch bedingte interkostale Einziehungen, Nasenflügeln und eine Zyanose sind Zeichen der Luftnot.

Auskultatorisch imponiert ein verlängertes Exspirium, das meist von unterschiedlichen Atemgeräuschen (Giemen, Brummen) begleitet wird. Je überblähter jedoch die Lunge bereits ist, d. h. je länger der Anfall bereits andauert oder je schwerer der Anfall ist, desto leiser sind die auskultatorischen Befunde jedoch („*silent chest*“). Perkutorisch zeigt sich ein hypersonorer Klopfschall als Zeichen der Überblähung.⁷

Das astmatypische Atemgeräusch und die begleitende Symptomatik treten im Kindesalter jedoch nicht nur bei Asthmapatienten auf: bei vielen Kindern zeigt sich in den ersten sechs Lebensmonaten eine obstruktive Symptomatik, die sich jedoch meistens nicht als Asthmaerstmanifestation erweist sondern durch einen viralen Atemwegsinfekt in Verbindung mit kleinlumigen Atemwegen bedingt ist. Kinder, die solche obstruktiven Episoden über das dritte Lebensjahr hinaus aufzeigen oder deren erste obstruktive Episode erst nach diesem Zeitpunkt auftritt, besitzen jedoch ein erhöhtes Risiko einer späteren Asthmamanifestation, zumal wenn sie eine starke obstruktive Symptomatik mit einer deutlichen Einschränkung der Lungenfunktion zeigen und familiär vorbelastet sind oder selbst bereits an einer anderen atopischen Erkrankung leiden.^{10,16,17,18}

1.1.3. Formen des Asthma bronchiale und potentielle Auslöser von Asthmaanfällen

Je nach Ursache der Symptomatik können verschiedene Phänotypen der Erkrankung Asthma bronchiale unterschieden werden, die sich nicht nur in der Ätiologie sondern auch im Verlauf unterscheiden, aber meist zu annähernd gleicher Symptomatik führen: neben *Allergien* können *irritative oder toxische Substanzen* eine Asthmaerkrankung bedingen; *verschiedene Medikamente* oder ein *gastroösophagealer Reflux* können zu einem ähnlichen klinischen Bild führen; asthmatische Symptome unmittelbar nach oder während starker körperlicher Belastung („*Anstrengungsasthma*“) oder *infolge respiratorischer Infekte* treten fast ausschließlich im Kindesalter auf, da in den kindlichen Atemwegen mit ihrer geringeren Größe oft schon kleine Einschränkungen im Durchmesser zu einer so starken Widerstandserhöhung führen, dass asthmatische Atemgeräusche entstehen. Die meisten Asthmaerkrankungen im Kindesalter sind jedoch rein allergisch bedingt oder liegen in Mischformen vor.¹⁶

Bei bereits an Asthma erkrankten Kindern können der Kontakt mit dem verantwortlichen Allergen, körperliche Belastung, Kälte, Staub und andere irritative Substanzen sowie psychische Belastungen einen Anfall auslösen. Kurzfristige hormonelle Veränderungen (z.B. Periode) können ebenfalls einen Anfall auslösen.¹⁹

1.2. Weitere atopische Erkrankungen

Neben dem allergischen Asthma zählen die atopische Dermatitis und die allergische Rhinitis zu den Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis.

1.2.1. Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist als eine entzündliche, chronisch-rezidivierende, juckende Hauterkrankung definiert und imponiert klinisch durch nässende, entzündlich-infiltrierte Erytheme mit teilweise bis in die Dermis reichenden Substanzdefekten.²⁰ Zwischen 15 % und 30 % der Kinder in den westlichen Industrienationen leiden unter atopischer Dermatitis, wobei Mädchen und Buben gleich häufig erkranken.²¹ Der Erkrankungsbeginn liegt bei den meisten Patienten im Säuglings- oder Kleinkindesalter, das typische Erstmanifestationsalter sind die ersten drei Lebensmonate.²⁰ Bei etwa 40 % der Kinder sistiert die Erkrankung bis zum Erwachsenenalter, allerdings kann bei circa 30 % der Patienten ein schwerwiegender, persistierender Krankheitsverlauf beobachtet werden.²²

1.2.2. Allergische Rhinitis

Die allergische Rhinitis, an der in Deutschland etwa 10 bis 15 % der Kinder leiden²³, äußert sich in einer Hypersekretion der Nasenschleimhaut als Folge einer inadäquaten Reaktion auf verschiedene Aeroallergene.

1.3. Pathoimmunologie atopischer Erkrankungen

Atopische Krankheiten sind Ausdruck einer inadäquat starken Immunantwort auf ein ubiquitäres, eigentlich harmloses Allergen. Um diese gemeinsame Pathoimmunologie besser verstehen zu können, werden im Folgenden zunächst die physiologischen Reaktionen auf einen immunologischen Reiz dargestellt; diese umfassen eine unspezifische und eine allergen-spezifische Immunantwort und werden durch verschiedene Zellen des Immunsystems vermittelt.

1.3.1. Die Sensibilisierung gegenüber Aeroallergenen

Dem allergischen Asthma liegt eine Sensibilisierung zumeist gegen ein inhalatives Allergen zugrunde: Ein dem Immunsystem unbekannter Stoff (in diesem Fall ein Aeroallergen) wird zuerst von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen – Zellen des angeborenen unspezifischen Immunsystems – phagozytiert und intrazellulär durch reaktive Sauerstoffradikale oder Enzyme zerlegt.²⁴

Hierauf wird das sogenannte prozessierte Allergen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen – dieses sind in erster Linie Makrophagen und dendritische Zellen – vor allem den T-Helferzellen mit dem Oberflächenantigen *Cluster of differentiation 4* (CD4⁺ T-Zellen) präsentiert. Diese reagieren durch den Erstkontakt mit dem Allergen B-Zellen zur Produktion spezifischer IgE-Antikörper gegen das Allergen an, welche aus den B-Zellen freigesetzt werden und an die Oberfläche der Mastzellen binden. Kommt es nach dieser Sensibilisierung zu einem erneuten Kontakt mit dem Allergen, bindet dieses unter anderem an die IgE-Antikörper auf der Mastzelle, führt zur Quervernetzung der IgE-Antikörper untereinander und trägt durch die anschließende Degranulation der Mastzellen maßgeblich zur allergischen Reaktion bei (siehe 1.3.4.).²⁵

Die allergenspezifischen Reaktionen aller T-Lymphozyten auf den durch Makrophagen oder dendritische Zellen vermittelten Antigenkontakt werden unter 1.3.3. dargestellt.

1.3.2. Die unspezifische Immunreaktion gegenüber Allergenen

Neben ihren unter 1.3.1. beschriebenen Funktionen tragen antigenpräsentierende oder phagozytierende Zellen (dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen bzw. Monozyten, die inaktive Form der Makrophagen im Blut) durch die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine – wie dem Monozyten-chemotaktischen Protein 1 (MCP-1), dem Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und den Interleukinen (IL) IL-8, IL-12 und IL-15 – zur Aufrechterhaltung der allergenunspezifischen Immunantwort bei.^{24,26,27}

Hierbei ist IL-15 besonders interessant, da es diese genannten antigenpräsentierenden oder phagozytierenden Zellen und weitere an der unspezifischen Immunantwort beteiligte Zellen in ihrer Reifung und Funktion beeinflusst: durch eine beschleunigte Antigenpräsentation auf allen diesen Zellen und durch eine verstärkte Expression weiterer kostimulierender Moleküle bedingt IL-15 die Proliferation und Aktivierung weiterer Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort (wie NK-Zellen und T-Zellen, siehe unten). Die dendritischen Zellen werden durch IL-15 sowohl in ihrer Reifung als auch Differenzierung als auch in ihrer Sekretion proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β und IL-15 selbst) gefördert, die Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 wird gehemmt.²⁷ Zudem wirkt IL-15 auf dendritische Zellen sowie auf neutrophile Granulozyten antiapoptotisch.²⁶ IL-15 steigert desweiteren sowohl die phagozytische als auch die sekretorische Funktion der neutrophilen Granulozyten²⁶, stimuliert Monozyten zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-8 und MCP-1 und steigert die phagozytische Aktivität der Makrophagen^{24,26,28}. IL-8, das sowohl von neutrophilen Granulozyten wie auch Monozyten sezerniert wird, bewirkt die Chemotaxis weiterer neutrophiler Granulozyten und fördert deren Degranulation am Entzündungsherd.²⁴

Zeitgleich zu der unter 1.3.1. beschriebenen Aktivierung des erworbenen Immunsystems über antigenpräsentierende Zellen und der Phagozytose von Pathogenen zeigen vor allem Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine allergenunspezifische toxische Reaktion gegen den unbekannten Stoff. Ohne eine Notwendigkeit der Aktivierung zerstören diese Zellen durch die Freisetzung zytolytischer und zytotoxischer Stoffe mit dem Pathogen infizierte Zellen und sezernieren zeitgleich – in dieser sehr frühen Phase der allergenunspezifischen Immunantwort – verschiedene proinflammatorische und immunmodulatorische Zytokine wie TNF- α , den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Interferon γ (IFN- γ). Besonders für die Ausbildung der zytolytischen Wirkung sowie für die Proliferation dieser Zellen ist IL-15 obligat. Zudem steigert dieses proinflammatorische Zytokin die zytotoxische und zytokinsekretorische Wirkung dieser Zellen (siehe 1.4.4.).

Da Studien im Blut von Asthmapatienten sowohl eine erhöhte Anzahl als auch eine erhöhte Aktivität der NK-Zellen nachweisen konnten, scheinen diese Mechanismen auch bei atopischen Erkrankungen zur Geltung zu kommen.²⁹

1.3.3. Die Rolle der T-Lymphozyten in der Immunantwort

In der Reifung der T-Lymphozyten entstehen drei verschiedene Subpopulationen: sogenannte T-Helferzellen mit dem Oberflächenantigen *Cluster of differentiation 4* (CD4⁺ T-Zellen), zytotoxische T-Zellen mit dem Oberflächenantigen *Cluster of differentiation 8* (CD8⁺ T-Zellen) und T-Zellen, die CD4⁺ und / oder CD8⁺ sein können, aber im Gegensatz zu den beiden anderen Subpopulationen statt einem T-Zell-Rezeptor aus einer Kette vom Typ α und einer vom Typ β einen Rezeptor aus einer Kette vom Typ γ und einer vom Typ δ tragen (γδ T-Zellen, siehe 1.3.5.). Sowohl eine Stimulation der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellen bedingt eine Differenzierung dieser Zellen in Effektor- und Gedächtniszellen.

Wird eine CD8⁺ T-Zelle durch den Kontakt mit einem Antigen aktiviert, induziert sie – ähnlich wie die NK-Zellen (siehe 1.3.2.) – über die Sekretion zytolytischer und zytotoxischer Zytokine die Apoptose der Zelle, die das Antigen präsentiert hat. Zeitgleich wird diese aktivierte CD8⁺ T-Zelle unter Mitwirkung der Interleukine IL-2 und IL-15 in ihrem Wachstum und ihrer Teilung gefördert.³⁰ Die so klonierten T-Zellen detektieren weitere das jeweilige Antigen präsentierende Zellen und vermitteln deren Apoptose. Neben dieser zytotoxischen Wirkung besitzen CD8⁺ T-Zellen auch eine sekretorische Funktion: je nach sezernierten Zytokinen werden wie bei den CD4⁺ T-Zellen dabei CD8⁺-Subpopulation vom Typ I und Typ II unterschieden. Tc₁-Zellen sezernieren – ähnlich wie die NK-Zellen (siehe 1.3.2.) – vorwiegend IFN-γ, während Tc₂-Zellen durch die Sekretion von IL-5 und anderen proinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet sind.^{31,32}

IL-15 wirkt auf diese CD8⁺ T-Zellen direkt chemotaktisch, bedingt somit deren Infiltration in einen Entzündungsherd und fördert dort dann die lokale Aktivierung und die Proliferation von naiven CD8⁺ T-Zellen sowie von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Zudem wird über eine IL-15-vermittelte Hemmung der Apoptose dieser Zellen ihre zytotoxische und sekretorische Wirkung nochmals verstärkt. Diese verschiedenen Einflüsse von IL-15 auf die CD8⁺ T-Zellen sind unter 1.4.3. genauer dargestellt.

Je nach Stimulus differenzieren sich CD4⁺ T-Zellen in Th₁- oder Th₂-Zellen, wobei IL-12 die Differenzierung in Th₁-Zellen und IL-4 die in Th₂-Zellen fördert. Bei einer Th₁-gerichteten Immunantwort, die physiologischerweise bei den meisten Infektionen auftritt, vermitteln von den Th₁-Zellen sezernierte Zytokine – vor allem IFN-γ, TNF-α und IL-2 – die Elimination des Antigens, indem sie B-Zellen zur Produktion spezifischer Immunglobuline (vorwiegend der

Klassen IgM und IgG), phagozytierende Zellen zur Phagozytose und CD8⁺ T-Zellen zur zytotoxischen Aktivität anregen.

Bei einer parasitären Infektion dagegen differenzieren sich die T-Helferzellen eher zu Th₂-Zellen und stimulieren durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 die Degranulation eosinophiler Granulozyten und die IgE-Produktion der B-Zellen.

Ähnlich wie bei den CD8⁺ T-Zellen werden auch die CD4⁺ T-Zellen durch IL-15 chemotaktisch angezogen und in ihrer Apoptose gehemmt. Ein Einfluss von IL-15 auf die Proliferation und Aktivierung dieser Zellen wird kontrovers diskutiert. Niedbala et al. zeigten aber, dass IL-15 *in vivo* sowohl auf die T₁-abhängige IFN-γ-Produktion als auch auf die T₂-abhängige IL-5-Produktion kostimulierend wirkt.³² Die genaueren Einflüsse von IL-15 auf die CD4⁺ T-Zellen werden unter 1.4.3. detaillierter dargestellt.

Wie unter 1.3.1. beschrieben, initiieren CD4⁺ T-Zellen bei einem Erstkontakt mit einem Allergen zunächst die IgE-Sekretion der B-Zellen. Neben der dort dargestellten Degranulation der IgE-besetzten Mastzellen kommt es bei einem Zweitkontakt zur erneuten Antigenpräsentation gegenüber den CD4⁺ T-Zellen: im Gegensatz zu den naiven CD4⁺ T-Zellen der Erstreaktion erkennen diese das Antigen und können allergenspezifische B-Gedächtniszellen aktivieren und bedingen damit die weitere Sekretion spezifischer IgE-Antikörper.²⁵ Während gezeigt werden konnte, dass die Proliferation sowie die Immunglobulinproduktion der B-Zellen durch IL-15 ebenfalls beeinflusst werden und dass die Apoptose dieser Zellen durch IL-15 gehemmt wird, wurde ein proliferations- und degranulationsfördernder Einfluss sowie ein antiapoptotischer Effekt von IL-15 auf Mastzellen bisher nur in einzelnen Studien nachgewiesen.²⁶

1.3.4. Das Th₁-Th₂-Paradigma und die allergische Reaktion am Beispiel des allergischen Asthma bronchiale

Wie bereits erwähnt, wird den atopischen Erkrankungen ein gemeinsamer zugrundeliegender immunologischer Pathomechanismus zugeschrieben, der davon ausgeht, dass eine durch ein Allergen ausgelöste Immunantwort inadäquat ausfällt: die Reaktion des Abwehrsystems ist dabei aber nicht nur in ihrer Quantität überschießend, sondern qualitativ auch insofern gestört, dass das Gleichgewicht zwischen einer Th₁-Zell- und einer Th₂-Zell-dominierten Reaktion zugunsten der letzteren verschoben ist. Nach diesem sogenannten Th₁-Th₂-Paradigma differenzieren sich naive T-Zellen aufgrund eines Reizes kaum in IFN-γ- und TNF-α-produzierende Th₁-Zellen sondern vorwiegend in Th₂-Zellen, welche aufgrund dieses Stimulus vor allem die Interleukine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 sezernieren.^{33,34,35}

Während IL-5 direkt eosinophile Granulozyten rekrutiert und aktiviert, vermitteln IL-4 und IL-13 über die Produktion von allergenspezifischem IgE durch B-Zellen die Degranulation von

basophilen Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen³⁶: aus den Granula dieser Entzündungszellen wird neben Proteasen, Hydrolasen und Heparin vorwiegend bronchokonstriktorisch wirkendes Histamin freigesetzt.^{37,38,39}

Die erwähnte, durch IL-5 und andere Faktoren (IL-3, IL-8, GM-CSF, Komplementfaktoren) vermittelte Aktivierung lokaler eosinphiler Granulozyten bewirkt zunächst vor allem die Sekretion freier Sauerstoffradikale und zytotoxischer Proteine, welche durch die Zerstörung des Atemwegsepithels neben einer gesteigerten Sekretion aus den zerstörten Zellen die bronchiale Hyperreagibilität bedingen; diese geht mit einer verstärkten vagal vermittelten reflektorischen Bronchokonstriktion einher und verursacht mit dieser zusammen den Bronchospasmus. Diese Mediatoren stimulieren zudem die oben dargestellte Histaminfreisetzung aus den basophilen Granulozyten und den Mastzellen.⁴⁰

Aus den Zellmembranen aller erwähnten Entzündungszellen (Mastzellen, Makrophagen basophile und eosinophile Granulozyten) freigesetzte Prostaglandine, Leukotriene und der plättchenaktivierende Faktor (PAF) wirken – noch stärker als Histamin – bronchokonstriktorisch und stimulieren sowohl die Schleimsekretion als auch die Migration vor allem von eosinophilen und – zur Phagozytose fähigen – neutrophilen Granulozyten in den Entzündungsherd; diese inflammatorische Infiltration wird aufgrund der ebenfalls durch diese Mediatoren erhöhten vaskulären Permeabilität zusätzlich erleichtert.⁴⁰

Zusammenfassend vermitteln die entweder aus den Granula der genannten Entzündungszellen oder aus deren Zellwänden freigesetzten Zytokine die akute asthmatische Sofortreaktion, die vorwiegend aus Bronchospasmus, Schleimhypersekretion und Schleimhautödem besteht und sich klinisch unter den in 1.1.2. beschriebenen Symptomen der endobronchialen Obstruktion äußert. Durch die chemotaktisch vermittelte Infiltration weiterer Zellen (vor allem eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Mastzellen und Thrombozyten) werden die Symptome aufrechterhalten.^{39,40}

Nach einigen Stunden können sich die Mastzellen reaktivieren und durch eine erneute Ausschüttung von Leukotrienen und Zytokinen die asthmatische Spätreaktion mit einer erneuten Bronchokonstriktion vermitteln: die wiederholte Migration von Granulozyten und Lymphozyten in die Bronchialwände und das Lungengewebe bedingt über die Sekretion weiterer proliferationsfördernder, proinflammatorischer und chemotaktischer Mediatoren eine chronische Entzündung, aus welcher langfristig der strukturelle Umbau der Atemwege resultieren kann.^{39,40,41}

Außerdem können die aus den infiltrierten Entzündungszellen freigesetzten Mediatoren durch die Schädigung des respiratorischen Epithels eine auch im anfallsfreien Intervall erhöhte Empfindlichkeit der vagalen Schleimhautrezeptoren induzieren und damit eine

bronchiale Hyperreagibilität auf unspezifische Reize wie virale Atemwegsinfekte, Ozon, kalte Luft und Staub ohne weitere begleitende asthmatische Symptome hervorrufen.⁴²

1.3.5. Die Rolle von NKT- und $\gamma\delta$ T-Zellen in der allergischen Pathoimmunologie

Neben dem Einfluss der unspezifischen und der spezifischen Immunreaktion auf die Entstehung des Asthmas muss ferner berücksichtigt werden, dass das unter 1.3.4. beschriebene Th₁-Th₂-Paradigma eine sehr vereinfachte Darstellung der allergischen Pathogenese ist – beispielsweise zeigen nicht alle Astmatiker eine Produktion von spezifischem IgE – und nicht als alleiniger pathoimmunologischer Mechanismus betrachtet werden darf. Insbesondere Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) und $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen in diesem atopischen Kontext eine größere Rolle zu spielen als bisher vermutet.

NKT-Zellen sind eine eher seltene Subpopulation von Lymphozyten, die sowohl T-Zell- als auch NK-Zell-Eigenschaften aufweisen und die durch Kontakt mit Glykolipiden, die beispielsweise in Pollen enthalten sein können, aktiviert werden. Neben ihrer schon länger bekannten Fähigkeit, die Aktivierung des Immunsystems durch eine schnelle Sekretion von regulatorischen Zytokinen (unter anderem IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α , GM-CSF) zu fördern – von NKT-Zellen sezerniertes IFN- γ begünstigt beispielsweise die Differenzierung in CD4⁺ Th₁-Zellen – zeigen neuere Daten, dass diese NKT-Zellen auch unabhängig von CD4⁺ T-Zellen und eosinophilen Granulozyten eine bronchiale Hyperreagibilität und eine Entzündungsreaktion der Atemwege – Kardinalsymptome des Asthmas – auslösen können.⁴³

Hierbei werden sowohl die Proliferation als auch die funktionelle Reifung dieser Zellen stark durch IL-15 beeinflusst (siehe 1.4.4.).^{27,44}

Erst vor einigen Jahren wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen entdeckt: obwohl ein Anstieg dieser Zellen unter anderem in den Atemwegsepithelien von Asthmapatienten nachgewiesen werden konnte und nach verschiedenen Studien eine Beteiligung sowohl in der Entstehung als auch der Aufrechterhaltung einer allergischen Entzündung sehr wahrscheinlich scheint, ist die genaue Rolle dieser Zellen in der Pathoimmunologie atopischer Erkrankungen bisher weitgehend unklar: da diese Zellen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte zeigen, erlangen sie vermutlich je nach Stimulus und Entzündungsmodalität entweder Th₁- oder Th₂-gerichtete immunologische Eigenschaften und können dann – scheinbar auch unabhängig von $\alpha\beta$ T-Zellen – allergische Entzündungsreaktionen modulieren. So konnte gezeigt werden, dass unter anderem das proinflammatorische IL-15 ihre Proliferation fördert. Da die $\gamma\delta$ T-Zellen – wie Zellen der angeborenen Immunität, aber im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen – mit unprozessierten Antigenen reagieren, zeigen sie eine schnellere, aber

schwächere Immunantwort als $\alpha\beta$ T-Zellen, sodass Reaktionen von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen sich eventuell auch gegenseitig ergänzen können.^{45,46}

1.3.6. Pathoimmunologische Besonderheiten der atopischen Dermatitis

Die molekularbiologische Pathophysiologie der akuten Phase des atopischen Ekzems ist ähnlich der eines Asthmaanfalls: in die Haut infiltrierte Th₂-Lymphozyten sezernieren vorwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13. IL-4 und IL-13 bedingen durch eine gesteigerte IgE-Produktion seitens der B-Zellen eine allergische Sensibilisierung und führen zu einer Infiltration weiterer Entzündungszellen in die Haut⁴⁷: durch die gesteigerte IgE-Produktion der B-Zellen werden vermehrt Mediatoren (vor allem Histamin, Prostaglandine, Leukotriene; siehe 1.3.4.) aus den Mastzellen, aber auch aus den basophilen Granulozyten freigesetzt, welche wiederum die vaskulären Permeabilität erhöhen und die Chemotaxis von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten anregen.⁴⁰ Das ebenfalls von den Th₂-Lymphozyten sezernierte IL-5 vermittelt dabei direkt die Rekrutierung und Aktivierung eosinphiler Granulozyten.⁴⁰

Das aus den infiltrierten Th₂-Lymphozyten freigesetzte IL-4 führt in der Haut zudem zu einer gesteigerten Expression des IgE-Rezeptors auf verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen – hierbei vor allem auf den Langerhans-Zellen (Makrophagen der Haut) und auf einer Subpopulation der dendritischen Zellen (inflammatorische dendritische epidermale Zellen IDEC).⁴⁸ Wie bereits unter 1.3.2. gezeigt, werden diese antigenpräsentierenden Zellen durch IL-15 in ihrer Proliferation und Funktion beeinflusst.

IgE-tragende dendritische Zellen binden Allergene in der Haut, werden dadurch aktiviert und präsentieren das prozessierte Antigen den T-Lymphozyten in den regionalen Lymphknoten. Diese differenzieren daraufhin zu Th₂-Zellen, wandern – durch IL-15 chemotaktisch angezogen – zum Entzündungsherd und lösen dort eine zelluläre Immunreaktion vom Spättyp aus, die sich klinisch in den ekzematösen Hautveränderungen zeigt.⁴⁹

Durch Fibroblasten, Keratinozyten und dermale Epithelzellen lokal sezerniertes IL-15 wirkt zusätzlich chemotaktisch und proliferationsfördernd auf die T-Lymphozyten und kostimuliert sowohl die Proliferation als auch die Immunglobulinproduktion der B-Zellen. Zudem wirkt IL-15 auf die lokalen IL-15-sezernierenden Zellen antiapoptotisch, auf die Keratinozyten zusätzlich proliferationsfördernd.²⁶

Zusammenfassend ist das atopische Ekzem im Unterschied zu den anderen atopischen Erkrankungen also nicht nur eine allergische Manifestation des Typ I, sondern äußert sich klinisch als Kombination einer Typ I- und Typ IV-Reaktion.

Die infiltrierten eosinophilen Granulozyten und die IDEC-Subpopulation der dendritischen Zellen scheinen dabei in der Folge einen biphasischen Krankheitsverlauf mit einem Wechsel

von einer Th₂- zu einer Th₁-dominierten Immunantwort zu begünstigen: Th₁-Zellen sezernieren verschiedene Zytokine, die wachstumsfördernd, chemotaktisch, aktivierend (vor allem IFN-γ) und wirkungsverstärkend (vor allem TNF-α) auf Monozyten bzw. Makrophagen wirken. IFN-γ führt – durch die Makrophagen-aktivierende Wirkung und eine damit verbundene Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen – zusammen mit TNF-β zu einer chronischen Entzündungsreaktion, aus welcher der letztendliche Gewebsuntergang und damit die strukturellen Veränderungen der atopischen Haut resultieren können.²⁰

Da die atopische Dermatitis im Kindesalter sehr häufig mit Nahrungsmittelallergien assoziiert ist²⁰ und – analog zu dem gehäuften Vorkommen von γδ T-Zellen im Atemwegsepithel von Asthmapatienten – bei Kindern mit einer solchen Nahrungsmittelallergie ein Anstieg dieser γδ T-Zellen im Verband der intestinalen intraepithelialen Lymphozyten im Darmepithel gezeigt werden konnte, erscheinen diese Zellen auch bezüglich der Entstehung und Unterhaltung der atopischen Dermatitis relevant.⁵⁰

Neben den beschriebenen Störungen der Immunmodulation, der daraus entstehenden chronischen ekzematösen Entzündungsreaktion und dem mediatorvermittelten Juckreiz liegt beim atopischen Ekzem zudem eine durch eine veränderte Lipidzusammensetzung des *Stratum corneum* bedingte Barrierestörung der Haut vor, welche sich klinisch in einem sehr trockenen, sogenannten sebostatischen Hautbild und einer erhöhten Reizbarkeit der Haut durch verschiedene Provokationsfaktoren zeigt. Hierbei kann eine durch psychische Faktoren wie Stress bedingte Ekzemexazerbation durch eine mögliche Kopplung zwischen dem Immun- und dem Nervensystem über verschiedene Neuropeptide erklärt werden.^{20,21}

1.4. Funktion und Interaktion von IL-15, IL-15Rα und STAT-1

Durch die Erforschung der Pathoimmunologie atopischer Erkrankungen konnte einzelnen Zytokinen bereits eine konkrete Funktion bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der atopischen Erkrankungen zugewiesen werden (beispielsweise IL-4, IL-5 und IL-13; siehe 1.3.4.). Für andere Zytokine wie beispielsweise IL-15 sind die molekulargenetischen Details dieser inadäquaten Immunantwort zu großen Teilen weiterhin unklar.

IL-15 wird als ubiquitär vorkommendes Zytokin von vielen Zellen produziert. Im Rahmen der Pathoimmunologie atopischer Erkrankungen ist seine proinflammatorische Wirkungsweise vordergründig. Wie bereits unter 1.3. ansatzweise dargestellt, wirkt es auf viele an den unterschiedlichen Immunreaktionen beteiligte Zellen chemotaktisch und bedingt dadurch deren Infiltration in den Entzündungsherd, beeinflusst diese Zellen sowohl in ihrer Proliferation als auch in ihrer funktionellen Reifung und fördert sie zudem in der Ausführung der unterschiedlichen Funktionen (vor allem Phagozytose, Zytokinsekretion und Zytotoxizität). Bezuglich der Proliferation scheinen vor allem γδ T-Zellen, NK-, NKT-Zellen

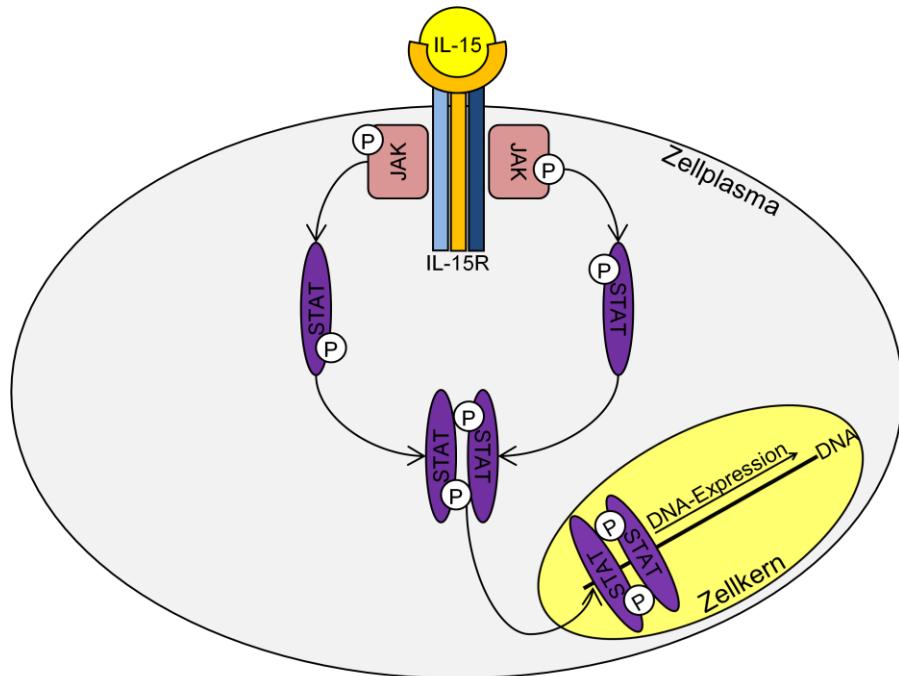
und CD8⁺ T-Zellen stark IL-15-abhängig zu sein, wohingegen lediglich geringe Einflüsse des Zytokins auf die Vermehrung von CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden konnten. Durch die zusätzliche antiapoptotische Wirkung auf viele dieser Zellen ermöglicht IL-15 außerdem deren Persistenz im entzündlichen Gewebe und trägt somit über viele Wege zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündung bei.

Im Gegensatz zu anderen Zytokinen besitzt IL-15 also keine universelle Aufgabe im Rahmen der Immunantwort sondern ist vielmehr an der quantitativen Regulation von zahlreichen immunologischen Reaktionen beteiligt. Wie unter 1.4.2. näher beschrieben, kann es dabei sowohl frei als Zytokin agieren als auch in die Membran integriert sein und Rezeptorfunktionen aufweisen.

Der Signalweg von IL-15 und der detaillierte Einfluss des Zytokins auf verschiedene Zellen des Immunsystems werden auf den nächsten Seiten dargestellt.

1.4.1. Übersicht über den IL-15-Signalweg

Viele der Effekte von IL-15 auf die unterschiedlichen Zellen werden durch eine Bindung an den IL-15-Rezeptor (IL-15R) und einen nachgeschalteten Signaltransduktionsweg übermittelt (siehe Abbildung 1.1). IL-15R besteht aus drei Ketten: Während die β- und die γ-Kette auch Elemente anderer Rezeptoren sind – sie kommen beide auch im IL-2 Rezeptor, die γ-Kette zudem in einer ganzen Familie von Rezeptoren vor – ist die α-Kette (IL-15Ra) spezifisch für diesen Rezeptor und verhält sich hochaffin gegenüber IL-15.³¹ Die Bindung von IL-15 an den in die Zellmembran integrierten IL-15R löst die Bindung und Aktivierung von Januskinasen, vorwiegend vom Typ 1 und 3 (JAK-1 / JAK-3), an den intrazellulären Domänen der IL-2Rβ- und γc-Ketten aus. Die aktivierte Januskinasen vermitteln wiederum die Aktivierung und damit verbundene Zellkernmigration von Faktoren aus der Familie der *signal transducer and activator of transcription* (STAT), die das Signal in den Kern übertragen und dadurch die Transkription von Genen modulieren können. Bei der Signaltransduktion über Rezeptoren mit einer IL-2Rβ- und γc-Ketten (das heißt IL-2R und IL-15R) werden hierbei vorwiegend STAT-3 und STAT-5 durch Phosphorylierung zur Ausbildung von Dimeren angeregt. Die hierdurch aktivierte STAT-Dimere können anschließend die Zellkernmembran passieren und an DNA-Stellen binden, die die Transkription von verschiedenen Genen aktivieren.^{26,31} Zudem kann auch eine Bindung von IL-15 an den IL-15R neben einer Aktivierung von STAT-3 und STAT-5 zu einer solchen von STAT-1 führen.^{51,52}

Abb. 1.1 Interaktion von IL-15, IL-15R und den STATs

1.4.2. Vorkommen von IL-15

IL-15 wird von vielen Zellen des Körpers produziert: hierzu zählen Zellen der Skelettmuskulatur, der Nieren, der Leber, der Lungen, des Herzens, der Plazenta sowie verschiedene Epithelzellen, Fibroblasten und Monozyten.^{53,54,55}

Im Rahmen des Verständnisses von molekulargenetischen Reaktionen und Interaktionen bei Asthma und anderen atopischen Erkrankungen scheint die IL-15-Sekretion von Makrophagen bzw. Monozyten, von dendritischen Zellen, Fibroblasten und Haut- sowie bronchialen Epithelzellen^{27,28,32,56} von besonderer Bedeutung zu sein. Obwohl T-Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation, ihrer Differenzierung und Aktivierung durch IL-15 stark beeinflusst werden (siehe 1.4.3.), exprimieren diese T-Zellen selbst nur geringe Mengen IL-15.²⁶

IL-15 zeigt im immunologischen Kontext vorwiegend proinflammatorische Effekte (siehe 1.4.3. bis 1.4.7.) und wird daher meist aufgrund eines mikrobiellen Stimulus exprimiert: als ein solcher Stimulus wirken Lipopolysaccharide (LPS; als Antigen wirkende Bestandteile von Bakterienmembranen) sowie die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α (gezeigt anhand der IL-15-Expression in bronchialen Epithelzellen⁵⁶ und in Monozyten^{54,55}); hierbei zeigte eine Stimulation mit IFN- γ den stärksten Effekt auf die IL-15-Expression.⁵⁶ Des Weiteren zeigten eine UVB-Exposition und eine Infektion mit dem Herpes-Virus 6 eine ähnlich erhöhte IL-15-Expression in Keratinozyten bzw. Monozyten.⁵³

Wird IL-15 produziert, muss dieses nicht unbedingt eine Sekretion des Zytokins zur Folge haben: so konnte gezeigt werden, dass in Monozyten exprimierte IL-15 nicht immer

zwangsläufig sezerniert wird, sondern auch in einer direkt in die Zellmembran integrierten, nachgewiesen biologisch aktiven und durch IFN- γ induzierbaren Form vorliegen kann.²⁸ Zudem zeigten Ge et al., dass zwar einige proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ sowie LPS die IL-15-Expression in bronchialen Epithelzellen stimulieren, die IL-15-Synthese und -Sekretion dieser Zellen konnte jedoch nur durch IFN- γ gesteigert werden.⁵⁶ Von IL-15 existieren zwei Protein-Isoformen, die aus zwei unterschiedlichen prä-mRNA-Isoformen entstehen (zur Proteinbiosynthese siehe 1.5.1.): das IL-15, das aus der kürzeren prä-mRNA gebildet wird, scheint eher intrazellulär im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert zu sein, wohingegen das Zytokin aus der längeren prä-mRNA eher im Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und in Endosomen nachgewiesen werden konnte und bei Bedarf sezerniert werden kann.^{26,28}

1.4.3. Effekte von IL-15 auf T-Lymphozyten

Ähnlich wie IL-2, mit dem es aufgrund ähnlicher Rezeptorstrukturen (siehe 1.4.1.) einen gewissen Verwandtschaftsgrad aufzeigt, wirkt IL-15 chemotaktisch auf alle T-Lymphozyten und begünstigt damit ihre Infiltration in das entzündliche Gewebe.^{32,57,58} Beim Asthma vermittelt das von bronchialen Epithelzellen sezernierte IL-15 somit direkt die Interaktion der bronchialen Schleimhaut mit den T-Lymphozyten. IL-15 fördert außerdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die lokale Aktivierung und Proliferation vor allem der CD8 $^{+}$ Gedächtnis-T-Zellen, aber – in schwächerem Ausmaß – auch die der naiven CD8 $^{+}$ T-Zellen. Die gesteigerte Aktivität der Zellen zeigt sich sowohl in einer erhöhten zytotoxischen als auch zytokinsekretorischen Wirkung.^{32,44,57} Zudem konnte eine IL-15-vermittelte Hemmung der Apoptose dieser Zellen nachgewiesen werden.⁵⁹

Während die beschriebenen Wirkungen von IL-15, vor allem diejenigen auf die CD8 $^{+}$ Gedächtnis-T-Zellen, in mehreren Studien bestätigt werden konnten, werden ähnliche Effekte auf CD4 $^{+}$ T-Zellen kontrovers diskutiert: Im Gegensatz zu manchen Studien, in denen weder einen Einfluss von IL-15 auf die Proliferation noch auf die Aktivierung oder Funktion der CD4 $^{+}$ T-Zellen festgestellt werden konnte, sondern dem IL-15 lediglich ein antiapoptotischer Effekt auf bereits aktivierte CD4 $^{+}$ T-Gedächtniszellen zugestanden wurde (siehe 1.4.8.)^{27,44,57}, zeigten Niedbala et al. bei hohen IL-15-Konzentrationen *in vitro* einen positiven Effekt auf die Proliferation sowohl von naiven CD4 $^{+}$ T-Zellen als auch von CD4 $^{+}$ Gedächtnis-T-Zellen, wobei dieser Effekt sowohl in CD4 $^{+}$ T-Zellen vom Typ 1 und vom Typ 2 nachweisbar waren. Zudem stellten Niedbala et al. *in vivo* sowohl unter den CD4 $^{+}$ als auch unter den CD8 $^{+}$ T-Zellen eine kostimulierende Wirkung von IL-15 auf die T₁-abhängige IFN- γ -Produktion (zusammen mit IL-12) und die T₂-abhängige IL-5-Produktion (zusammen mit IL-4) dar.³² Da die beschriebenen Effekte von IL-15 auf die Proliferation und die

Zytokinsekretion der CD4⁺ T-Zellen erst in höheren Dosen gezeigt werden konnten, scheint der Unterschied in der Wirkung von IL-15 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eher quantitativ als absolut zu sein.³²

1.4.4. Effekte von IL-15 auf NK- und NKT-Zellen

Neben den beschriebenen Effekten auf T-Lymphozyten beeinflusst IL-15 vor allem NK- und NKT-Zellen: hierbei ist das Interleukin sowohl für die Entwicklung als auch für die Ausbreitung dieser Zellen essentiell und fördert das Wachstum der NK-Zellen.^{27,44} Besonders bei der späten Zellreifung und der Ausbildung der zytolytischen Wirkung der NK-Zellen konnte dem IL-15 eine obligate Rolle zugeschrieben werden. Von ähnlicher Wichtigkeit scheint IL-15 sowohl für die funktionelle Reifung als auch für das Überleben der NKT-Zellen zu sein.⁴⁴

Auch wenn, wie unter 1.3.2. erwähnt, keine Aktivierung der NK-Zellen nötig ist, kann die zytotoxische und sekretorische Aktivität durch IL-15 und andere Zytokine sowie Interferone gesteigert werden.³¹

1.4.5. Effekte von IL-15 auf neutrophile Granulozyten

Da neben den beschriebenen Effekten auf CD8⁺ T- und NK-Zellen (siehe 1.4.3. und 1.4.4.) dem IL-15 zusätzlich eine Bedeutsamkeit bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zugewiesen wurde, konnte eine Wirkung dieses Zytokins in den frühen Schritten des angeborenen Immunsystems bei der Reaktion auf Pathogene bestätigt werden. Im Rahmen dieser Aktivierung verstärkt IL-15 einerseits die phagozytische Aktivität der neutrophilen Granulozyten^{26,60} und stimuliert andererseits die Sekretion von IL-8, IL-12 und TNF- α ^{24,26,28}. Durch die chemotaktische und degranulationsfördernde Wirkung von IL-8 auf die neutrophilen Granulozyten wird deren antimikrobielle Aktivität zusätzlich stimuliert.²⁴

1.4.6. Effekte von IL-15 auf dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen

Von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniertes IL-15 beeinflusst neben den T-Zellen auch diese sezernierenden Zellen selbst. Die dendritischen Zellen werden durch IL-15 sowohl in ihrer Reifung und Differenzierung als auch in ihrer Aktivität gefördert²⁷: im Sinne einer positiven Rückmeldung steigert das proinflammatorische IL-15 seine eigene Sekretion sowie die anderer entzündungsfördernder Zytokine wie IL-1 β und TNF- α aus den dendritischen Zellen, während es die Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 senkt.²⁷ Da IL-15 zudem die Antigenpräsentation auf antigenpräsentierenden Zellen wie den

dendritischen Zellen beschleunigt und die Expression kostimulierender Moleküle fördert, erhöht es die Proliferation der CD4⁺ und der CD8⁺ T-Zellen und stimuliert sowohl die Proliferation als auch die Aktivierung der NK-Zellen.^{26,27} Zusammenfassend scheint IL-15 durch die stärkere Expression kostimulierender Moleküle auf den antigenpräsentierenden Zellen, durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine aus den dendritischen Zellen und durch eine gesteigerte Antigenpräsentation die Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Zellen maßgeblich zu beeinflussen und zu optimieren und initiiert damit entscheidend eine adäquate T-Zell-abhängige allergenspezifische Immunreaktion.²⁷ Eine Notwendigkeit dieser IL-15-vermittelten Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den CD8⁺ T-Zellen wird bei der Th₁-dominierten allergischen Reaktion vom Spättyp, die beispielsweise im Rahmen einer atopischen Dermatitis auftreten kann (siehe 1.3.6.), vermutet.²⁶

Wie bei den neutrophilen Granulozyten (siehe 1.4.5.), löst eine Stimulation von Monozyten mit IL-15 eine Sekretion von IL-8, das auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkt, aus und vermittelt zudem die Sekretion von weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF-α und MCP-1.^{24,26,28} Diese Stimulierung erfolgt bei den Monozyten wahrscheinlich vorwiegend über in die Zellmembran integriertes IL-15 (siehe 1.4.2.), das folglich in dieser Form neben seiner sonst üblichen Funktion als Ligand auch Rezeptoreigenschaften zeigt und bei Stimulation über verschiedene Signalwege nicht nur die Zytokinsekretion der Monozyten sondern auch ihren Austritt aus der Blutbahn vermittelt.²⁶ Sobald sich im Gewebe dann die Monozyten in Makrophagen umgewandelt haben, wird deren Phagozytosefähigkeit durch IL-15 ebenfalls gesteigert.^{24,26,28}

1.4.7. Effekte von IL-15 auf weitere Zellen des Immunsystems und auf Zellen in der Haut

Während – wie bei den T-Lymphozyten, den NK- und NKT-Zellen und den dendritischen Zellen – auch eine proliferationsfördernde Wirkung von IL-15 auf T-Zell-Klone und γδ T-Zellen^{32,44} und eine IL-15-vermittelte Kostimulation sowohl des Wachstums als auch der Immunglobulinproduktion von B-Zellen^{24,26,28} gezeigt wurden, konnten wachstumsfördernde Effekte auf Mastzellen nur bei hohen IL-15-Konzentrationen *in vitro* gezeigt und nicht in allen Studien bestätigt werden^{26,44}. An Mäuse-Mastzellen konnte eine durch IL-15 induzierte IL-4-Produktion nachgewiesen werden.²⁶

Wie bereits unter 1.4.2. erwähnt, exprimieren Fibroblasten, Keratinozyten und andere dermale Epithelzellen ebenfalls IL-15. Dieses wirkt vorwiegend lokal und vermittelt neben der Hemmung der Apoptose dieser Zellen (siehe auch 1.4.8.) auch die Proliferation aktiver lokaler T-Zellen und die der Keratinozyten.²⁶

1.4.8. Antiapoptotische Wirkung von IL-15

Neben den beschriebenen chemotaktischen, proliferations- und aktivitätsfördernden Effekten auf zahlreiche Zellen des Immunsystems und Zellen in der Haut trägt IL-15 wesentlich zur Hemmung der Apoptose vieler dieser Zellen bei. So konnte gezeigt werden, dass IL-15 die Apoptose von Fibroblasten, Keratinozyten, verschiedenen Epithelzellen⁶⁰ sowie von T- und B-Zellen hemmt, wobei der antiapoptotische Effekt des IL-15 auf B- und CD8⁺ T-Zellen höher scheint als der auf CD4⁺ T-Zellen⁵⁹. Auch eine durch IL-15 verzögerte Apoptose von dendritischen Zellen sowie von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten konnte gezeigt werden.^{24,26} Zudem konnte eine Hemmung der Apoptose von Mastzellen durch relativ hohe IL-15-Konzentrationen nachgewiesen werden.²⁶

Auch wenn – im Gegensatz zu vielen anderen Zellen – kein Einfluss von IL-15 auf die Apoptose von NK-Zellen und Makrophagen gezeigt werden konnte, gilt IL-15 als starker genereller Apoptoseinhibitor *in vitro* und *in vivo*.⁵⁹

1.4.9. Die Rolle von IL-15R α bei der IL-15-Signaltransduktion

Wie bereits unter 1.4.1. erwähnt, werden viele der beschriebenen Effekte von IL-15 auf die unterschiedlichen Zellen durch eine Bindung an den IL-15R, der sich aus der hochaffinen IL-15R α -Kette und der IL-2R β - sowie der γ c-Kette zusammensetzt, und einen dem Rezeptor nachgeschalteten JAK-STAT-Signaltransduktionsweg übermittelt (siehe Abb. 1.1).

Da sowohl IL-2R als auch IL-15R die IL-2R β - und γ c-Ketten besitzen und die beiden Rezeptoren trotz der gleichen JAK-STAT-Signaltransduktion unterschiedliche Effekte auf Zellen vermitteln können, scheint der entscheidende Faktor hierbei jedoch die jeweilige α -Kette zu sein.³¹

Neben zahlreichen organspezifischen Zellen in Darm, Gehirn, Leber, Nieren, Skelettmuskulatur, Herz und Lunge wird IL-15R α auch von T-, B-, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und bronchialen Epithelzellen exprimiert, sodass sich ein ähnlich weitgestreutes Verteilungsmuster wie das von IL-15 (siehe 1.4.2.) ergibt.^{24,26,56} Als Stimulus der Expression des IL-15R α dienen ähnliche Faktoren wie bei IL-15 (vor allem IFN- γ , siehe 1.4.2.).²⁸

Als Teil des membranständigen IL-15R enthält IL-15R α eine kurze zytoplasmatische Region (37 Aminosäuren lang) und extrazelluläre Anteile mit einer sogenannten Sushi-Domäne: diese ist ein stark konserviertes, das heißt im Laufe der Evolution wenig verändertes, Motiv, das für die Ligandenbindung essentiell ist und bei IL-15R α die hohe Affinität zu IL-15 bedingt. Zwischen dem intra- und extrazellulären Anteil ist das Protein auf einer Länge von 21 Aminosäuren in die Membran verankert.^{26,31}

Trotz des kurzen zytoplasmatischen Anteils kann IL-15R α auch unabhängig von IL-2R β und γ C Signale durch die Phosphorylierung und damit verbundene Aktivierung von verschiedenen Enzymen vermitteln. So konnte dem IL-15R α beispielsweise eine wesentliche Beteiligung sowohl an der IL-15-vermittelten gesteigerten Phagozytosefähigkeit der neutrophilen Granulozyten als auch an der auf viele Zellen antiapoptotischen Wirkung des IL-15 (siehe 1.4.8.) zugeschrieben werden.^{26,60} Des Weiteren konnte mehrfach gezeigt werden, dass Mäuse, die entweder kein IL-15- oder kein IL-15R α -Gen besitzen, ähnliche Merkmale bezüglich vieler der genannten Angriffspunkte von IL-15 aufweisen und somit die meisten dieser Wirkungen über IL-15R α vermittelt zu werden scheinen.³¹ Durch solche Versuche wurde beispielsweise eine Beteiligung des IL-15R α bei der proliferationsfördernden Wirkung des IL-15 auf die NKT-Zellen und die Keratinozyten nachgewiesen.^{44,60} Mäuse ohne IL-15R α waren zudem hinsichtlich der T-Zell-Differenzierung und dem Erhalt der CD8 $^+$ Gedächtnis-T-Zellen beeinträchtigt.⁴⁴ Des Weiteren wurde durch eine Unterbindung des IL-15R α -Signalwegs die Aktivierung von Th $_2$ -Zellen und damit die Entstehung einer allergischen bronchialen Entzündung, die Migration entzündlicher Zellen und die Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität gehemmt.⁵⁷

Neben der beschriebenen in die Zellmembran integrierten Form kann IL-15R α auch intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat oder sogar in der Kernmembran lokalisiert sein und nach einer dortigen Bindung mit IL-15 Signaltransduktionswege induzieren. Unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen kann IL-15R α proteolytisch aus der Zellmembran freigesetzt werden und als sogenanntes *soluble* IL-15R α (sIL-15R α) entweder in die Zellmembran von Monozyten integriertes IL-15 zur Signaltransduktion stimulieren (Rezeptorfunktion des IL-15, siehe 1.4.6.) oder aber freies IL-15 binden und dessen Bioverfügbarkeit damit reduzieren. Durch eine gezielte Wiederauflösung eines solchen freien IL-15/sIL-15R α -Komplexes kann zudem die Konzentration von IL-15 in einem umschriebenen Gewebe gesteuert werden.²⁶

Zusätzlich zu dem anfangs beschriebenen Signalweg des löslichen IL-15 über den in die Zellmembran integrierten IL-15R kann IL-15 auch an eine Zelle gebunden sein und so die in der Nähe lokalisierten Zellen beeinflussen (sogenannter juxtakriner Signalweg). Inwiefern die hochaffine IL-15R α -Kette an diesem juxtakrinen Signalweg mitwirken kann, wird im Folgenden aufgezeigt:

Wie unter 1.4.2. beschrieben, weisen aktivierte Monozyten eine membranständige Form des IL-15 auf. Diese alleinige Persistenz des IL-15 entsteht wahrscheinlich durch einen endosomalen Verdau des IL-15/IL-15R α Komplexes auf der Zellmembran dieser Zellen, für welchen die zytoplasmatische Domäne des IL-15R α eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Dieses membranintegrierte IL-15 zeigt nicht nur Rezeptorfunktionen (siehe 1.4.6.), sondern kann auch benachbarte Zellen, die entweder nur die β - und γ -Kette (siehe

Abbildung 1.2a) oder aber alle drei Ketten des IL-15R (siehe Abbildung 1.2b) exprimieren, durch ein juxtakrines Signal in ihrem Wachstum regulieren.²⁶

Abb. 1.2a In die Membran von Mastzellen integriertes IL-15 bindet an IL-2R β und IL-2R γ (= γ c)

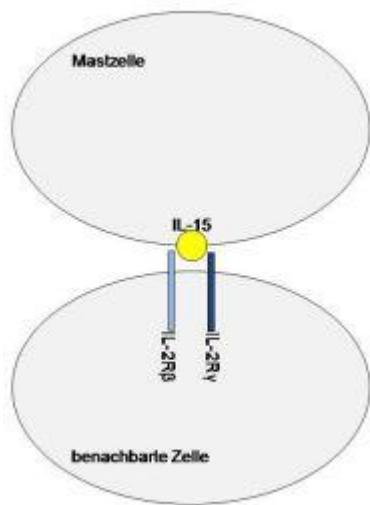
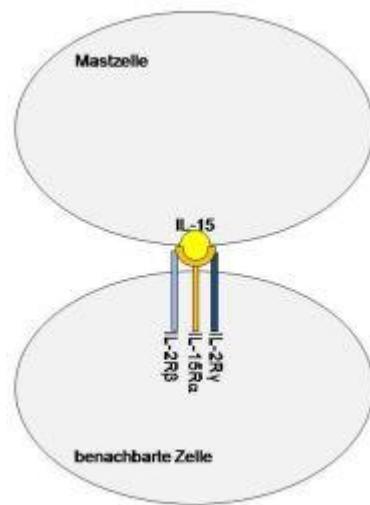


Abb. 1.2b In die Membran von Mastzellen integriertes IL-15 bindet an IL-15R α , IL-2R β und IL-2R γ (= γ c)



Es konnte aber gezeigt werden, dass membranassoziiertes IL-15 bei den Monozyten nicht nur in dieser membranintegrierten Form vorliegt, sondern dass bei diesen und auch bei anderen Zellen eine in die Zellmembran integrierte IL-15R α -Kette IL-15 an der Zelloberfläche präsentieren kann. Durch einen solchen IL-15/IL-15R α -Komplex präsenteretes IL-15 kann auch juxtakrin auf IL-15-abhängige, in der Nähe lokalisierte Zellen wirken (siehe Abbildung 1.3).²⁶ Eine solche Zytokin-präsentierende Funktion des IL-15R α konnte beispielsweise den dendritischen Zellen zugesprochen werden: die IL-15R α -Expression auf der Oberfläche der dendritischen Zellen ist hierbei essentiell für die Bildung und Erhaltung von CD8 $^+$ T-Gedächtniszellen, wohingegen eine solche Abhängigkeit von einer gleichartigen IL-15R α -Expression auf den CD8 $^+$ T-Gedächtniszellen selbst nicht gezeigt werden konnte. Auf diese beschriebene Weise wird IL-15 neben den CD8 $^+$ T-Gedächtniszellen auch den NK-Zellen präsentiert.²⁶

Da für diesen Weg der juxtakrinen Signalübermittlung die gleichzeitige IL-15-Expression der präsentierenden Zelle obligat ist, liegt zudem die Vermutung nahe, dass IL-15R α auch die IL-15-Produktion in der betroffenen Zelle unterstützt.²⁶

Bei einer solchen Signaltransduktion, bei der IL-15R α als IL-15-präsentierendes Element fungiert, kann die nachgeschaltete IL-15-abhängige Zelle – wie bei der zuvor beschriebenen juxtakrinen Signalübermittlung durch direkt in die Zellmembran integriertes IL-15 – entweder auch IL-15R α (siehe Abbildung 1.3a) oder nur die β - und γ -Kette (siehe Abbildung 1.3b) an

ihrer Zelloberfläche exprimieren. Da IL-15 zwei Bindungsstellen für IL-15R α besitzt, ist bei einer gleichzeitigen Expression von IL-15R α durch zwei benachbarte Zellen theoretisch auch eine Vernetzung dieser Zellen über IL-15 (im Sinne eines Rezeptor-Ligand-Rezeptorkomplexes) denkbar; aufgrund einer solchen Quervernetzung wäre eventuell sogar ein Signal in beide Richtungen denkbar.²⁶

Abb. 1.3a Freies IL-15 bindet an zwei IL-15R α

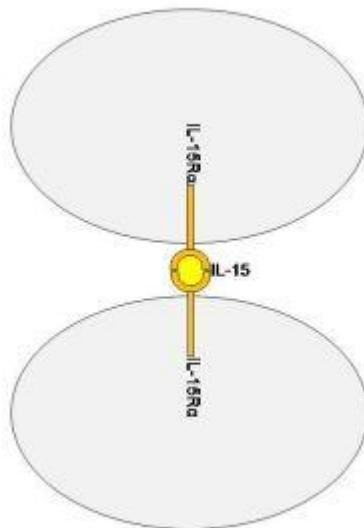
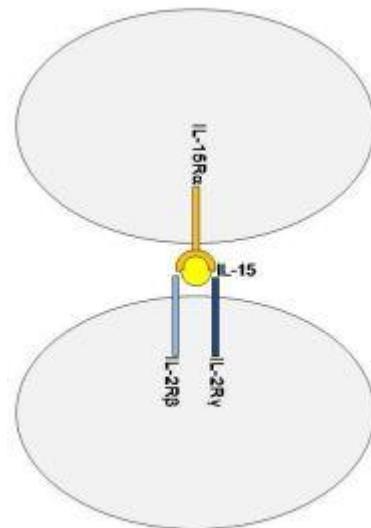


Abb. 1.3b Freies IL-15 bindet an IL-15R α , IL-2R β und IL-2R γ (=yc)



Da in vielen Studien trotz hoher IL-15-mRNA-Expression kein freies IL-15 nachgewiesen werden konnte, aber die IL-15-abhängigen Effekte gleichzeitig dennoch stark ausgebildet wurden, tendieren die aktuellen Thesen über die molekulärbiologische IL-15-Präsenz *in vivo* dahingehend, dass IL-15 eher selten in freier Form vorliegt und damit auch selten „klassisch“ an einen Rezeptor aus IL-15R α , IL-2R β und yc bindet, sondern überwiegend durch IL-15R α an Zelloberflächen gebunden agieren könnte.²⁶

Trotz vieler Unklarheiten darüber, wie IL-15R α an den einzelnen Zellsystemen an der IL-15-Signaltransduktion beteiligt ist, steht fest, dass sein Einfluss hierauf bedeutend ist.

1.4.10. STAT-1

Wie bereits unter 1.4.9. erwähnt, sind Proteine aus der Familie der *Signal transducer and activator of transcription* (STAT) an vielen Signalkaskaden beteiligt. Durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor werden im Zytoplasma lokalisierte Janus Kininasen (JAKs) phosphoryliert und binden anschließend an zytoplasmatische Elemente der Rezeptorkette. Durch eine darauf folgende Anlagerung von STATs an diesen Komplex aus Rezeptor und JAK werden die STATs an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert und bilden – durch die

Phosphorylierung aktiviert – Dimere. Diese Dimere können aus zwei gleichen oder aus unterschiedlichen STAT-Proteinen bestehen (Homo- oder Heterodimere) und sind im Gegensatz zu den Monomeren in der Lage, die Kernmembran zu passieren, als Transkriptionsfaktor an die im Kern lokalisierte DNA zu binden und somit die Transkription verschiedener Gene zu beeinflussen. Eine zusätzliche Phosphorylierung an spezifischen Serinresten der STATs steigert deren transkriptorische Aktivität.^{61,62}

Auf diese Weise wird STAT-1 durch viele immunologisch relevante Zytokine (beispielsweise IFN- γ , IFN- $\alpha\beta$, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-21) aktiviert und kann die Transkription von zahlreichen an verschiedenen Immunreaktionen beteiligten Proteinen wie IRF-1, IL-21, ICAM-1, iNOS und SOCS 1-3, vor allem aber die Transkription von IFN- γ und letztendlich auch die von sich selbst modulieren.^{51,61,63} Wie bereits unter 1.4.1. erwähnt, kann auch eine Bindung von IL-15 an den IL-15R neben einer Aktivierung von STAT-3 und STAT-5 zu einer solchen von STAT-1 führen: so konnte gezeigt werden, dass der durch IL-15 induzierten IFN- γ -Expression in NK- und T-Zellen - hierbei insbesondere in $\gamma\delta$ T-Zellen - eine solche Signaltransduktion über STAT-1 zugrunde liegt.^{51,52}

Zusätzlich zu dieser lange bekannten Funktion als Transkriptionsfaktor konnte in neueren Studien gezeigt werden, dass STAT-1 außerdem sowohl wachstumshemmend als auch apoptoseinduzierend auf viele verschiedene Zellsysteme (wie beispielsweise B-Lymphozyten und Herzmuskelzellen) wirkt.^{62,64}

Von dem Protein STAT-1 existiert eine weitere Isoform (bezeichnet als STAT-1 β), deren C-Terminus um 38 Aminosäuren kürzer ist und der durch diesen Verlust die Serin-, aber nicht die Tyrosinphosphorylierungsstelle fehlt. Da für den erwähnten apoptotischen Effekt von STAT-1 diese Serinphosphorylierung jedoch erforderlich ist, zeigt STAT-1 β diese Wirkung nicht; zudem kann STAT-1 β nicht als Transkriptionsfaktor fungieren. STAT-1 β zeigt somit keine eigene biologische Aktivität sondern wirkt antagonistisch zu der längeren Isoform STAT-1 α , indem es sowohl deren Phosphorylierung als auch deren DNA-Bindungskapazität als auch deren Transkriptionsaktivität entgegenwirkt.^{62,64,65}

1.5. Die genetische Komponente

Zwillingstudien zeigen, dass der Anteil verschiedener genetischer Faktoren bei der Entstehung der atopischen Erkrankungen bis zu 75 % beträgt⁶⁶, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine zugrunde liegende genetische Prädisposition durch die oben genannten Umweltfaktoren weiter modifiziert wird und dass die Krankheitsauslösung und -unterhaltung somit auf einer multifaktoriellen Genese basiert. Epidemiologische Studien, die nachweisen konnten, dass jeder atopische Verwandte ersten Grades das Atopierisiko der Kinder etwa verdreifacht – leiden beide Elternteile an einem allergischen Asthma, ist das Inzidenzrisiko der Kinder für diese Erkrankung etwa um den Faktor 8 erhöht – bekräftigen die Relevanz dieser genetischen Komponente.⁶⁷

Da aufgrund der Komplexität der Pathogenese atopischer Erkrankungen davon ausgegangen werden kann, dass diesen Krankheiten ein polygener Vererbungsmodus zugrundeliegt, ist die Suche nach den einzelnen für die diese Erkrankungen relevanten Genen schwieriger als bei monogen vererbten Merkmalen. In sogenannten Kopplungsanalysen werden viele Familien, in denen atopische Erkrankungen vorliegen, auf das Vererbungsmuster von genetischen Markern – beispielsweise Mikrosatelliten – untersucht; durch ihre Verteilung über das ganze Genom identifizieren diese genetischen Marker große Genabschnitte und ermöglichen somit eine grobe Kartierung des Genoms. Findet sich einer dieser Genabschnitte in den betroffenen Familienmitgliedern überproportional häufig, kann davon ausgegangen werden, dass um diesen speziellen Genabschnitt ein sogenanntes Kandidatengen für eine atopische Erkrankung liegt.^{68,69}

Da in vielen Studien zudem gezeigt werden konnte, dass IL-15 und die Proteine des IL-15-Signalweges verschiedene unterschiedlichen immunologischen Zellen in verschiedenen Aspekten beeinflussen, werden IL-15, IL-15R α und STAT-1 als Kandidatengene für atopische Erkrankungen bewertet. Um den Einfluss der Kandidatengene auf die Entstehung der angesprochenen Erkrankungen bestätigen zu können, müssen diese in Assoziationsstudien detaillierter untersucht werden.⁶⁹ Hierbei werden zunächst Mutationen im jeweiligen Gen identifiziert und diese anschließend in einer geeigneten Studienpopulation bezüglich ihres Einflusses auf die verschiedenen Merkmale analysiert.

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse sollte in dieser Arbeit der IL-15-Signalweg hinsichtlich seines Einflusses auf diese Erkrankungen molekulargenetisch analysiert werden.

1.5.1. Molekulargenetische Grundlagen

Über Zuckerbrücken aneinander gereihte Basen (A, C, G und T) bilden die Grundstruktur eines Gens; dieses enthält kodierende und nichtkodierende Regionen: die *Exons* kodieren größtenteils die Aminosäuresequenz und enthalten somit die direkte Information über die Struktur des zugehörigen Proteins: Um dieses Protein zu bilden, wird zuerst das ganze Gen durch eine *Polymerase* in eine *prä-messenger-RNA* (prä-mRNA) übersetzt und die nichtkodierenden Bereiche (sogenannte *Introns*) anschließend durch Spleißen entfernt.

Aus der mRNA, die das Endprodukt dieser sogenannten Transkription darstellt, wird im weiteren Verlauf der Proteinbiosynthese die Aminosäurenkette gebildet (sogenannte Translation), wobei jeweils drei Basen der mRNA eine Aminosäure kodieren; Interaktionen der einzelnen Aminosäuren untereinander bedingen letztlich die dreidimensionale Proteinstruktur.

Da eine Aminosäure meistens nicht nur durch *ein* Basentriplett kodiert wird, bedingt eine Veränderung der Basenabfolge in den die Aminosäuresequenz kodierenden Genbereichen (*coding sequence, CDS*) jedoch nicht zwangsläufig eine Änderung der Aminosäuresequenz („synonyme Mutation“), kann aber andererseits – beispielsweise im Fall einer Aminosäuredeletion – auch das ganze Basentriplettmuster verschieben.

Zusätzlich zu diesen CDS-Bereichen enthalten die Exons Regionen, die selbst nicht translatiert werden, sondern die Translation der CDS unterstützen (*untranslated region, UTR*); sowohl am 3' als auch am 5' Ende des Gens bzw. der mRNA liegt eine solche UTR.

In der flankierenden Region am 5' Ende eines Gens liegt zudem die Promotorregion: durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese wird einerseits die Transkription des jeweiligen Gens reguliert, andererseits stellt die Promotorsequenz den Ansatzpunkt der Polymerase und damit den Ausgangspunkt der Transkription dar. Transkriptionsfaktoren können auch an intronische Sequenzen sowie an regulatorische Elemente in den flankierenden Regionen auf beiden Seiten eines Gens binden und dadurch die Transkriptionsaktivität beeinflussen.

Evolutionsbedingt ist die Basensequenz in den einzelnen Genen nicht in allen Individuen einer Population identisch. Liegt eine solche Mutation der Basensequenz in mehr als 3 % einer Population vor, spricht man von einem Polymorphismus, vereinfacht auch *single nucleotide polymorphism (SNP)* genannt. Während sich Mutationen in den Exons eher auf die *Qualität* des synthetisierten Proteins auswirken, können Mutationen in Introns und in flankierenden Regionen eines Gens die *Quantität* des Proteins beeinflussen, da in diesen Bereichen Bindungsstellen für die vorwiegend regulatorisch wirksamen Transkriptionsfaktoren liegen.

1.5.2. Das Gen IL-15

Das Gen IL-15 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 an der Stelle 4q31. Es erstreckt sich über einen Bereich von 96858 Basenpaaren (bp) und beinhaltet 8 Exons. Von dem Gen werden zwei prä-mRNA-Isoformen transkribiert; aus diesen gehen in der Translation an den Ribosomen die beiden unter 1.4.2. beschriebenen Protein-Isoformen mit dem längeren und kürzeren Signalpeptid hervor.

Aus der prä-mRNA-Isoform, die in der Translation die Protein-Isoform mit dem längeren Signalpeptid bildet, entsteht durch alternatives Spleißen der prä-mRNA eine zusätzliche Unterform mit einem kürzeren Exon 1 (siehe Abbildungen 1.4a und 1.4b); die Proteinprodukte dieser beiden alternativ gespleißten mRNA unterscheiden sich nicht. Die prä-mRNA-Isoform, die das IL-15 mit dem kürzeren Signalpeptid bildet, beginnt erst später mit einem leicht modifizierten Exon 3 – es ist 219 bp länger als das der ersten prä-mRNA-Isoform – und enthält zwischen Exon 4 und 5 ein zusätzliches Exon 4a, in welchem auch der Beginn der CDS liegt. Das zweite prä-mRNA-Isoform ist dadurch nur 14312 bp lang und beinhaltet 7 Exons (siehe Abbildung 1.4c).

Abb. 1.4a Die längere Isoform des IL-15-Gens

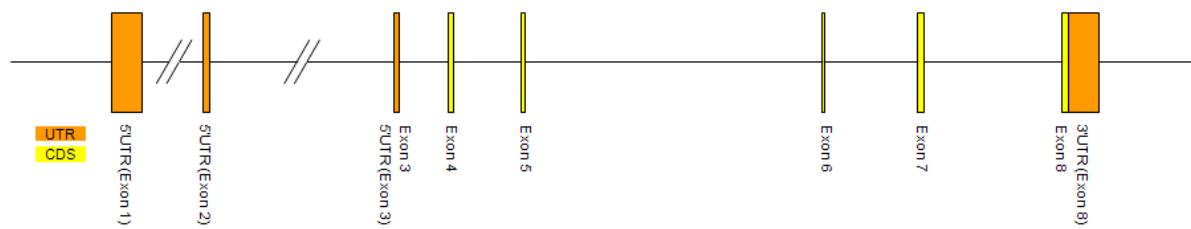


Abb. 1.4b Die längere Isoform des IL-15-Gens – Spleißalternative

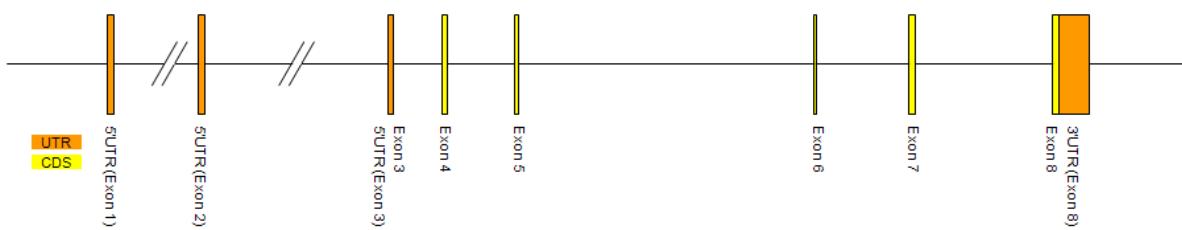
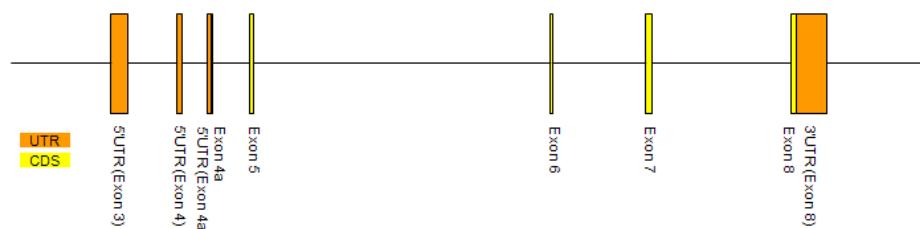


Abb. 1.4c Die kürzere Isoform des IL-15-Gens



1.5.3. Das Gen *IL-15R α*

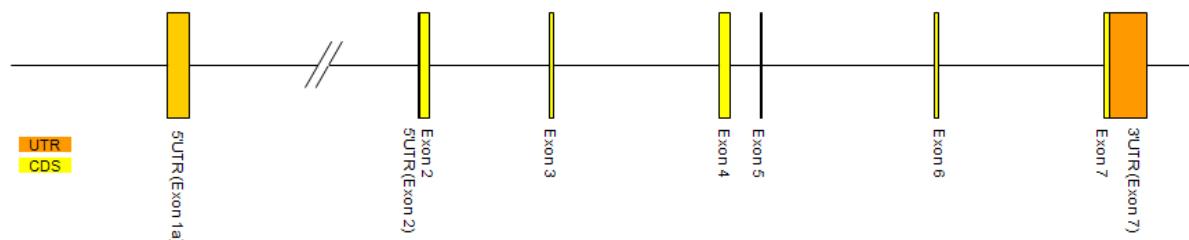
Das Gen *IL-15R α* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10 an der Stelle 10p15-p14 auf dem reversen komplementären Strang. Die 7 Exons erstrecken sich über einen Bereich von 25809 bp.

Bei der Transkription des Gens können zwei unterschiedliche prä-mRNA-Isoformen entstehen, die ein alternierendes Exon 1 besitzen und deren Beginn der CDS voneinander abweicht: bei der prä-mRNA-Isoform 1 liegt der Beginn der CDS im Exon 1 (siehe Abbildung 1.5a), bei der prä-mRNA-Isoform 2, die ein alternatives Exon 1a transkribiert, beginnt die CDS im Exon 2 (siehe Abbildung 1.5b).

Abb. 1.5a Die Isoform 1 des *IL-15R α* -Gens



Abb. 1.5b Die Isoform 2 des *IL-15R α* -Gens



Von *IL-15R α* konnten zahlreiche Protein-Isoformen identifiziert werden, die sich durch Deletionen verschiedener Exons voneinander unterscheiden; diese Deletionen entstehen durch alternatives Spleißen der beiden erwähnten prä-mRNA-Isoformen.

Da das Exon 2 die Informationen für die Sushi-Domäne enthält, können Protein-Isoformen, die dieses Exon nicht besitzen, kein IL-15 binden. Die Informationen, die das Exon 2 darüber hinaus enthält, scheinen auch für die intrazelluläre *IL-15R α* -Verteilung entscheidend zu sein, da diese Protein-Isoformen nicht in der Zellkernmembran nachgewiesen werden konnten. Demgegenüber zeigen *IL-15R α* -Protein-Isoformen ohne Exon 4 oder ohne die Exone 3 und 4 oder ohne die Exone 3 bis 5 in Mastzellen von Mäusen eine uneingeschränkte Funktion bei annähernd unveränderter IL-15-Affinität. IL-15 führt bei einer Bindung an diese Isoformen statt einer Phosphorylierung und damit verbundenen Aktivierung von JAK-1, JAK-3, STAT-3 und STAT-5 jedoch zu einer Phosphorylierung von STAT-3, STAT-5, STAT-6, JAK-2 und der Tyrosinkinase Syk.²⁶

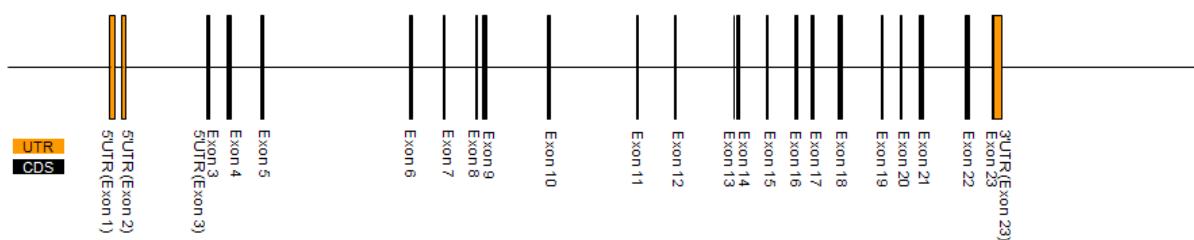
1.5.4. Das Gen STAT-1

Das Gen STAT-1 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 2 an der Stelle 2q32.2 auf dem reversen komplementären Strang. Bei der Transkription des Gens sind zwei unterschiedliche prä-mRNA-Isoformen möglich, aus denen die unter 1.4.10. beschriebenen Protein-Isoformen hervorgehen: bei der kürzeren Isoform STAT-1 β werden nur 23 Exons und eine direkt an das 23. Exon anschließende 3'UTR transkribiert, sodass die prä-mRNA 38673 bp umfasst (siehe Abbildung 1.6a); die längere Isoform STAT-1 α besteht dagegen aus 25 Exons, welche sich über einen Bereich von 45061 bp erstrecken (siehe Abbildung 1.6b).

Abb. 1.6a Die längere Isoform des STAT-1-Gens (STAT-1 α)



Abb. 1.6b Die kürzere Isoform des STAT-1-Gens (STAT-1 β)



1.6. Ziel dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollten durch ein Mutationsscreening alle Polymorphismen der proteinkodierenden Region des Gens IL-15Ra, deren flankierender Bereiche, der 3' und der 5'UTR sowie der Promotorregion identifiziert werden. In einer anschließenden Assoziationsstudie wurden die Zusammenhänge der Polymorphismen auf das Vorliegen von atopischen Erkrankungen wie Asthma, atopischer Dermatitis und allergischer Rhinokonjunktivitis sowie auf die Präsenz entsprechender Atopie-assozierter Symptome wie ein pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch, eine allergische Sensibilisierung oder einer erhöhten Menge an IgE-Antikörpern im Blut aufgezeigt.

Für IL-15 wurden die von Kurz et al., für STAT-1 ausgewählten der auf <http://www.innateimmunity.net> veröffentlichten Polymorphismen in derselben Assoziationsstudie auf dieselben Effekte untersucht.^{70,71}

2. Material und Methoden

2.1. Probanden / Population

2.1.1. Population für das Mutationsscreening

Die Population für das initiale Mutationsscreening bestand aus 40 nichtverwandten, freiwilligen, zufällig ausgewählten erwachsenen Personen; Geschlecht oder mögliche Erkrankungen beeinflussten die Auswahl nicht. Den Personen dieser Kontrollpopulation wurde EDTA-Blut zur DNA-Extraktion (siehe 2.2.) entnommen.

2.1.2. Population für die Genotypisierung

Als Population für die spätere Genotypisierung diente die deutsche Subpopulation der Phase II der *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II)*. Die ISAAC II-Studie wurde in den Jahren 1995 / 1996 durchgeführt, um die weltweite Prävalenz von atopischen Erkrankungen unter Schulkindern zu analysieren.

In Deutschland wurden hierfür über die lokalen Schulen 3017 9-11jährige Kinder aus Dresden und 2612 gleichaltrige Kinder aus München rekrutiert. Die Studie beinhaltete nach dem Protokoll der ISAAC II einen Fragebogen für die Eltern, eine fotodokumentierte Hautuntersuchung, einen Hautallergietest, eine ausführliche Lungenfunktionsuntersuchung und eine Blutentnahme für weitere Laboranalysen.^{23,72}

Der Fragebogen beinhaltete Fragen nach Alter und Herkunft des Kindes und der Eltern, nach dem Geschlecht, nach der elterlichen Schulbildung und Fragen bezüglich des Auftretens, der Dauer, der Häufigkeit und der jeweiligen Schwere sowohl von asthmatischen Symptomen, als auch von Symptomen einer allergischen Rhinitis, als auch von solchen einer atopischen Dermatitis.^{23,72,73}

Ein Kind wurde als an Asthma / allergischer Rhinokonjunktivitis / atopischer Dermatitis erkrankt kategorisiert, wenn anhand des Fragebogens eine dieser Krankheiten von einem Arzt diagnostiziert wurde; als an Asthma erkrankt galten darüber hinaus jene Kinder, bei welchen wiederholt die ärztliche Diagnose einer asthmatischen, spastischen oder obstruktiven Bronchitis gestellt wurde. Zudem wurden Fragen über andere Beeinträchtigungen der Atmung, über eventuell bereits erfolgte Therapien / Therapieversuche der oben genannten Krankheiten und über die jeweiligen Lebens- und Umweltbedingungen in der Vergangenheit und in der Gegenwart gestellt.^{23,72}

Die Haut wurde auf eine sichtbare Dermatitis besonders um die Augen, am Hals, an den Beugeseiten der Ellenbogen- und Kniegelenke und der Knöchel untersucht und die Befunde fotografisch dokumentiert.^{23,72}

Die Sensibilisierung gegenüber sechs weitverbreiteten Allergenen (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Alternaria tenuis*, Katzenhaare, gemischte Gräserpollen, gemischte Baumpollen) wurde in einem Hautallergietest untersucht: jeweils ein Tropfen der Allergenextrakte sowie der Positiv- und Negativkontrolle wurden auf die Beugeseite des linken Unterarms aufgetragen und mit Hilfe einer Lanzette in die Haut gebracht. Eine positive Hautreaktion wurde diagnostiziert, wenn die Allergen-Papel mindestens 3 mm größer als die Papel der Negativkontrolle war.^{23,72}

Zur Untersuchung der Lungenfunktion wurden zuerst mindestens zwei Standard-Spirogramme durchgeführt, um den Ausgangswert der Einsekundenkapazität (FEV1) zu ermitteln. Eine signifikante Änderung dieses Wertes durch die Inhalation von hyperosmolaren (4,5 %) Salzlösungen repräsentierte die bronchiale Reagibilität; dabei wurde die Dauer der Inhalation schrittweise erhöht (0,5 min, 1 min, 2 min, 4 min, 8 min). Sank die FEV1 um 10-15 %, wurde die zuletzt verwendete Inhalationsdauer wiederholt: Lag die FEV1 in der Wiederholung unter 85 %, wurde die Lungenfunktion abgebrochen, ansonsten wurde die Inhalationsdauer weiter gesteigert. Lag die FEV1 von Anfang an unter 75 % des erwarteten Wertes, wurde keine derartige Provokation durchgeführt. Alle Kinder wurden darum gebeten, ihre Asthmamedikation 12 Stunden vor Versuchsdurchführung auszusetzen. Diese Provokation wurde aufgrund ihrer Zeitintensität lediglich bei zufällig bestimmten Probanden durchgeführt (52 % der Probanden in Dresden, 56 % in München). Eine bronchiale Hyperreagibilität wurde diagnostiziert, wenn die FEV1 um 15 % oder mehr vom Ausgangswert abwich.^{23,72}

Mit dem Einverständnis der Eltern wurde den Probanden zudem Blut entnommen. In allen Blutproben wurden spezifische IgE-Antikörper gegen verschiedene Allergene gemessen, bei einer zufällig bestimmten Subgruppe wurde zudem das Gesamt-IgE bestimmt.²³ IgE-Werte über der 90. Perzentile wurden in dieser Studie als erhöht definiert. Aus EDTA-Blut extrahierte DNA (siehe 2.2.) stand für die Genotypisierung, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, zur Verfügung.

Die Luftverschmutzung wurde anhand von Daten des Sächsischen Landesamts für Umwelt und Geologie bzw. des Bayerischen Landesamts für Umweltschutz über den SO₂-, NO₂- und Feinstaub-Gehalt geschätzt.²³

Gegebenenfalls wurden einzelne SNPs auch in einer Population aus Leipzig genotypisiert. Diese Population unterscheidet sich von der Dresden- und München-Population lediglich in der leicht veränderten Bestimmung der atopischen Sensibilisierung und der Lungenfunktion und in der Verwendung leicht unterschiedlicher Fragebögen.²³

Für diese Arbeit wurden alle Kinder deutscher Abstammung, bei welchen IgE-Werte bestimmt worden waren und von welchen sowohl DNA-Material als auch Fragebogendaten

vorlagen aus der beschriebenen Subpopulation der ISAAC II Studie und der Population aus Leipzig ausgewählt (siehe Tabelle 2.1).

Sowohl die Daten der Kontrollpopulation als auch die der Studienpopulation wurden komplett anonymisiert.

Tab. 2.1 Kategorien der Studienpopulation

	ja	nein	keine Daten
Dresden (n=1940)			
Asthma	142	1764	34
Pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch	157	1753	30
Allergische Rhinokonjunktivitis	183	1720	37
Atopische Dermatitis	327	1544	69
Atopie	493	1366	81
IgE-Antikörper > 90. Perzentile	201	1739	0
München (n=1159)			
Asthma	130	1018	11
Pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch	99	1043	17
Allergische Rhinokonjunktivitis	97	1032	30
Atopische Dermatitis	213	910	36
Atopie	284	859	16
IgE-Antikörper > 90. Perzentile	117	1010	32
Leipzig (n=1165)			
Asthma	78	1053	34
Pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch	61	980	124
Allergische Rhinokonjunktivitis	56	1086	23
Atopische Dermatitis	139	827	199
Atopie	279	829	57
IgE-Antikörper > 90. Perzentile	101	987	77

2.2. DNA-Extraktion

Im Vorfeld dieser Studie wurden bereits sowohl die DNA der Kontroll- als auch der Studienpopulation aus EDTA-Vollblut extrahiert. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, die im Folgenden beschrieben werden.

2.2.1. Aussalzmethode

Durch eine initiale Zentrifugation (2000-3000 rcf, 15 – 24 °C, mindestens 15 min) wird EDTA-Blut (mindestens 9 ml) in eine breite Erythrozytenfraktion, eine dünne DNA-haltige Leukozytenschicht und das Plasma getrennt. Der Plasmaüberstand wird abpipettiert und getrennt für weitere Analysen bei -20 °C aufbewahrt. Die Erythrozyten und das restliche Plasma werden resuspendiert, in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen umgefüllt und mit Ery-Lyse-Puffer aufgefüllt. Nach ca. 10 min zeigt ein Umschlag der zuerst trüben Flüssigkeit in eine klare lackfarbene Lösung die vollzogene Lyse der Erythrozyten an.

Ein anschließender Zentrifugationsschritt (400-500 rcf, 10 min) bildet aus den DNA-haltigen Leukozyten ein Pellet, sodass der Überstand mit den Abfallprodukten der Erythrozytenlyse abgekippt werden kann. Das entstandene Leukozytenpellet wird resuspendiert und die Erythrozytenlyse noch zwei weitere Male wiederholt.

Die Zugabe von 5 ml Proteinase-K-Puffer, 25 µl Proteinase-K (20 mg / ml) und 250 µl 20 %iges SDS führt während der anschließenden Inkubation über Nacht im Wasserbad bei 37 °C zur Verdauung der meisten Proteine und setzt somit die DNA aus den Leukozyten frei.

Durch die Zugabe von 1500 µl gesättigtem NaCl (5 M) am nächsten Tag fallen die restlichen Proteine aus und bilden in einem weiteren Zentrifugationsschritt (3200 rcf, mindestens 30 min) ein Pellet am Boden, sodass der DNA-haltige Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt werden kann. Durch die Zugabe von 20 ml 100 %igem Ethanol fällt die DNA aus und kann aus der Lösung gefischt werden. In einem neuen Röhrchen wird die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird sie in TE-Puffer gelöst, ihre Konzentration im Photometer bestimmt (siehe 2.6.) und auf die jeweils gewünschte Konzentration verdünnt. In diesem Zustand kann sie bei 4 °C gelagert oder eingefroren werden.⁷⁴

2.2.2. *FlexiGene-Kit*

Der *FlexiGene-Kit* der Firma Qiagen zur DNA-Extraktion beruht ebenfalls auf den Prinzipien der Aussalzmethode: 5 ml Lysepuffer werden zu 2 ml Blut gegeben und führen zur Ausfällung von Zellkernen und Mitochondrien; diese bilden während der anschließenden Zentrifugation (2000 rcf, 5 min) ein Pellet, sodass der Überstand abgekippt werden kann. Nach der Resuspension des Pellets im Denaturierungspuffer zerstört das enthaltene Salz molekulare Strukturen und führt zusammen mit der Qiagen-Protease während einer 10-minütigen Inkubation im 65 °C warmen Wasserbad zum Proteinverdau im Reaktionsansatz. Durch die Zugabe von 1 ml 100 %igem Isopropanol fällt die DNA aus und formt während eines weiteren Zentrifugationsschritts (2000 rcf, 3 min) ein Pellet. Der Überstand wird abgekippt und das DNA-Pellet in 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wird die DNA für 5-10 min luftgetrocknet und während einer einstündigen Inkubation im 65 °C warmen Wasserbad in 200 µl Hydrationspuffer wieder gelöst. Am nächsten Tag kann die DNA in ein Eppendorf-Röhrchen umpipettiert und bei 4 °C gelagert werden.⁷⁵

2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Stücke definierter Länge. Hierfür werden zuerst Primerpaare ermittelt, die vor und nach der zu amplifizierenden Region binden. Diese Primer sollten zwischen 17 und 30 Basen lang sein und ungefähr den gleichen Anteil an Guanin und Cytosin enthalten, um die Optimierung der PCR-Bedingungen zu erleichtern. Mit Hilfe der PCR können sehr große DNA-Stücke amplifiziert werden, für die spätere Sequenzierung sollten die entstehenden Stränge jedoch eine Länge von 1200 bp nicht überschreiten.

Ein Reaktionsansatz besteht aus den bereits erwähnten spezifischen Oligonukleotidprimern, hitzestabiler *Taq*-Polymerase, den vier Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP, der DNA und geeigneten Pufferbedingungen.

Im Thermocycler beginnt nach einer initialen Hitzedenaturierung der DNA-Doppelstränge die zyklische Amplifizierung: In einer kürzeren *Denaturierungsphase* wird der Ansatz zu Beginn eines jeden Zyklus auf 95 °C erhitzt um alle DNA-Doppelstränge zu trennen. Daraufhin sinkt die Temperatur auf einen zuvor optimierten Wert, bei welchem die Primer an die Zielsequenzen der DNA-Einzelstränge binden (*Annealingphase*). Diese Annealingtemperatur hängt von dem GC-Gehalt der Primer ab und ist für die Spezifität der Primerbindung entscheidend; sie kann zur Spezifitätserhöhung der Primerbindung auch zyklusweise an den gewünschten Wert angenähert werden (sog. *touchdown* PCR). Ein Anstieg der Temperatur auf 72 °C aktiviert dann die *Taq*-Polymerase: vom 3'Ende des Primers ausgehend werden fortlaufend komplementäre dNTPs an die Einzelstränge angelagert und somit ein neuer Strang synthetisiert (*Elongationsphase*). Durch einen erneuten Temperaturanstieg auf 95 °C wird die *Taq*-Polymerase deaktiviert; der neu entstandene DNA-Strang wird vom Matrizenstrang gelöst und kann im nächsten Zyklus selbst als solcher dienen. Durch ihre Thermostabilität wird die *Taq*-Polymerase während der Temperaturanstiege nicht zerstört, sodass dieser Zyklus aus Denaturierung, Primerbindung und Elongation nun bis zu 40 mal wiederholt und die eingesetzte DNA dadurch exponentiell amplifiziert werden kann. Nach Beendigung aller Zyklen findet nochmals eine längere Elongationsphase statt um eventuell unvollständig amplifizierte Kopien fertigzustellen. Das Reaktionsgemisch wird zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen der Reagenzien anschließend auf 4 °C gekühlt.^{76,77}

Durchführung: In dieser Arbeit wurde ein Großteil des Gens IL-15R α auf Mutationen untersucht: alle Exone einschließlich eines flankierenden Bereichs (300-500 bp) und der potentielle Promoterbereich wurden bei den Probanden der Kontrollpopulation analysiert. Um diese Bereiche später sequenzieren zu können (siehe 2.7.), wurde der zu amplifizierende Bereich in 23 Fragmente mit einer optimalen PCR-Fragment-Länge von ca. 500 bp unterteilt.

Für jedes Fragment wurden mit Hilfe der Computerprogramme Vector NTI und NetPrimer Primerpaare entwickelt und bei der Firma Metabion bestellt, die spezifisch in der flankierenden Region des jeweiligen Fragments binden. Nach der Optimierung bezüglich der jeweiligen Annealingtemperatur und der Pufferbedingungen (PCR-Bedingungen der einzelnen Fragmente siehe Tabelle 2.2) wurde der Zielbereich bei allen Personen der Kontrollpopulation amplifiziert. Ein Standard-PCR-Ansatz bestand dabei immer aus den in Tabelle 2.3 aufgeführten Reagenzien und wurde stets unter den in Tabelle 2.4 beschriebenen Temperaturbedingungen in einem Thermocycler der Firma Eppendorf amplifiziert. Einzelne Fragmente wurden mittels der *touchdown*-Technik amplifiziert, die hierfür verwendeten Temperaturbedingungen sind in Tabelle 2.5 dargestellt. Bei jeder PCR wurde zudem eine Negativkontrolle ohne DNA-Material mitgeführt um eine Kontamination der verwendeten Lösungen auszuschließen.

Tab. 2.2 PCR-Bedingungen der Fragmente

Frag- ment	Primer	Produkt- länge (bp)	Annealing- temperatur (°C)	Betainkonzen- tration (Molar)	Anmerkung
1	fwd: ggggtgctcaatctgtatggta rev: tctttcttcctccgtctcc	488	56	0,5	
2	aatgtaaaggccatcctgtccgttg cggcagtgaccacacaagg	954	66	0,5	
3	gattccccagttggagtaagg tagcggtgacatggacagg	611	57,4	1	
4	gcaagtatgtcacaaaagcctc gactcagcgtccccacc	839	57,4	1	
5	ttgcgtggtaaggtcctgggtc caccgacgccccgcac	490	68,3	1	
6	aatgcactggggggcg cctttctgcgagtgtagactccaggc	846	68,3	0,5/1	
7	ggagggtggggaggagc gccttcagtggggcttg	472	60,7	1	
8	tgcctcagcctccccagtagc cgtgatgcctgcgaaagtgc	547	67	1	<i>touchdown</i> - PCR
9	gggcttgtcctgaggcacc gccagcatgtctcaaataaag	1004	68	0,5	
10	tggctggcatctggaaaacg gcataacagaggagtttgagtga	1053	64,5	0,5	
11	ctatgggctccagggtcag aggtaaaagcataagaaacaatg	701	58,8	0,5	
12	tctccaagaataaccagca accacagaggccgtgagtc	490	58,8	0,5	
13	ctgaaaaggtaggaaggc agcccgctgagtggac	492	58,8	0,5	
14	tggcgtgtggac caaggcaggacaacatcag	496	58	1	<i>touchdown</i> - PCR
15	cagttggctgtgagagaggg ccacggagaaaagaggtcag	506	60,6	1	
16	tccccattgtgcctctg tacacacactgcggaaaagag	554	55,7	0,2	

Tab. 2.2 (Forts.) PCR-Bedingungen der Fragmente

Frag- ment	Primer	Produkt- länge (bp)	Annealing- temperatur (°C)	Betainkonzen- tration (Molar)	Anmerkung
17	gagtctcccagggtgctaag cacctgtatgtttggatgctc	475	62	0,2	
18	tggcggtgtactgggg atggggagggtctaactctgc	544	63,3	1	
19	ctggttgggaggcacttgg gggagggggcattctgg	588	60	1	touchdown- PCR
20	ggtgatggcagggtggc taggttgtgagagcagtttcc	364	65,3	1	
21	cccgcaagtgtggacatac gctttaggcaaggctttctc	1053	63	0,2	
22	tcaactcagtgcattttacg cgcccagtgtcccaagc	566	63	0,5	
23	cagtggcaagtctgggctc ggcagttggcgtggtttc	724	67	0,5	

Tab. 2.3 Standard-PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration
Puffer Y	5	10 x
Primer fwd	1	25 µM
Primer rev	1	25 µM
dNTPs	1	je 10 mM
Betain	0-10	5 M
Taq-Polymerase	0,16	5 U / µl
DNA	3	20 ng / µl
molekularbiolog. H ₂ O	ad 47	

Tab. 2.4 Temperatur-Zeit-Programm einer Standard-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	40 x 95°C	20 sec
Annealing	55,7 °C – 68,3 °C	30 sec
Elongation	72 °C	20 sec
abschließende Elongation	72 °C	5 min
Lagerung	4 °C	

Tab. 2.5 Temperatur-Zeit-Programm einer touchdown-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung	20 x 95°C	20 sec
schrittweise Annäherung an die terminale Annealingtemperatur	68 - 77 °C, bei jedem Zyklus -0,5 °C	20 sec
Elongation	72 °C	40 sec
Denaturierung	40 x 95°C	20 sec
Annealing	58 - 67 °C	20 sec
Elongation	72 °C	40 sec
abschließende Elongation	72 °C	5 min
Lagerung	4 °C	

2.4. Aufreinigung des PCR-Produkts

Vor der Sequenzierung wurde das PCR-Produkt mit Hilfe von Multiscreen™ PCR-Platten der Firma Millipore aufgereinigt: Der amplifizierte Reaktionsansatz aus dem Thermocycler wird hierfür zusammen mit 250 µl HPLC-H₂O in eine Vertiefung der Multiscreen™ PCR-Platte gegeben und 7 min bei 3200 rcf zentrifugiert. Anschließend werden 30 µl HPLC-H₂O zugegeben, die Platte 5 min gevortext und die DNA-haltige Lösung dann abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.5. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auf trennung von DNA-Strängen nach ihrer Länge. Zur Herstellung eines Agarosegels wird Agarose in TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gelöst und aufgekocht. Das nun zugefügte Ethidiumbromid dient dem späteren Anfärben der Nukleinsäure. Das flüssige Gel wird daraufhin in einen Schlitten einer Gelkammer gefüllt und mit Kämmen bestückt, welche die späteren Geltaschen für die Proben formen. Während der nun folgenden Abkühlung verfestigt sich das Gel: die Agarose bildet lange Polymere, die vernetzt werden und eine Art Sieb formen. Hierbei bestimmt die Agarosekonzentration die Größe der Poren: kleinere Moleküle können während der bei der späteren Elektrophorese angelegten Spannung leichter durch diese Poren wandern, sodass eine Auf trennung der DNA-Stränge nach ihrer Größe möglich ist. Das gefestigte Gel wird anschließend von den Kämmen befreit und in eine mit TBE-Laupuffer gefüllte Gelkammer gelegt. In die der Negativelektrode zugewandten Geltaschen kann nun die mit *Loading Dye* gemischte DNA gefüllt werden. Unter neutralen Pufferbedingungen sind DNA-Moleküle negativ geladen und wandern bei nun angelegter Spannung zur Anode. Der im *Loading Dye* enthaltene Farbstoff ermöglicht während der Elektrophorese eine Einschätzung ihres Fortschritts. Zudem wird in einige Taschen eine DNA-Leiter gefüllt: diese besteht aus einer Mischung aus DNA-Strängen unterschiedlicher bekannter Länge und erlaubt somit im Vergleich eine Aussage über die Länge der DNA der späteren Banden. Ist die Elektrophorese beendet, kann das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet werden: Ethidiumbromid interkaliert mit den Basen der DNA, fluoresziert im ultravioletten Licht und macht die DNA so sichtbar.

Durchführung: Für diese Arbeit wurde die Gelelektrophorese benutzt um den Erfolg der PCR zu kontrollieren. Aus 3 g Agarose, 200 ml TBE-Puffer und 70 µl Ethidiumbromid wurde ein 1,5 %iges Agarosegel produziert. Je ca. 5 µl der mit *Loading Dye* gemischten aufgereinigten DNA wurde auf das Gel aufgetragen; zudem wurde mindestens eine Tasche mit einer 100 bp-DNA-Leiter bestückt. Die angelegte Spannung betrug 100-120 V bei 400 mA; die

Elektrophorese dauerte 30-40 min. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht beurteilt und zu Dokumentationszwecken fotografiert.

Eine Bande entsprechend der bekannten Fragmentlänge ohne weitere unspezifische Banden bestätigte das Gelingen der PCR.

2.6. Bestimmung der DNA-Konzentration

Sowohl nach der DNA-Isolierung (siehe 2.2.) als auch nach der PCR (siehe 2.3.) musste die DNA-Konzentration bestimmt werden, um die richtige DNA-Menge in die folgenden Versuche (siehe 2.7., 2.9., 2.10.) einzusetzen.

Hierfür wurde die Extinktion der DNA-haltigen Lösung im Photometer bestimmt. Die Messung erfolgte bei 260 nm (Extinktion von DNA) und 280 nm (Extinktion von Proteinen): Der Quotient dieser beiden Werte gibt den Grad der Verunreinigung der Lösung an und liegt im Optimalfall zwischen 1,8 und 2,0. Aus der gemessenen Extinktion wurde durch das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration der DNA in der Lösung bestimmt: die Extinktion bei einer Wellenlänge λ (E_λ) ist das Produkt der Konzentration des Stoffes (c), der Dicke der Messküvette im Photometer (d) und eines definierten, von der Wellenlänge abhängigen Extinktionskoeffizienten ϵ . Bei einer Küvettendicke von 1 cm und einer Extinktion von 1,0 bei 260 nm enthält 1 μ l der zu analysierenden Lösung definitionsgemäß 50 ng DNA.⁷⁸

In dieser Arbeit wurde die DNA-Konzentrationsbestimmung in einem Biophotometer der Firma Eppendorf mit einer 10 mm breiten Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL® der Firma Hellma durchgeführt.

2.7. Mutationsscreening

2.7.1. Sequenzierreaktion nach der Didesoxymethode nach Sanger

Bei der Sequenzierreaktion wird die amplifizierte DNA ein einziges weiteres Mal nach den Prinzipien einer Standard-PCR amplifiziert. Im Gegensatz zur Standard-PCR wird dem Ansatz bei der Sequenzierreaktion aber zusätzlich zu den dNTPs ein geringer Anteil an didesoxy-NTPs (ddNTPs) zugesetzt: da diesen die 3'OH-Gruppe fehlt, führt ihr Einbau zu einem Kettenabbruch. Zudem enthält der Reaktionsansatz nur *einen* Primer (sog. Sequenzier-Primer), sodass jeder Elongationsschritt zu einem neuen Kettenabbruchfragment führt.

Da aber nicht beeinflusst werden kann, wann ein dNTP und wann ein ddNTP eingebaut wird, müssen so viele Fragmente produziert werden, dass statistisch davon ausgegangen werden kann, dass jede Fragmentlänge mindestens einmal vertreten ist. Eine Koppelung jeder

ddNTP-Sorte mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht die spätere automatische Analyse der verschiedenen Fragmente in der Kapillargelelektrophorese (siehe 2.7.3.).⁷⁹

Durchführung: In dieser Arbeit bestand ein Reaktionsansatz immer aus den in Tabelle 2.6 aufgeführten Reagenzien. Der verwendete Sequenzierpuffer und der *Big Dye* (enthält dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und die benötigten Enzyme) sind Bestandteile des *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied Biosystems. Das verwendete Cycler-Programm ist in Tabelle 2.7 beschrieben. Der Reaktion wurde stets in Sequenzierplatten der Firma PeqLab, die mit PCR-Folien der Firma Eppendorf verschweißt wurden, in einem Cycler der Firma Eppendorf durchgeführt.

Tab. 2.6 Ansatz einer Sequenzierreaktion

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration
Primer	0,5	10 µM
<i>Big Dye v 3.1</i>	1	
Sequenzierpuffer	1	5 x
PCR-Produkt	1-2	25-50 ng / µl
HPLC-H ₂ O	ad 5	

Tab. 2.7 Temperatur-Zeit-Programm einer Sequenzierreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	28 x 95°C	30 sec
Annealing	50 °C	15 sec
Extension	60 °C	4 min
Lagerung	4 °C	

2.7.2. Ethanolfällung

Das Sequenzierungsprodukt wird mit Ethanol gefällt, um die DNA zu konzentrieren und um überschüssige Reagenzien zu entfernen. In dieser Arbeit wurde das Sequenzierungsprodukt hierzu mit jeweils 100 µl 70 %igem Ethanol gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 30 min bei 3000 rcf zentrifugiert, sodass die gefällte DNA ein Pellet formte. Der Überstand wurde durch kurzes kräftiges Abkippen größtenteils entfernt; durch eine kurze Zentrifugation der umgedrehten Platte bei 500-600 rcf für ca. 20 sec wurde der Überstand fast komplett entfernt. Die anschließende Zugabe von 150 µl 70 %igem Ethanol, eine erneute 10-minütige Zentrifugation bei 3000 rcf, ein Verwerfen des Überstands durch Abkippen und eine abschließende 1-minütige Zentrifugation der umgedrehten Platte bei 600 rcf diente der Reinigung des Pellets. Das gereinigte Pellet wurde weitere 5 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und konnte anschließend bei -20 °C gelagert werden.

2.7.3. Kapillargelelektrophorese

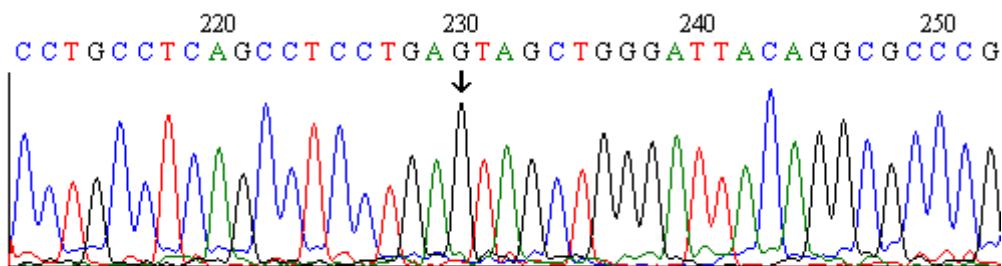
Zur Analyse der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Fragmente wurde das Pellet mit 50 µl HPLC-H₂O wieder aufgelöst und 25 µl der Lösung auf spezielle 96er-Sequenzierplatten für den *ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer* (beides von der Firma Applied Biosystems) übertragen: nach Anlegen einer Spannung können in diesem Gerät gleichzeitig 48 verschiedene Proben in parallel angeordneten Kapillaren elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Kapillaren waren mit dem *Performance Optimized Polymer 7 (POP-7)* gefüllt und 36 cm lang. Bei der Passage der die Kapillaren umschließenden Detektionseinheit wird der an das DNA-Fragment gebundene Farbstoff durch einen Argonionen-Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die in die Detektionseinheit eingebundene *charge-couple device (CCD)*-Kamera erfasst die Fluoreszenz und wandelt diese in ein elektrisches Signal um. Da kleinere Fragmente in der Elektrophorese schneller wandern und diese Detektionseinheit somit früher passieren als größere, kann die angegliederte *ABI PRISM 3730 Data Collection Software v3.0* aus der Information der Kamera in Abhängigkeit von der Zeit das Elektropherogramm erstellen (Beispiele siehe Abbildung 2.1 und 2.2): die y-Achse entspricht dabei der relativen Farbstoffkonzentration (jede Base ist in einer anderen Farbe markiert), auf der x-Achse wird die Zeit aufgetragen.^{80,81}

2.7.4. Auswertung der Sequenzen

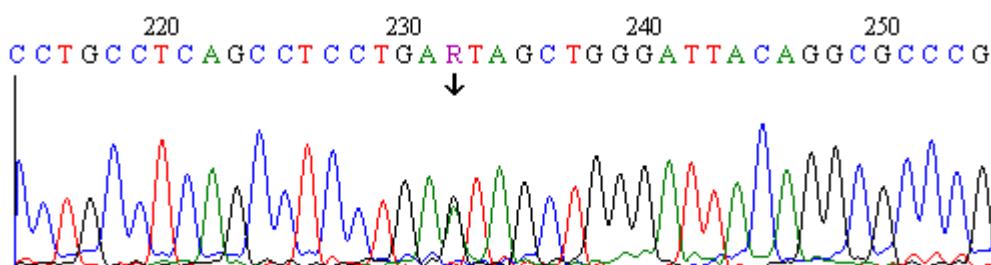
Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des *BioEdit Sequence Alignment Editors*. Die Sequenzen eines jeden Fragments wurden auf Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden der Kontrollpopulation verglichen: Waren zwei verschiedenfarbige Kurven an der Stelle einer bestimmten Base überlagert und war die Amplitude an der betreffenden Stelle halbiert (Beispiel Abbildung 2.1b), wurde der jeweilige Proband als heterozygot klassifiziert; ein vollständiger Ersatz einer Kurve durch eine andersfarbige zeigte eine Homozygotie an (Beispiel Abbildung 2.1c). Änderungen in der Sequenz können neben einem Austausch einer Base durch eine andere zudem in Form von Basendeletionen auftreten: im heterozygoten Fall führt dieses zu einer Änderung des kompletten nachfolgenden Musters im Elektropherogramm (Beispiel Abbildung 2.2b), bei homozygoten Probanden fehlt die betreffende Kurve komplett (Beispiel Abbildung 2.2c). Lag die Häufigkeit einer Änderung über 3 %, wurde die untersuchte Stelle als *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* gewertet. Bei der Auswertung der Sequenzen wurde zudem die ausreichende Überlappung der einzelnen Fragmente kontrolliert.

Abb. 2.1 a-c SNP in Form eines Basenaustausches

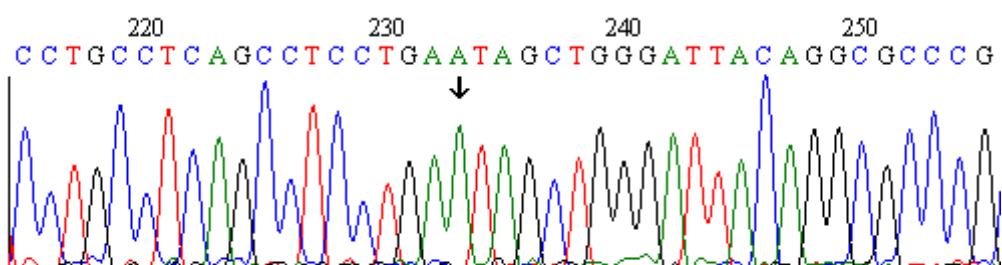
a. Wildtyp



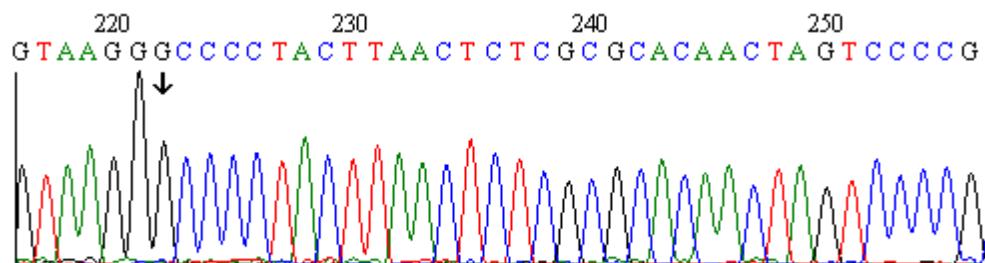
b. heterozygoter Mutationstyp



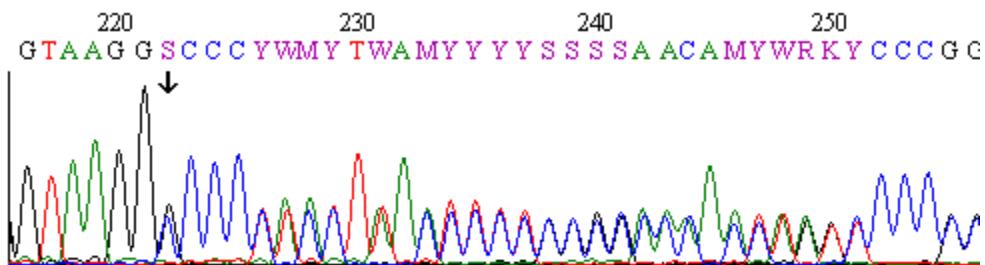
c. homozygoter Mutationstyp

**Abb. 2.2 a-c SNP in Form einer Deletion**

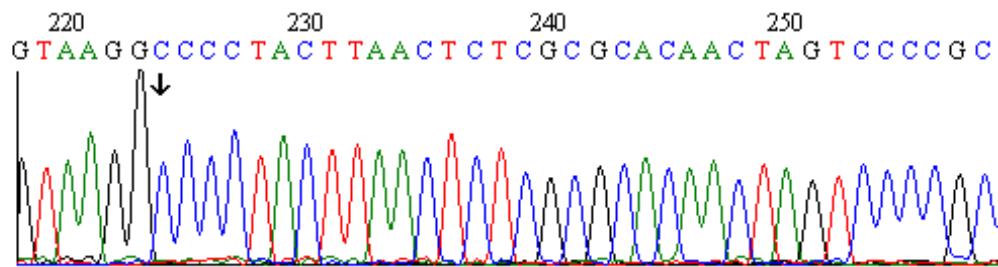
a. Wildtyp



b. heterozygoter Mutationstyp



c. homozygoter Mutationstyp



2.8. Bestimmung der SNPs für die Genotypisierung

Aus den SNPs aus dem Mutationsscreening (im Fall von IL-15R α) bzw. aus der Datenbank von *innateimmunity.de* (im Fall von STAT-1) wurden die SNPs, die in der oben beschriebenen Subpopulation aus Dresden (siehe 2.1.) genotypisiert (siehe 2.11.) werden sollten, ausgewählt.

Für die Gene IL-15R α und STAT-1 wurden die SNPs für die Genotypisierung durch das Programm *Haploview* ermittelt: aus den im Mutationsscreening ermittelten Verteilungsmuster der einzelnen SNPs wird ihr jeweiliges Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium, LD*) untereinander berechnet. Aus einer Gruppe miteinander verknüpfter Polymorphismen wird ein sog. *tagging SNP* für die Genotypisierung ausgewählt. Die später gewonnenen Daten der *tagging SNPs* repräsentieren somit die Daten mehrerer miteinander gekoppelter SNPs.⁸²

In dieser Arbeit wurde das LD von SNPs mit einer Häufigkeit des selteneren Allels (*minor allele frequency, MAF*) von über 10 % in der Kontrollpopulation bestimmt und die daraus ermittelten *tagging SNPs* genotypisiert. Zudem wurden einzelne weitere SNPs genotypisiert, die aufgrund ihrer Lage im Promotor oder in einem Exon eine erhöhte funktionelle Relevanz vermuten ließen.

Für das Gen IL-15 wurden die von Kurz et al beschriebenen SNPs repliziert.⁷⁰

Zeigte ein SNP in der Dresden-Population signifikante Assoziationen zu mindestens einem der untersuchten Krankheiten und Merkmale, wurde der entsprechende SNP auch in der München-Population, gegebenenfalls auch in der Leipzig-Population analysiert.

2.9. PEP-PCR

Bei der *Primer Extension Preamplification PCR (PEP-PCR)* binden 15 Basenpaar lange Primer an die eingesetzte DNA und vervielfältigen diese nach dem gleichen Prinzip einer Standard-PCR (siehe 2.3.). Da diese N₁₅-Primer degeneriert sind (d.h. an jeder Stelle kann jede der vier Basen stehen), sind die Bindungsloci im Gegensatz zur Standard-PCR nicht definiert und es kommt während der PCR zu einer unspezifischen DNA-Amplifikation des ganzen Genoms.⁸³

Die Zyklen der Amplifikation unterscheiden sich dabei geringfügig von denen einer Standard-PCR: Die Temperatur ist während der Annealingphase mit 37 °C weniger stringent und steigt dann langsam kontinuierlich auf die Extensionstemperatur von 55 °C – im Gegensatz zu 72 °C bei der Standard-PCR – an. Da bei der PEP-PCR in der Regel längere DNA-Stränge als bei der Standard-PCR amplifiziert werden, dauern zum einen die einzelnen Phasen jedes Zyklus' länger, zum anderen ist aus diesem Grund die Anzahl der Zyklen höher (mind. 50).⁸³

Durchführung: Die PEP-PCR wurde im Vorfeld dieser Arbeit benutzt, um die extrahierte DNA der Patienten aus der Studienpopulation zu vervielfältigen. Der Ansatz bestand immer aus den in Tabelle 2.8 aufgeführten Substanzen und wurde in dem unter Tabelle 2.9 näher beschriebenen Programm in einem Thermocycler der Firma Eppendorf amplifiziert.

Tab. 2.8 Ansatz einer PEP-PCR

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration
Puffer Y	5	10 x
MgCl ₂	5	25 mM
dNTPs	5	je 2 mM
N ₁₅ -Primer	10	200 µM
DNA	5	1 ng / µl
molekularbiolog. H ₂ O	19	
Taq-Polymerase	1	5 U / µl

Tab. 2.9 Temperatur-Zeit-Programm einer PEP-PCR

Schritt		Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung		94 °C	3 min
Denaturierung	50 x	94 °C	1 min
Annealing		37 °C kontinuierlicher Anstieg auf 55 °C	2 min
Elongation		55 °C Primer-Extension	4 min
abschließende Elongation		72 °C	5 min
Lagerung		4°C	

2.10. Multiple Displacement Amplification (MDA)

Durch die *Multiple Displacement Amplification (MDA)* kann sowohl lineare als auch zirkuläre DNA in einer isothermen PCR-unabhängigen Reaktion amplifiziert werden.^{84,85}

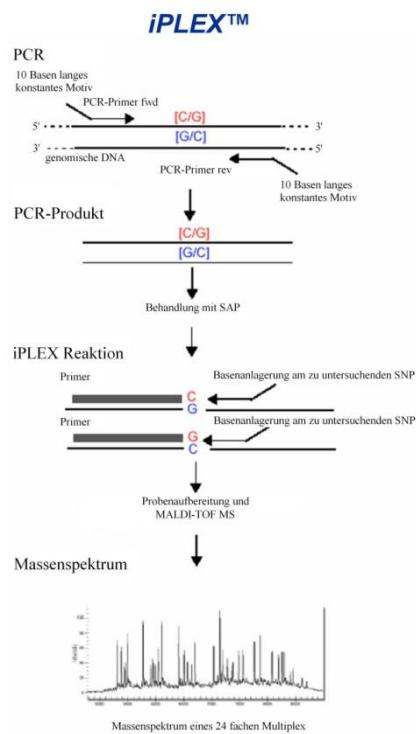
Nach der Anlagerung degenerierter Hexamer-Primer an verschiedene zufällige Stellen der DNA beginnt die zugefügte DNA-Polymerase des Bakteriophagen *Phi29* bei geeigneten Puffer- und Temperaturbedingungen mit Hilfe ebenfalls hinzugegebener dNTPs die Replikation der zuvor hitzedenaturierten DNA.^{85,86} Der entstehende komplementäre Strang löst sich mit weiterem Fortschreiten der Replikation von seiner Matrize und dient dann selbst der Anlagerung neuer Primer, sodass durch diese exponentielle Vervielfältigung nach 16-18 h die ca. 500 fache Menge doppelsträngiger DNA entsteht.⁸⁶ Durch die zusätzliche Exonukleasefunktion der *Phi29*-Polymerase wird das durchschnittlich 10 kb lange Produkt⁸⁵ korrekt gelesen und weist dadurch eine niedrige Fehlerrate auf.⁸⁴ Nach der Inaktivierung der *Phi29*-DNA-Polymerase kann die entstandene DNA sofort verwendet bzw. bei -20 °C oder 4 °C gelagert werden.⁸⁶

Durchführung: Diese Methode wurde im Vorfeld dieser Arbeit benutzt, um das gesamte Genom der Patienten aus der Studienpopulation zu vervielfältigen. Sie wurde mit Hilfe des *GenomiPhi Amplification Kits* von GE Healthcare (ehemals Amersham Biosciences) durchgeführt. Gemäß Protokoll wurden 1 µl der in TE-Puffer gelösten DNA (5 ng / µl) und 9 µl *Sample Buffer* 3 min auf 95 °C erhitzt. Nach der Abkühlung auf 4 °C wurde eine Mischung aus 9 µl *Reaction Buffer* und 1 µl *Enzyme Mix* zugegeben und bei 30 °C für 16-18 h inkubiert. Nach der Enzymdeaktivierung bei 65 °C für 10 min wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

2.11. Genotypisierung

Die an den Polymorphismen vorliegenden Genotypen der Studienpopulation wurden primär mit Hilfe des *iPLEX™ Assays* der Firma Sequenom als Auftragsarbeit am Helmholtz Zentrum München bestimmt: nach einer PCR-Amplifikation des DNA-Bereichs um den zu analysierenden SNP und dem anschließenden Abbau überschüssiger dNTPs durch das Enzym *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* erfolgt die zentrale Primer-Extensions-Reaktion (*iPLEX™ Reaktion*). Das entstandene Produkt wird aufgereinigt, auf einen Chip aufgetragen und in einem MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert.⁸⁷

Abb. 2.3 *iPLEX™ Assay* (nach Oeth⁸⁷)



2.11.1. Versuchsplanung

Der Versuchsansatz eines *iPLEX™ Assays* wird durch die Software *MassARRAY Assay Designer 3.0* der Firma Sequenom konzipiert: die Voraussetzungen für die PCR-Primer sind dieselben wie die für eine Standard-PCR (siehe 2.3.), außer dass an jeden Primer zusätzlich ein 10 Basen langes konstantes Motiv (sog. *tag*) an den sequenzspezifischen Teil angefügt wird (siehe Abb. 2.3).⁸⁷ Dieses zusätzliche Sequenzmotiv dient zum einen der gleichmäßigeren Amplifikation, da, im Gegensatz zur Standard-PCR, meist mehrere PCR-Reaktionen in einem Ansatz durchgeführt werden (sog. *Multiplex*), zum anderen wird

hierdurch die Masse der Primer künstlich soweit erhöht, dass sie bei der späteren MALDI-TOF-Analyse (siehe 2.11.7.) von den Produkten unterschieden werden können.

Die Primer für die Primer-Extensions-Reaktion (siehe 2.11.5.) werden ebenfalls mit Hilfe des Programms *MassARRAY Assay Designer 3.0* der Firma Sequenom so konzipiert, dass sie jeweils genau eine Base vor dem zu untersuchenden SNP enden, nicht untereinander interagieren und die bestmögliche Bindungsspezifität und -qualität im PCR-Produkt erzielen.⁸⁷

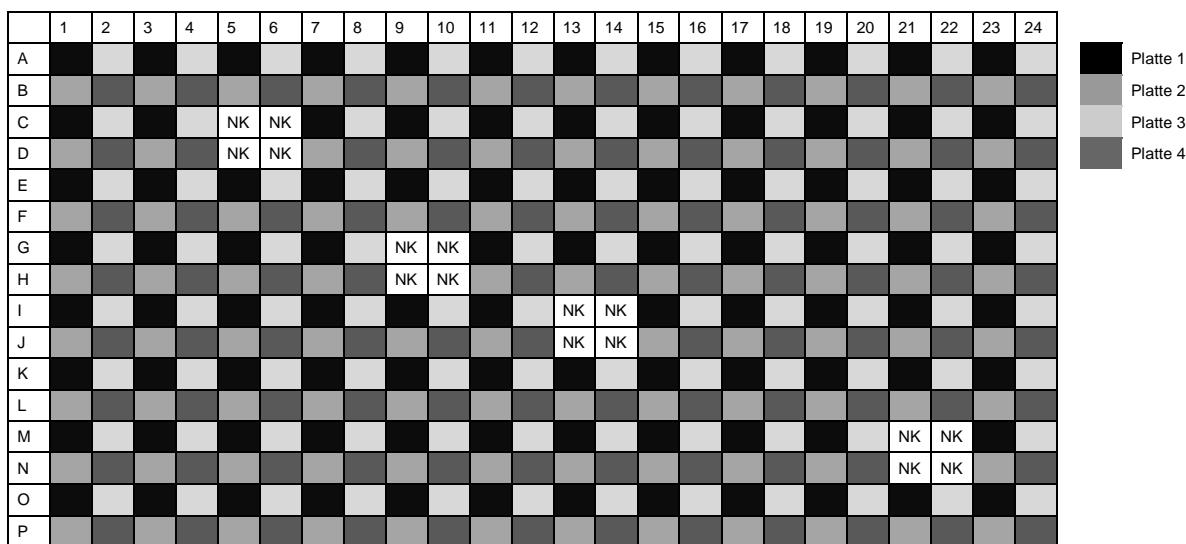
2.11.2. Vorbereitung der Platten

Die durch PEP-PCR oder MDA vervielfältigte DNA der Studienpopulation wird zunächst nach vorgegebenem Schema (siehe Abbildung 2.4) auf 96er Platten der Firma PeqLab angeordnet.

Abb. 2.4 Anordnungsmuster auf den 96er Platten (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												

Anschließend wird die DNA auf eine Konzentration von 1 ng / µl verdünnt und unter Beibehaltung des Verteilungsmusters auf 96er *Clusterplates* der Firma Qiagen überführt. Je vier solcher 96er „Mutterplatten“ werden zu einer 384er „Tochterplatte“ (Mikrotiterplatte der Firma ABgene) zusammengeführt, indem je 5 µl der DNA-Lösung mit Hilfe einer Pipettierstation der Firma Tecan übertragen werden. Durch das gewählte Anordnungsschema der Proben auf den 96er Platten liegen die jeweiligen Negativkontrollen nun in einem Rechteck nebeneinander (siehe Abbildung 2.5). Die DNA-Lösungen trocknen anschließend über Nacht bei Raumtemperatur, sodass sie dann in einer Konzentration von 5 ng / Probe vorliegen und so für die weiteren Genotypisierungsschritte verwendet werden können.

Abb. 2.5 Verteilungsmuster der vier 96er Platten auf der 384er Platte (NK=Negativkontrolle)

2.11.3. PCR

Um die Genotypen der Studienpopulation bestimmen zu können, wird zuerst ein kleiner Bereich (ca. 100 bp) um den SNP mit Hilfe einer PCR (siehe 2.3.) amplifiziert. In dieser Arbeit wurde hierfür der *HotStar Taq® plus Kit* der Firma Qiagen verwendet.

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit den getrockneten DNA-Proben der Studienpopulation werden hierzu jeweils 5 µl des in Tabelle 2.10 beschriebenen 480 fachen *Master Mix*' zugefügt. Nach der Wiederauflösung der DNA wird diese im Thermocycler unter den in Tabelle 2.11 beschriebenen Bedingungen amplifiziert.⁸⁷ In dieser Arbeit wurden hierzu eine Pipettierstation der Firma Tecan und ein Thermocycler der Firma MJ Research benutzt. Die verwendeten PCR-Primer sind aus Tabelle 2.12 ersichtlich.

Der Erfolg der PCR wurde anschließend durch ein stichprobenartiges Auftragen auf ein 3 %iges Agarosegel untersucht.

Tab. 2.10 Ansatz einer PCR zur iPLEX™-Reaktion

Reagenz	Konzentration des Reagenz	Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen im Reaktionsansatz (µl)	Volumen im 480 fachen <i>Master Mix</i> (µl)
HPLC-H ₂ O			2,850	1368
PCR Puffer	10 x	1,25 x	0,625	300
MgCl ₂	25 mM	1,625 mM	0,325	156
dNTP Mix	25 mM	500 mM	0,100	48
Primer-Mix	je 500 nM	100 nM	1,000	480
<i>HotStar Taq®</i>	5 U / µl	0,1 U / µl	0,100	48

Tab. 2.11 Temperatur-Zeit-Programm einer iPLEX™-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	94 °C	15 min
Denaturierung	45 x 94 °C	20 sec
Annealing	56 °C	30 sec
Elongation	72 °C	1 min
abschließende Elongation	72 °C 20 °C	3 min 1 min

Tab. 2.12 PCR-Primer für die iPLEX™-PCR der Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1

SNP		Primer 2	Primer 1
IL-15			
Dresden (n=1940)			
1	C-80T	ACGTTGGATGTGGATCATCTTACCC TAG	ACGTTGGATGTGAAGAAGAGCTGGCTATGG
2	G20A	ACGTTGGATGCCGTGGCTTGAGTAATGAG	ACGTTGGATGACTCTGAGATTGAGACGACC
3	A10284G	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden	
4	C13467A	ACGTTGGATGTGATCCAAGGCTGATCATC	ACGTTGGATGCTCTGCTGCTTAGACATAAC
5	A13815T	ACGTTGGATGCAATGAGAGGCCAGTAGTCAG	ACGTTGGATGTACCAATGCTGCAGGTCAAC
IL-15Ra			
Dresden (n=1940)			
1	G-2689A	ACGTTGGATGGCTCAATCTGTATGGTACTG	ACGTTGGATGGATCACACCACTGCACTCTA
2	G-1294A	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden	
3	C-736T	ACGTTGGATGTCAGAGGTGAAGCACTGTGG	ACGTTGGATGTTGCTCCCTAGAAAATGCC
4	G-243A	ACGTTGGATGTAAGGCTCTGGGCCCCAC	ACGTTGGATGTCAGGGAGGAGCCCCG
5	G-91A	ACGTTGGATGAGGTGGCGAGCGCTGCTCTG	ACGTTGGATGCCAAAGCAAAGCGAAAGCG
6	G208A	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden	
7	T486C	ACGTTGGATGAGGAGTAGTTCTCCCGGAC	ACGTTGGATGTTCTCCAGGGCCCTGGACT
8	A862G	ACGTTGGATGACGGAATGAGCAGATTCTAG	ACGTTGGATGATAGAGCTAGACCCCTGCTAC
9	A10843G	ACGTTGGATGGCCCTCAGTCTCTTAAAG	ACGTTGGATGCTGTCAGTGAGAATTG
10	G11284A	ACGTTGGATGCATTGTCGGCTTGTCAAC	ACGTTGGATGTTCAAGCGTAAAGCCG
11	G11426A	ACGTTGGATGTTGTTAGCCTCAGACCTC	ACGTTGGATGCAAGGCTGCACAGAGAGAAG
12	G12012A	ACGTTGGATGTCAGGCTCAGTCTCAAATC	ACGTTGGATGACTGACTGATATCCACACTGCG
13	T13782C	ACGTTGGATGGGAAGGTCAGAAACATTCTCG	ACGTTGGATGAGTCTGCAAGGATTGGTGAGC
14	G13946C	ACGTTGGATGACCACTATTCTGCAC	ACGTTGGATGCAAGAATAAGAACGTCACAC
15	A17088C	ACGTTGGATGACCCCCCTCTCAGACAACAG	ACGTTGGATGGCAAGCGAGTGCTAACCTG
16	T17973C	ACGTTGGATGAAAAGAGGTGCAACCTGCTG	ACGTTGGATGGGTAGCTCTAGCTGTCAGG
17	C18014T	ACGTTGGATGAGCTGGCACCCCAAATAAGG	ACGTTGGATGGCACCTGTAGTTGGATGC
18	T18047C	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden	
19	C21171T	ACGTTGGATGTCCTCTGCAAGAGTTAGAC	ACGTTGGATGGAATTCCAGGGTGAGCTAC
20	C24022G	ACGTTGGATGTCATATTGTCCTGGTGGTC	ACGTTGGATGTCAGGCGATGCCGTAAATCCT
21	T24762G	ACGTTGGATGTAAAAACCCCTGCCCGAATC	ACGTTGGATGCAAGAGAGCTTGGGTATGTC
München (n=1159)			
10	G11284A	ACGTTGGATGCATTGTCGGCTTGTCAAC	ACGTTGGATGGGAGCGGTACATTGTAAC
11	G11426A	ACGTTGGATGAAGGCTGCACAGAGAGAAG	ACGTTGGATGACTGGTGTGTTAGCCTCAG
13	T13782C	ACGTTGGATGGGAAGGTCAGAAACATTCTCG	ACGTTGGATGTCCTGAGTCTGCAGGATTG
15	A17088C	ACGTTGGATGGCAAAAGCGAGTGTCAACCTG	ACGTTGGATGACCCCCCTCTCAGACAACAG
19	C21171T	ACGTTGGATGTCCTCTGCAAGAGTTAGAC	ACGTTGGATGGAATTCCAGGGTGAGCTAC
21	T24762G	ACGTTGGATGTAAAAACCCCTGCCCGAATC	ACGTTGGATGCAAGAGAGCTTGGGTATGTC
Leipzig (n=1165)			
15	A17088C	ACGTTGGATGGCAAAGCGAGTGCTAACCTG	ACGTTGGATGACCCCCCTCTCAGACAACAG
STAT-1			
Dresden (n=1940)			
1	T-5741C	ACGTTGGATGTGTGAGGGTGCAATTGTGAC	ACGTTGGATGCCATGGATATGCCATATAG
2	G-4831A	ACGTTGGATGTTCTCTAAACGCTGTGCTG	ACGTTGGATGAGAGGTGTGGACGGGATAAG
3	T-4410C	ACGTTGGATGTGTGCCACGCTGGAACTG	ACGTTGGATGTTCTGCAAACACAGCACGTC
4	A-3758G	ACGTTGGATGTTGCCAGCTGTGTC	ACGTTGGATGAGTGACGGTAATGGGAAGG
5	G-306A	ACGTTGGATGTTAAACTGCAACCACCTCCC	ACGTTGGATGAGGTCAAGATGGTGTGAAG
6	T62C	ACGTTGGATGCCAGGTACTGTCTGATTTC	ACGTTGGATGTCAGTGGTACGAACCTCAGC
7	ATT569DEL	ACGTTGGATGGGGACCCCTCACTTCTATG	ACGTTGGATGTTAACTGATAGGTGTCTAC
8	T1177A	ACGTTGGATGATTGAGCACACACTTATTGG	ACGTTGGATGCTTATGCTATATTACTGATGC
9	G19209A	ACGTTGGATGCTGATGGATGGATTATAGC	ACGTTGGATGCTAGGCCATTACTGTGGTG
10	T19856C	ACGTTGGATGCTCTCAAAGTCTCAGCTC	ACGTTGGATGAGCGTCCCATCTATAGTCAC
11	T23964G	ACGTTGGATGTGACAGCTCAGAGATTGACG	ACGTTGGATGTTCCCTCAGCAGAGTCCTC
12	A24164G	ACGTTGGATGACAAATGGCCCTCGTTCAG	ACGTTGGATGTTCCAAGAGATCCCTCC
13	T24631C	ACGTTGGATGTTCAACCGTAAGATGCGAAG	ACGTTGGATGGACACTCATGGACAACTCAG
14	G28944DEL	ACGTTGGATGCTCCTCTAAAGAGAGGACAG	ACGTTGGATGAAGGCAAAGTCAGCTGATGG

Tab. 2.12 (Forts.) PCR-Primer für die iPLEX™-PCR der Gene IL-15, IL-15R α und STAT-1

15	G29005C	ACGTTGGATGAGGGAAAGCGGAAACATCAC	ACGTTGGATGAAGGACTGTCCTCTTTAG
16	G34754A	ACGTTGGATGTAAGCCTAGGTGTGAGCATG	ACGTTGGATGTCTCTGGTGCTTTCTGTCC
17	C35266T	ACGTTGGATGTAAGTGTGTGCTCAGAGG	ACGTTGGATGTGAGCACTGCACCTCCTTG
18	G38812A	ACGTTGGATGGCAGAATTACTAAGAACCCC	ACGTTGGATGTAAGTTGTCCTGGTCAAGGC
19	A39134C	ACGTTGGATGATAACCGTGGAAATAAGAGGGC	ACGTTGGATGAAGGCTTGATTAGCCCAGG
20	T39455C	ACGTTGGATGAGCAAATTGCTGCAACCTG	ACGTTGGATGCAGTAAGATGCATGATGCC
München (n=1159)			
5	G-306A	ACGTTGGATGTTAAACTGCAACCACCTCCC	ACGTTGGATGAGGTCAAGATGGGGTGTAAAG
17	C35266T	ACGTTGGATGTAAGTGTGTGCTCAGAGG	ACGTTGGATGTGAGCACTGCACCTCCTTG
19	A39134C	ACGTTGGATGATAACCGTGGAAATAAGAGGGC	ACGTTGGATGAAGGCTTGATTAGCCCAGG

2.11.4. Abbau überschüssiger dNTPs

Durch die Zugabe des Enzyms *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) werden überschüssige dNTPs abgebaut, damit diese die spätere Primer-Extensions-Reaktion nicht stören.⁸⁷

In dieser Arbeit wurde aus der *Shrimp Alkaline Phosphatase*, dem SAP-Puffer und HPLC-H₂O ein 520 facher *Master Mix* angefertigt (siehe Tabelle 2.13) und je 2 µl davon einer PCR-Reaktion zugefügt. Diese Mischung wurde in einem Thermocycler 20 min bei 37 °C zur Enzymreaktion inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 85 °C deaktiviert (5 min lang) und die Reaktion auf 20 °C heruntergekühlt.⁸⁷ Sowohl das Enzym als auch der zugehörige Puffer stammten in dieser Arbeit aus dem *iPLEX™ Reagent Kit* der Firma Sequenom; zur Durchführung dieses Arbeitsschrittes wurden zudem ein Pipettierroboter der Firma Beckman Coulter und ein Thermocycler der Firma MJ Research verwendet.

Tab. 2.13 SAP-Mix

Reagenz	Konzentration des Reagenz	Volumen im Reaktionsansatz (µl)	Volumen im 520 fachen <i>Master Mix</i> (µl)
HPLC-H ₂ O		1,530	795,6
SAP Puffer	10x	0,170	88,4
SAP Enzym	1 U / µl	0,300	156

2.11.5. Primer-Extensions-Reaktion

In der Primer-Extensions-Reaktion wird an den jeweiligen Extensionsprimer eine einzelne Base angelagert (*single base extension, SBE*). Da der Extensionsprimer genau eine Base vor dem zu untersuchenden SNP endet, ist die in der SBE angelagerte Base somit SNP-spezifisch. In dieser Arbeit wurde die Primer-Extensions-Reaktion durch den *iPLEX™ Reagent Kit* der Firma Sequenom realisiert.

Auch wenn eine Durchführung der SBE mit Standard-ddNTPs, wie sie beispielsweise bei der Sequenzierung nach Sanger (siehe 2.7.) verwendet werden, generell möglich ist, ist sie in der Routine aufgrund der geringen Massenunterschiede der Produkte nicht anwendbar. Um

diese Schwierigkeit zu umgehen, werden in dem *iPLEX™ Assay* in der Masse modifizierte Terminatoren verwendet, sodass der Massenunterschied von Produkten mit unterschiedlichen Basenendungen mindestens 15 Dalton beträgt und die verschiedenen Extensionsprodukte eines Reaktionsansatzes in der späteren MALDI-TOF-Analyse (siehe 2.11.7.) besser unterschieden werden können. Die genauen Massenunterschiede sind aus Tabelle 2.14 ersichtlich.⁸⁷

Tab. 2.14 Massenunterschiede der iPLEX™-Produkte

Terminator	A	C	G	T
A	0	-24	16	55,9
C	24	0	40	79,9
G	-16	-40	0	39,9
T	-55,9	-79,9	-39,9	0

Für die Primer-Extensions-Reaktion mit dem *iPLEX™ Reagent Kit* werden jedem Reaktionsansatz der Mikrotiterplatte 2 µl des in Tabelle 2.15 beschriebenen 520 fachen *Master Mix'* zugefügt.⁸⁷ Die verschiedenen Primer der Multiplex-Ansätze liegen dabei in unterschiedlichen Konzentrationen vor (je höher die Primermasse umso höher die Konzentration), um in der späteren MALDI-TOF-Analyse auch bei größeren Massen das Hintergrundsignal zu übertreffen.⁸⁷ Anschließend läuft die Reaktion in einem Thermocycler unter dem in Tabelle 2.16 beschriebenen Programm.⁸⁷

Die in dieser Arbeit verwendeten Extensionsprimer sind aus Tabelle 2.17 ersichtlich. Der *Master Mix* wurde durch einen Pipettierroboter der Firma Beckman Coulter in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte verteilt; für die Realisierung der Primer-Extensions-Reaktion wurde ein Thermocycler der Firma MJ Research benutzt.

Tab. 2.15 Ansatz einer Primer-Extensions-Reaktion

Reagenz	Konzentration des Reagenz	Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen im Reaktionsansatz (µl)	Volumen im 520 fachen <i>Master Mix</i> (µl)
HPLC-H ₂ O			0,755	392,60
iPLEX Puffer	10x	0,222x	0,200	104,00
iPLEX Termination Mix		1x	0,200	104,00
Primer-Mix	7 µM - 14 µM	0,625 nM - 1,25 nM	0,804	418,08
iPLEX Enzym		1x	0,041	21,32

Tab. 2.16 Temperatur-Zeit-Programm einer Primer-Extensions-Reaktion

Schritt		Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung		94 °C	30 sec
Denaturierung	40 x	94 °C	5 sec
Annealing	5 x	52 °C	5 sec
Elongation		80 °C	5 sec
abschließende Elongation		72 °C	3 min
		20 °C	1 min

Tab. 2.17 Extensionsprimer für die Primer-Extensions-Reaktion der Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1

SNP		Extensionsprimer
IL-15		
Dresden (n=1940)		
1	C-80T	GATTGTATTGAGGAGGCAT
2	G20A	AGTAATGAGAATTCGGTAAGAA
3	A10284G	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden
4	C13467A	AAAAAACTTGTTTGACAGCACATT
5	A13815T	CCAGTAGTCAGTGGTTCACAC
IL-15Ra		
Dresden (n=1940)		
1	G-2689A	gcCGGAGTCTCTTCTGTC
2	G-1294A	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden
3	C-736T	CCCTCTCCCCCTCCG
4	G-243A	ACGGCCCATGCGTCCC
5	G-91A	gaTGCTCTGGGACCTGCG
6	G208A	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden
7	T486C	TCCGAGGACCGCGTGCT
8	A862G	GTCGGGGCAGCCAGAGGAAGG
9	A10843G	CCTCAGTCTCTAAAGTCTCA
10	G11284A	TGGCCTTGTCAACACGCACTC
11	G11426A	GACCTCAGCACAGATCCCTGACC
12	G12012A	CGTCTCAAATCAAAGCA
13	T13782C	AAACTTCTCGAGGACATT
14	G13946C	CTATTAATTCTGCACATAAACAC
15	A17088C	aTCTCAGACAACAGCCAAGA
16	T17973C	ggGCCAGCTCTGGGTTCA
17	C18014T	CAAATAAGGGCTCAAGGT
18	T18047C	könnte durch den iPLEX™ Assay nicht genotypisiert werden
19	C21171T	TAGACTTCCCCATGAGAAAAGAG
20	C24022G	GCTCAAGCGATCCTCCCAC
21	T24762G	CGTCCCTCATCCTAACTT
München (n=1159)		
10	G11284A	TGTTCAACACGCACTC
11	G11426A	tAGAGAAGACCCATCTCAG
13	T13782C	TCAGAAACTTCTCGAGGACATT
15	A17088C	TGCTGTGAGTCCCCAG
19	C21171T	TAGACTTCCCCATGAGAAAAGAG
21	T24762G	CCGTCCCTCATCCTAACTT
Leipzig (n=1165)		
15	A17088C	TGCTGTGAGTCCCCAG
STAT-1		
Dresden (n=1940)		
1	T-5741C	TGTGCAAAGAAAAAAACTCA
2	G-4831A	AACGCTGTGCTGTGATGACCT
3	T-4410C	TGGGAACCTGGCTCTGTTAC
4	A-3758G	ccACTTGTGAAATATAATTTCCTCT
5	G-306A	TCCCACCCCTGGAAACATG
6	T62C	ATGGGAAAATGTCTCATCATA
7	ATT569DEL	GGACGTTTAAATTAGCAAATAA
8	T1177A	AATAGAGACTAACCTCCATTATGTT
9	G19209A	TATAGCTTCATCAGTTCTCA
10	T19856C	ggGCCCTCCATCTTCCA
11	T23964G	GTCCACTTGAGGGCAG
12	A24164G	GAGCAGAAGCACGTTCC
13	T24631C	AAGAATACAAAGCCCACCA
14	G28944DEL	TAAAGAGAGGACAGTCCTTTAATGC

Tab. 2.17 (Forts.) Extensionsprimer für die Primer-Extensions-Reaktion der Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1

15	G29005C	AAACATCACAAAGCCTTACCATCTGCT
16	G34754A	tCACTACCCTGAGATGACAATGCCT
17	C35266T	ATCCCAGGGCTGTCTG
18	G38812A	GCAGAATTACTAAGAACCCCTTCACC
19	A39134C	TGGAATAAGAGGGCCTTCAGCA
20	T39455C	TGTTGATAGCAAGTGAATTTTC
München (n=1159)		
5	G-306A	cacaTCCCACCCCTGGAAACATG
17	C35266T	ATCCCAGGGCTGTCTG
19	A39134C	ggacTAAGAGGGCCTTCAGCA

2.11.6. Aufbereitung der Platten für die MALDI-TOF

Das Produkt der Primer-Extensions-Reaktion wird anschließend aufgereinigt, da überschüssige positiv geladene Pufferbestandteile die spätere MALDI-TOF-Analyse (siehe 2.11.7.) beeinträchtigen können.⁸⁸

In dieser Arbeit wurden hierfür mit Hilfe von Platten mit genau definierten Vertiefungen (sogenannte *Dimple Plates*) je 6 µg eines Kationenaustauschharzes (*SpectroCLEAN* von Sequenom) in ein well gegeben und 18 µl HPLC-H₂O zugefügt. Die Platten wurden anschließend 10 min zum Mischen auf einem Rotator befestigt und daraufhin 5 min bei 3000 rcf zentrifugiert.

Nach dieser Aufreinigung werden 8-12 nl – die genaue Menge ist abhängig von der jeweiligen Viskosität – der Reaktionslösung mit Hilfe eines Nanoliterspotters der Firma Sequenom auf einen Siliziumchip der Firma Sequenom übertragen, der aus mit einer Säure (3-Hydroxypicolinsäure, 3-HPA) beladenen Matrixspots besteht. Neben den 384 Matrixspots, auf welche die zu analysierenden Proben gespottet werden, finden sich auf diesem Chip 10 weitere Matrixspots, auf die jeweils ein Kalibrant (aus dem *iPLEX™ Reagent Kit* der Firma Sequenom) transferiert wird: die darin enthaltenen Oligonukleotide bekannter Masse dienen der Kalibrierung des Analysesystems.⁸⁸

2.11.7. MALDI-TOF-Analyse

Die MALDI-TOF-Analyse ermöglicht die massenspektrometrische Unterscheidung der Primer-Extensions-Produkte.

Bis zu zehn bespottete Siliziumchips werden auf einen metallischen Probenträger geladen und durch eine Vakuumsschleuse in das Massenspektrometer eingeführt. Die anschließende Kalibrierung des Systems und die Analyse der Proben erfolgen automatisch.

In der *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)* ionisiert unter Hochvakuumbedingungen ein wenige Nanosekunden dauernder Laserpuls die in die Matrix eingebetteten Proben. Die Aufgabe der Matrix besteht hierbei darin, durch die Absorption der

Laserenergie die Verdampfung der Probe zu erleichtern und eine photolytische Schädigung der DNA-Fragmente sowie eine Interaktion der DNA-Fragmente untereinander zu verhindern; zusammenfassend ist die Matrix also dafür verantwortlich, die Ionisierung der DNA-Moleküle zu unterstützen.

Die durch den Laserpuls aus der Matrix freigesetzten ionisierten DNA-Fragmente werden in einem elektrischen Feld auf eine gleiche Geschwindigkeit beschleunigt und gelangen durch Fokussierfelder in eine angeschlossene Driftstrecke ohne elektrisches Feld (sog. Flugrohr). Die Zeit, die die einzelnen Moleküle benötigen, um nach dem Verlassen der Ionenquelle am Detektor am Flugrohrende aufzutreffen, nennt man Flugzeit (*time of flight, TOF*); diese wird sehr genau durch den TOF-Analysator gemessen. Da die ionisierten DNA-Fragmente auf das gleiche Potential beschleunigt wurden, aber je nach ihrer endständigen Base (siehe 2.11.5.) unterschiedlich schwer und damit unterschiedlich schnell sind, repräsentiert diese Flugzeit die Masse der einzelnen Moleküle. Die an den TOF-Analysator angegliederte Software weist zum einen der durch die gemessene Flugzeit ermittelten Masse einen Genotyp zu und ermittelt zum anderen durch die unterschiedliche Masse der Extensionsprimer (siehe 2.11.1.) die Zugehörigkeit dieses Genotyps zu einem der Multiplex-Reaktionsansätze.⁸⁸

In dieser Arbeit wurde für die MALDI-TOF-Analyse der Primer-Extensions-Produkte das MassARRAY™ MALDI-TOF Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems verwendet.

2.11.8. Genotypisierung durch die TaqMan® Allelunterscheidung

Diejenigen SNPs, deren Genotypisierung mit Hilfe des *iPLEX™ Assays* nicht möglich war, wurden mit dem *TaqMan® Pre-Developed Assay* der Firma Applied Biosystems im Rahmen einer Auftragsarbeit an dem Institut für Klinische Molekularbiologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel genotypisiert.

Hierbei werden dem initialen PCR-Ansatz kurze Sonden, die aus einer kurzen Nukleotidkette bestehen und zusätzlich zwei Farbstoffe tragen, zugefügt; diese lagern sich noch vor der PCR-Amplifikation an die zu untersuchende DNA an. Obwohl einer der Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt werden kann (sog. *Reporter*), ist zunächst keine Fluoreszenz detektierbar, da die Fluoreszenz des Reporters durch die räumliche Nähe zum *Quencher*-Farbstoff und dem dadurch bedingten Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt wird (siehe Abbildung 2.6 a).

Die dem Ansatz zugefügte AmpliTaq-DNA-Polymerase besitzt neben der üblichen Elongationsaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und bedingt dadurch eine Hydrolyse der Sonde während der Elongationphase der PCR (siehe Abbildung 2.6 b und 2.6 c). Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe aufgehoben, wodurch

der Fluoreszenz-Energietransfer unterbunden und die Fluoreszenz des Reporters ermöglicht wird (siehe Abbildung 2.6 d). Da die Sonde absolut sequenzspezifisch an die DNA bindet, wird über die Quantität der Fluoreszenz eine Alleldifferenzierung und dadurch eine Genotypisierung der DNA-Proben ermöglicht.⁸⁹

Abb. 2.6 a-d TaqMan® PCR (nach Schild⁸⁹)

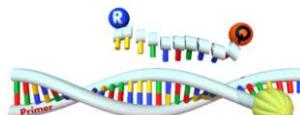
- a. Anlagerung des Primers und der Sonde mit dem *Reporter* (R) und dem *Quencher* (Q)



- b. Elongation des PCR-Produkts und beginnende Hydrolyse der Sonde



- c. vollständige Hydrolyse der Sonde



- d. Fluoreszenz des Reporters



Durchführung: Für diese Arbeit wurde die TaqMan® PCR zur Genotypisierung derjenigen SNPs, die durch den *iPLEX™* Assay nicht genotypisiert werden konnten, benutzt. Die benötigten Primer und Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen, die PCR-Reaktionen in Biometra T1 Thermocyclern durchgeführt, die Fluoreszenzaktivität durch einen ABI PRISM® 7900 HT Sequenzdetektor dargestellt.

Die verwendeten Primer und Sonden sind in den Tabellen 2.18 und 2.19 dargestellt.

Tab. 2.18 PCR-Primer für die TaqMan® PCR der Gene IL-15 und IL-15Ra

SNP	Primer 2 (rev)	Primer 1 (fwd)
IL-15		
A10284G	GCAACTGGGCTAAAAATAAAAGTTATAAAGAAC	AGCTGCCTCCTATGTAAAATTCTTAAGG
IL-15Ra		
G-1294A	GCGGGCGCCTGTAATC	CCTCCTGGGTTCAAGTGATTCTC
G208A	könnte durch den TagMan® Assay nicht genotypisiert werden	
T18047C	CTGGCATCAGCACCTGTAGTT	CAGCAGGGTGCACCTCTT

Tab. 2.19 Sonden für die TaqMan® PCR der Gene IL-15 und IL-15Ra

SNP	Reporter-Sonde	Quencher-Sonde
IL-15		
A10284G	TGTATCTTGATAAAATATT	ATTGTGTATCTTATAAAAATATT
IL-15Ra		
G-1294A	CCTCCTGAATAGCTG	CCTCCTGAGTAGCTG
G208A	<i>konnte durch den TagMan® Assay nicht genotypisiert werden</i>	
T18047C	TGGATGCTCCGTGCAA	TTGGATGCTCCATGCAA

2.12. Statistik

Die aus der Genotypisierung gewonnenen Daten wurden auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht, um mögliche Genotypisierungsfehler zu detektieren (siehe 2.12.1.), und mit aus der Studie ISAAC II gewonnenen Daten (siehe 2.1.) verglichen: hierbei wurden die ermittelten SNPs auf Assoziationen mit den Erkrankungen Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis, atopischer Dermatitis und Atopie gegenüber den untersuchten Substanzen (siehe 2.1.) sowie auf Assoziationen mit dem Auftreten von Symptomen und Begleiterscheinungen dieser Krankheiten wie pfeifende oder keuchende Atemgeräusche und veränderte IgE-Werte untersucht. Für diese Assoziationsanalysen wurden in unterschiedlichen Rechenmodellen verschiedene Daten gegeneinander verglichen (siehe Tabelle 2.20) und eventuelle Unterschiede auf ihre Signifikanz untersucht.

Aus allen genotypisierten Polymorphismen wurden Haplotypen gebildet (siehe 2.12.5.) und ebenfalls auf Assoziationen mit den genannten Krankheiten und Symptomen untersucht.

Die Haplotypen wurden mit Hilfe des Programms *Haploview* bestimmt, alle statistischen Berechnungen wurden ebenfalls mit dem Programm *Haploview* bzw. mit der SAS Software (Version 9.1.3.) bzw. mit der SPSS Software (Version 12.0) durchgeführt.

2.12.1. Hardy-Weinberg-Equilibrium

Das Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) ist ein mathematisches Modell der Allelverteilung in einer fiktiven idealen Population, in der die Allel- und Genotypfrequenzen nicht von Evolutionsfaktoren beeinflusst werden, sondern stets in einem genetischen Gleichgewicht liegen: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$; p und q definieren dabei die erwarteten Allelfrequenzen, die aus den in der Genotypisierung beobachteten Allelfrequenzen berechnet werden. Ist der durch den χ^2 -Test ermittelte p-Wert $\leq 0,05$, ist die Abweichung vom HWE signifikant und ein Genotypisierungsfehler kann nicht ausgeschlossen werden.⁹⁰

In dieser Arbeit wurden alle genotypisierten SNPs mit Hilfe der SAS Software (Version 9.1.3.) bzw. mit der SPSS Software (Version 12.0) bzw. mit dem Programm *Haploview* auf signifikante Abweichungen vom HWE untersucht.

2.12.2. Rechenmodelle

Aus der Komposition verschiedener Rechenmodelle lassen sich detaillierte Aussagen über eine mögliche Assoziation gewinnen.

Der große Vorteil des allelischen und linearen Modells besteht dabei darin, dass keine Gruppen gebildet werden sondern alle Allele bzw. Genotypen gegeneinander verglichen werden können; das lineare Modell zeigt zudem, ob eine lineare Abhängigkeit der Schwere einer Merkmalsausprägung von der Häufigkeit des selteneren Allels besteht, d.h. ob in dem Vergleich des Wildtyps zu dem heterozygoten Mutationstyp zu dem homozygoten Mutationstyp ein – positiver oder negativer – Trend erkennbar ist.

Signifikante Unterschiede im rezessiven Modell zeigen, dass der untersuchte SNP nur in der homozygoten Form zu einer veränderten Merkmalsausprägung führt, das selteneren Allel sich also nach den Mendelschen Erbregeln rezessiv verhält; allerdings kann in diesem Modell der Signifikanznachweis schwierig sein, wenn das selteneren Allel sehr selten und damit im Vergleich unterrepräsentiert ist.

Das dominante Modell dagegen vergleicht den Wildtyp gegen die Summe aus hetero- und homozygoten Mutationstyp.⁹¹

In dieser Arbeit wurden diese Rechenmodelle angewendet, um Assoziationen der genotypisierten SNPs der Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1 mit Asthma, dem asthmatischen Symptom „pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch“, mit allergischer Rhinokonjunktivitis, mit atopischer Dermatitis und mit Atopie zu detektieren. (Assoziationsanalyse mit veränderten IgE-Werten siehe 2.12.4.)

Tab. 2.20 statistische Rechenmodelle

Modell		vergleichene Daten		
Rezessiv	Wildtyp +	heterozygoter Mutationstyp		homozygoter Mutationstyp
Dominant	Wildtyp		heterozygoter Mutationstyp	+ homozygoter Mutationstyp
Allelisch	Allel 1			Allel 2
Linear	Wildtyp	heterozygoter Mutationstyp		homozygoter Mutationstyp

2.12.3. Odd's Ratio und Signifikanztests

Aus der Prävalenz eines Merkmals (beispielsweise Asthma) in den verglichenen Gruppen kann die *Odd's Ratio (OR)* bestimmt werden. Sie ist der Quotient aus den Risikowahrscheinlichkeiten der beiden Gruppen (z.B. häufigeres gegen selteneres Allel); diese dimensionslose Zahl dient der Abschätzung des Risikos eines Effekts (hier: eines Genotyps oder eines Allels) auf die Manifestation einer Merkmalsausprägung (hier: einer

Krankheit oder eines Krankheitssymptoms). Bei einer OR < 1,0 liegt ein protektiver Effekt vor, bei einer OR = 1 führt der Effekt zu keiner Risikoänderung, bei einer OR > 1,0 ist das Risiko erhöht.⁹¹

Das berechnete Konfidenzintervall erlaubt Aussagen über die Zuverlässigkeit eines Wertes, hier der OR. Schließt das Konfidenzintervall der OR den Wert 1,0 nicht mit ein, ist die bestimmte *Odd's Ratio* signifikant.⁹¹

Außerdem war unter den Bedingungen dieser Arbeit der χ^2 -Test als Signifikanztest für das rezessive, das serologische und das allelische Modell besonders aussagekräftig; für das lineare Modell kam hierfür der *Cochran-Armitage-Trend-Test* zum Einsatz. Bei beiden Tests definiert ein p-Wert $\leq 0,05$ die Signifikanz.⁹¹

2.12.4. Analyse der IgE-Werte

Die bisher beschriebenen Tests können bei der Assoziationsanalyse der SNPs mit veränderten IgE-Werten nicht angewandt werden, da die bei den Personen der Studienpopulation ermittelten IgE-Werte stetig sind und damit nicht wie z.B. bei der Frage nach einer Krankheit oder einem Symptom zweidimensionale Daten vorliegen. Um dennoch einen möglichen Zusammenhang zwischen einem SNP und den im Rahmen der ISAAC II Studie bestimmten IgE-Werten detektieren zu können, benutzt man den t-Test. Da bei diesem Test die zu analysierenden Daten in der Studienpopulation normalverteilt sein müssen, dies aber zum Beispiel bei IgE-Werten nicht der Fall ist, werden die IgE-Werte logarithmiert; die daraus entstehenden Mittelwerte sind normalverteilt und können somit verglichen werden. Wie auch bei den unter 2.12.3. beschriebenen Signifikanztests definiert ein p-Wert $\leq 0,05$ einen signifikanten Unterschied. Die Ergebnisse werden entweder in logarithmierter oder delogarithmierter Form dargestellt.⁹¹

In dieser Arbeit wurden t-Tests zur Assoziationsanalyse der genotypisierten SNPs mit veränderten IgE-Werten im serologischen und im allelischen Rechenmodell durchgeführt.

2.12.5. Haplotypanalyse

Haplotypen sind Kombinationen von Allelen unterschiedlicher Polymorphismen, die als Einheit vererbt werden. Im Unterschied zum Genotyp beschreibt der Haplotyp die Kombination der Allele auf *einem* Chromosom und nicht wie der Genotyp auf *beiden* Chromosomen. Aus allen genotypisierten SNPs wurden mit Hilfe des Programms *Haplovview* Haplotypen gebildet und ihre jeweilige Häufigkeit in der genotypisierten Studienpopulation bestimmt.⁸²

Jeder Haplotyp wurde – wie die einzelnen SNPs (siehe 2.12.2 bis 2.12.4.) – auf Assoziationen mit den erwähnten atopischen Krankheiten (Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis, Atopie) oder Assoziationen mit Symptomen und Begleiterscheinungen atopischer Erkrankungen (pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch, veränderte IgE-Werte) untersucht. Hierfür wurde das allelische Modell verwendet.

2.13. Phylogenetischer Vergleich

Durch eine vergleichende Analyse des Genoms verschiedener Arten lassen sich Rückschlüsse auf die biologische Evolution (Phylogenetese) ziehen: unterlag ein DNA-Abschnitt im Laufe der Evolution nur einer geringen Veränderung, ist er also bei verschiedenen Arten sehr ähnlich („konserviert“), kann eine hohe funktionelle Bedeutung dieses Bereichs vermutet werden. Diese potentiell funktionellen Bereiche müssen dabei nicht unbedingt in den Exonen oder dem Promotorbereich eines Gens liegen, sondern kommen auch in intronischen Sequenzen vor.

Das Java-basierte Programm *Vista Genome Browser* stellt die jeweilige prozentuale Ähnlichkeit der genomischen Sequenzen verschiedener Arten grafisch dar und ermöglicht dem Anwender sowohl den Vergleich kleinerer DNA-Abschnitte im Detail als auch größerer Sequenzen im Überblick. In der übersichtlichen Grafik werden neben den konservierten Regionen auch die Exone und UTRs markiert und die Richtung des Gens angezeigt.^{92,93}

In dieser Arbeit wurden mit *Vista Genome Browser* die Sequenzen der Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1 zwischen dem Menschen (*Homo sapiens*), der Maus (*Mus musculus*) als Beispiel einer dem Menschen phylogenetisch fernen Tierart und dem Haushund (*Canis familiaris*) als Beispiel einer dem Menschen phylogenetisch näheren Tierart verglichen.

2.14. Strukturanalyse

Die gefundenen SNPs wurden in Verbindung mit ihrer Position auf mögliche Folgen untersucht: im Promotorbereich und in den Introns lokalisierte Polymorphismen wurden durch das Programm *MatInspector* auf eine veränderte Bindungskapazität und -qualität von Transkriptionsfaktoren untersucht (siehe 2.14.1.), die in den Exons lokalisierten SNPs, die zu einem Aminosäureaustausch führen, wurden bezüglich möglicher Auswirkungen auf die Proteinstruktur analysiert (siehe 2.14.2.).

2.14.1. Strukturanalyse der im Promotorbereich und in den Introns lokalisierten SNPs

Auch wenn die sogenannten nichtkodierenden Abschnitte der DNA – Promotor und Introns – nicht direkt für die Proteinsequenz und -struktur verantwortlich zu sein scheinen, liegen dort regulatorische Elemente, die durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren die Initiation, Elongation und Termination der Transkription steuern. Dieses Bindungsverhalten kann durch Mutationen in den betreffenden Bereichen verändert werden und damit möglicherweise auch die Funktion eines Proteins beeinträchtigen.

Das Programm *MatInspector* detektiert Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren in genomicscher DNA indem es die eingegebene Sequenz auf Übereinstimmungen mit sogenannten Bindungsmatrizen dieser Transkriptionsfaktoren analysiert: die in der zugrundeliegenden Datenbank gespeicherten Matrizen (aktuell 634 Matrizen, eingeteilt in 279 Matrixfamilien⁹⁴⁾ basieren dabei nicht nur auf der Analyse der Basenfolge an der Bindungsstelle, sondern differenzieren zudem durch die Berechnung eines Relevanzindex für jedes einzelne Nukleotid zwischen mehr und weniger relevanten Bereichen innerhalb der potentiellen Bindungsstelle; dieser Relevanzindex erlaubt neben diesen Aussagen über die Konservierung der Nukleotide auch die Definition einer vier Basen langen Bindungskernstelle. Aus diesen Informationen – Basensequenz, Konservierung der einzelnen Nukleotide und Bindungskernstelle – berechnet *MatInspector* die prozentuale Ähnlichkeit der zu analysierenden Sequenz mit jeder Matrix und ermöglicht hierdurch eine qualitative Einschätzung der Ergebnisse: hierzu detektiert das Programm in einem ersten Schritt diejenigen Matrizen, deren Kern mit der zu analysierenden Sequenz zu einem definierten minimalen prozentualen Anteil übereinstimmt (Schwellenwert der „Kernähnlichkeit“), und bestimmt dann in einem zweiten Schritt den Übereinstimmungsgrad dieser ausgewählten vollständigen Matrizen mit der zu analysierenden Sequenz („Matrixähnlichkeit“). Angezeigt werden anschließend nur diejenigen Transkriptionsfaktoren, deren ermittelte Kern- und Matrixähnlichkeit über einem zuvor definierten Schwellenwert liegen. Da beide Strände der zu analysierenden Sequenz parallel auf mögliche

Übereinstimmungen mit den Bindungsmatrizen verglichen werden, werden sowohl auf dem Matrizenstrang als auch auf dem komplementären Strang befindliche potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen detektiert.^{94,95}

In dieser Arbeit wurden im Promotor oder in den Introns lokalisierte SNPs mit *MatInspector* auf ein verändertes Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren untersucht. Der Schwellenwert für die Kernähnlichkeit betrug 70 %.

2.14.2. Strukturanalyse der in den Exons lokalisierten SNPs mit Aminosäureaustausch

Um Auswirkungen einer durch einen SNP veränderten Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine IL-15, IL-15R α und STAT-1 auf die Struktur abschätzen zu können, wurde die voraussichtliche Sekundärstruktur jeder Proteinisoform berechnet.⁹⁶

In dieser Arbeit wurde diese Berechnung der voraussichtlichen Sekundärstruktur mit dem Programm *Protein forecasting (Prof)*, Version 1.0 realisiert.

2.15. Material

2.15.1. Reagenzien und Chemikalien

Agarose	Biozym, Hess
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Betain	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Desoxyadenosintriphosphat dATP [100 mM]	PeqLab, Erlangen
Desoxycytidintriphosphat dCTP [100 mM]	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Desoxyguanosintriphosphat dGTP [100 mM]	PeqLab, Erlangen
Desoxythymidintriphosphat dTTP [100 mM]	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid [10 mg / ml]	Bio-Rad, München
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA [0,5 M]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
H ₂ O bidestillatus	H. Kerndl GmbH, Weißenfeld

Isopropanol 100 %	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat KHCO ₃	Merck, Darmstadt
LiChrosolv H ₂ O	Merck, Darmstadt
(high performance liquid chromatography, HPLC)	
Magnesiumchlorid MgCl ₂ , flüssig [25 mM]	Promega, Mannheim
Marker 100 bp [500 µg / ml]	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Molekularbiologisches H ₂ O	Eppendorf, Hamburg
N ₁₅ -Primer [200 µM]	Metabion, Martinsried
Natriumchlorid NaCl, flüssig [5 M]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid NaOH, Plättchen	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat SDS	Serva, Heidelberg
Polymer POP-7™	Applied Biosystems, Foster City, USA
Primer [unterschiedliche Konzentrationen]	Metabion, Martinsried
Salzsäure HCl, flüssig	Sigma-Aldrich, Steinheim
SpectroCLEAN Resin	Sequenom, Hamburg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan TRIS	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS-HCl, flüssig [1 M]	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.15.2. Enzyme

HotStar Taq®-Polymerase	HotStar Taq® plus Kit (siehe 2.15.4.)
iPLEX™ Enzym	iPLEX™ Reagent Kit (siehe 2.15.4.)
Proteinase-K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Flexigene Protease	Flexigene DNA Kit (siehe 2.15.4.)
Shrimp Alkaline Phosphatase	iPLEX™ Reagent Kit (siehe 2.15.4.)
Taq-Polymerase	Eigenproduktion

2.15.3. Lösungen und Puffer

Puffer Y	200 mM TRIS-HCl (pH 8,55) 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM MgCl_2	PeqLab, Erlangen
TBE-Puffer [5 fach]	270 g TRIS 137,5 g Borsäure 100 ml EDTA ad 5 l H_2O bidestillatus	
Ery-Lyse-Puffer	41,45 g NH_4Cl 5 g KHCO_3 1 ml EDTA ad 5 l H_2O bidestillatus pH 7,4 einstellen mit HCl oder NaOH und autoklavieren	
Proteinase-K-Lösung [20 mg / ml]	10 mg in 500 μl H_2O bidestillatus auflösen	
Proteinase-K-Puffer	5 ml TRIS-HCl (pH 7,5) 2 ml EDTA (pH 8,0) 3 ml NaCl ad 1 l H_2O bidestillatus autoklavieren	
SDS-Lösung 20 %	20 g SDS 100 ml molekularbiologisches H_2O	
TE-Puffer	1,21 g TRIS 0,37 g EDTA ad 1 l H_2O bidestillatus pH 8,0 einstellen mit HCl oder NaOH und autoklavieren	
Betainlösung [5 M]	11,71 g Betain steril abwiegen 20 ml molekularbiologisches H_2O	
Loading Dye – Stocklösung	0,25 g Bromphenolblau 0,25 g Xylencyanol 30 g Glycerol in H_2O bidestillatus 70 ml H_2O bidestillatus	
Loading Dye – Verbrauchslösung	5 ml Loading Dye Stocklösung 13,5 g Glycerol 31,5 g H_2O bidestillatus	

DNA-Leiter	10 µl 100 bp Marker 80 µl 0,5 fach TBE-Puffer 10 µl Loading Dye Verbrauchslösung
Ethanol 70 Vol%	30 ml HPLC-H ₂ O ad 100 ml 100 %iges Ethanol
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	
[10 mM]	je 100 µl dATP, dGTP, dTTP, dCTP 600 µl molekularbiologisches H ₂ O
[25 mM]	je 250 µl dATP, dGTP, dTTP, dCTP
Ethidiumbromidlösung [500 µg / ml]	100 µl Ethidiumbromid 1900 µl HPLC-H ₂ O

2.15.4. Reagenziensysteme (Kits)

GenomiPhi DNA Amplification Kit	GE Healthcare, München (ehemals Amersham Biosciences, Freiburg)
FlexiGene DNA Kit	Qiagen, Hilden
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
HotStar Taq® plus Kit	Qiagen, Hilden
iPLEX™ Reagent Kit	Sequenom, Hamburg
TaqMan® Pre-Developed Assay Reagents for Allelic Discrimination	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.15.5. Verbrauchsmaterialien

Clusterplates 96er („Mutterplatte“)	Qiagen, Hilden
Mikrotiterplatten 384er („Tochterplatte“)	ABgene, Epsom, UK
MultiScreen™ PCR-Platte	Millipore, Schwalbach
PCR-Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatten	Eppendorf, Hamburg
PCR-Folie Peel-it lite thermo sealing-foil	Eppendorf, Hamburg
Sequenzierplatten 96 Well Low Profile Reaction Plate	PeqLab, Erlangen
Sequenzierplatten 96 Well half-skirted plates	Applied Biosystems, Foster City, USA
Siliziumchip 384-well SpectroCHIP Bioarray	Sequenom, Hamburg
S-Monovette mit EDTA	Sarstedt, Nümbrecht

2.15.6. Geräte

Neben der Laborgrundausstattung wurden folgende Geräte verwendet:

ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI PRISM® 7900 HT Sequence-Detector Endpoint Read	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dimple Plates 96er	Sequenom, Hamburg
Gelkammern mit Schlitten und Kämmen	Bio-Rad, München
	PeqLab, Erlangen
	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Heißsiegelmaschine Eppendorf Heat Sealer	Eppendorf, Hamburg
Digitalkamera Kodak DC 290 Zoom mit Elektrophorese-Dokumentations- und -Analysesystem	Kodak, Stuttgart
MassARRAY™ MALDI-TOF MS	Sequenom, Hamburg
Präzisionsküvette 10 mm für Photometer	Hellma, Müllheim
Nanoliterspotter Spectro Point Nanoliter Pipetting System™	Sequenom, Hamburg
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierroboter Multimek 96 Automated 96-Channel Pipettor	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Pipettierstation Genesis RSP 150 Workstation	Tecan, Crailsheim, D
Rotator Roto- Shake Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Siliziumchip 384-well SpectroCHIP Bioarray	Sequenom, Hamburg
Thermocycler PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Boston, USA (BioRad)
Thermocycler Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Biometra T1	Biometra, Göttingen
Zentrifugen 5810 R / 5417 R / 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Micro Centrifuge II	NeoLab, Heidelberg
Zentrifuge Rotanta 46RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.15.7. Datenbanken

SNPper	Chip Bioinformatics, Boston, USA
Datenbanken des National Center for Biotechnology Information der USA (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Accession Number IL-15Ra	NM_002189
STAT-1	NM_139266
IL-15	NM_172174

2.15.8. Software

NCBI Map Viewer	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
SNPper	Chip Bioinformatics, Boston, USA
Vector NTI	Invitrogen, Paisley, UK
NetPrimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer /netprl.launch/netprl.launch.html
BioEdit Sequence Alignment Editor	Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA
ABI PRISM 3730 Data Collection Software v3.0	Sequenom, Hamburg
MassARRAY Typer v3.4	Sequenom, Hamburg
MassARRAY Assay Designer 3.0	Sequenom, Hamburg
Haploview	http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/
Vista Genome Browser	http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2
MatInspector	Genomatix, München
Protein forecasting 1.0	http://www.aber.ac.uk/~phi/www/prof/index.html
SAS software 9.1.3.	SAS, Cary, USA
SPSS software 12.0	SPSS, Chicago, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmont, USA
EndNote 5.0	ISI ResearchSoft, Berkeley, USA
Adobe Photoshop	Adobe Systems, Edinburgh, UK

3. Ergebnisse

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob in der Bevölkerung häufig auftretende Mutationen in den Genen der IL-15-Signalkaskade einen Effekt auf die Entstehung atopischer Phänotypen ausüben. Zur Detektion dieser Mutationen nutzten wir für die Gene STAT-1 und IL-15 bereits vorhandene Daten, für das Gen IL-15R α führten wir ein Mutationsscreening in einer Kontrollpopulation durch.

Diejenigen SNPs, die in der Kontrollpopulation gehäuft auftraten ($MAF > 10\%$), wurden durch das Programm *Haploview* auf ihre Kopplung und ihr Kopplungsungleichgewicht untersucht. Die aus dieser Analyse bestimmten *tagging SNPs* wurden anschließend in einer ersten Population (Dresden, n=1940) genotypisiert.

In einer anschließenden Assoziationsanalyse wurden sowohl positive als auch negative Effekte der genotypisierten SNPs auf die untersuchten Merkmale (Asthma, atopische Dermatitis, allergische Rhinokonjunktivitis, allergische Sensibilisierung, pfeifendes / keuchendes Atemgeräusch, erhöhte Menge an IgE-Antikörpern) identifiziert. Waren in dieser ersten Genotypisierung Assoziationen zu den untersuchten Phänotypen signifikant, wurde der entsprechende SNP in weiteren Populationen (München, n=1159 und Leipzig, n=1165) genotypisiert und wiederum eine Assoziationsanalyse durchgeführt. Des Weiteren wurde bei der Auswertung der Genotypisierungsergebnisse darauf geachtet, dass die *Call Rate* (prozentualer Anteil der erfolgreich bestimmten Proben) für jeden SNP über 90 % lag. Ein weiterer Bestandteil der Qualitätssicherung unserer Ergebnisse war, dass die statistische Verteilung der Genotypen im HWE lag, da ansonsten Genotypisierungsfehler nicht ausgeschlossen werden können (siehe 2.12.). Eine gekoppelte Vererbung einzelner SNPs in sogenannten Haplotypen kann zu einer Potenzierung des Effekts führen, sodass nicht nur die einzelnen SNPs sondern auch die durch das Programm *Haploview* ermittelten Haplotypen einer solchen beschriebenen Assoziationsanalyse unterzogen wurden.

Um die erlangten Ergebnisse sinnvoll in den bisher bekannten biologischen Kontext der IL-15-Signalkaskade einordnen zu können, wurden weitere *in silico* Analysen der untersuchten Gene und der SNPs durchgeführt. Um Rückschlüsse auf die biologische Evolution (Phylogenetese) ziehen zu können und potentiell bedeutsame konservierte Genregionen zu identifizieren, verglichen wir mit Hilfe des Programms *Vista Genome Browser* die Sequenzen der drei Gene zwischen dem Menschen, dem Haushund und der Maus (siehe auch 2.13.). Das Programm *Protein forecasting* ermöglichte uns eine Vorhersage der Sekundärstruktur der Proteine, die durch die Gene IL-15, IL-15R α und STAT-1 kodiert werden, sodass wir abschätzen konnten, inwiefern SNPs, die durch ihre Lage in den Exons die Aminosäuresequenz ändern, auch zu einer veränderten Proteinsekundärstruktur führen. Nichtkodierende Sequenzen eines Gens können zwar nicht unmittelbar zur Proteinsequenz

und -struktur beitragen, enthalten aber wichtige regulatorische Elemente, die die Transkription des Proteins durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren steuern. Durch das Programm *MatInspector* konnten wir aufzeigen, ob die SNPs die Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit den sogenannten Transkriptionsfaktorbindungsstellen und damit die Regulation der Proteinbiosynthese beeinflussen.

Im Folgenden wird zunächst der Weg von der Mutation zur Assoziation der Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1 dargestellt, im Weiteren werden diese Ergebnisse durch die Ergebnisse der durchgeführten *in silico* Analysen ergänzt.

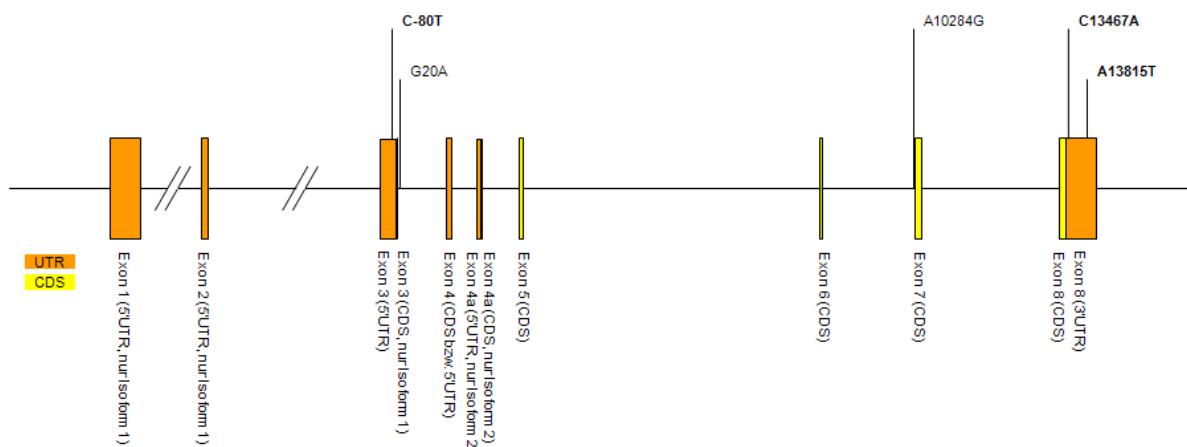
3.1. IL-15 – der Weg von der Mutation zur Assoziation

3.1.1. Für das Gen IL-15 analysierte SNPs

Kurz et al. analysierten bereits 5 SNPs des Gens IL-15 bezüglich einer möglichen Relation zu allergischem Asthma bronchiale und zu einer allergischen Sensibilisierung gegenüber der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*⁷⁰; in dieser Arbeit analysierten wir die selben SNPs in unserer Population. Jeweils 2 dieser SNPs liegen in den Introns und der 3'UTR, 1 SNP liegt in der 5'UTR. Die Abbildung 3.1 zeigt eine grafische Verteilung der SNPs.

Abb. 3.1 SNPs des IL-15-Gens

(gelb = kodierende Sequenz, orange = UTR; SNPs in Promotor, Exons und UTRs fett gedruckt)



3.1.2. Genotypisierung und Bildung von Haplotypen

Für das Gen IL-15 konnten alle 5 von Kurz et al. beschriebenen SNPs in der ISAAC II-Population in Dresden genotypisiert werden. Alle genotypisierten SNPs zeigten eine *Call Rate* von mindestens 98 % und keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (siehe Tabelle 3.1). In dieser Übersicht ist zudem die in der Dresden-Population ermittelte Häufigkeit des selteneren Allels (*minor allele frequency, MAF*) angegeben.

Tab. 3.1 Call Rate und p-Werte der Abweichungen vom HWE

SNP	Position	MAF	Call Rate	p-Werte der Abweichungen vom HWE
C-80T	-80	0,258	99,3	0,585
G20A	20	0,498	98,8	0,638
A10284G	10284	0,135	98,8	0,826
C13467A	13467	0,108	99,1	1,000
A13815T	13815	0,499	99,4	0,430

Aus den 5 SNPs konnten wir mit Hilfe des Programms *Haploview* Haplotypen bilden. Diejenigen Haplotypen, deren Häufigkeit in der Dresden-Population über 10 % lag, sind in der Tabelle 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2 Haplotypen und ihre Frequenz in der Dresden-Population

Haplotypen					Frequenz
C-80T	G20A	A10284G	C13467A	A13815T	
C	G	A	C	T	0,496
T	A	A	C	A	0,256
C	A	G	C	A	0,136
C	A	A	A	A	0,109

3.1.3. Assoziationsanalyse der einzelnen SNPs und der Haplotypen

Bei der Assoziationsanalyse zeigten die genotypisierten SNPs weder einen Zusammenhang zu den atopischen Phänotypen Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis und Atopie noch zu mit diesen Erkrankungen vergesellschafteten Merkmalen (pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, IgE-Werte über der 90. Perzentile). Die Ergebnisse des allelischen Rechenmodells sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 dargestellt.

Tab. 3.3 Zusammenhang zwischen den SNPs und den atopischen Phänotypen und Merkmalen
(allelisches Modell)

		Asthma	pfeifendes / keuchendes Atemgeräusch	allergische Rhinokonjunktivitis	atopische Dermatitis	Atopie
C-80T	p OR (CI)	0,751 1,05 (0,79 1,39)	0,725 0,95 (0,73 1,24)	0,803 0,97 (0,76 1,24)	0,125 1,17 (0,96 1,43)	0,214 1,11 (0,94 1,32)
G20A	p OR (CI)	0,753 1,04 (0,81 1,33)	0,353 0,89 (0,71 1,13)	0,342 0,90 (0,72 1,12)	0,503 1,06 (0,89 1,26)	0,286 1,08 (0,94 1,26)
A10284G	p OR (CI)	0,954 0,99 (0,69 1,41)	0,426 0,87 (0,63 1,22)	0,182 0,81 (0,60 1,10)	0,764 1,04 (0,81 1,34)	0,399 1,10 (0,88 1,37)
C13467A	p OR (CI)	0,900 0,98 (0,66 1,44)	0,501 0,88 (0,62 1,27)	0,663 1,08 (0,76 1,55)	0,306 0,87 (0,67 1,13)	0,245 0,87 (0,69 1,10)
A13815T	p OR (CI)	0,754 0,96 (0,75 1,23)	0,415 1,10 (0,87 1,39)	0,340 1,11 (0,89 1,38)	0,418 0,93 (0,79 1,10)	0,280 0,92 (0,80 1,07)

Tab. 3.4 Zusammenhang zwischen den SNPs und dem Gesamt-IgE (in IU / ml)

	häufigeres Allel		selteneres Allel		p-Wert
	Mittelwert	(CI)	Mittelwert	(CI)	
C-80T	71,4	(65,5 77,9)	58,4	(46,4 73,5)	0,761
G20A	72,3	(63,9 81,7)	69,3	(61,2 78,6)	0,745
A10284G	68,5	(64,6 72,6)	67,3	(46,1 98,2)	0,868
C13467A	71,2	(66,4 76,3)	90,7	(45,2 182,0)	0,999
A13815T	68,9	(60,8 78,0)	72,6	(64,3 82,1)	0,591

Die Assoziationsanalyse der gebildeten Haplotypen zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang zu den untersuchten Merkmalen. Die p-Werte des χ^2 -Tests im allelischen Modell sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tab. 3.5 Zusammenhang zwischen den Haplotypen und den atopischen Phänotypen und Merkmalen
(allelisches Modell)

		Asthma	Pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch	Allergische Rhinokonjunktivitis	Atopische Dermatitis	Atopie	Veränderte IgE-Werte
C	G	0,771	0,409	0,343	0,422	0,284	0,549
T	A	0,654	0,962	0,720	0,146	0,227	0,145
C	A	0,978	0,542	0,143	0,691	0,405	0,879
C	A	0,818	0,506	0,630	0,293	0,303	0,227

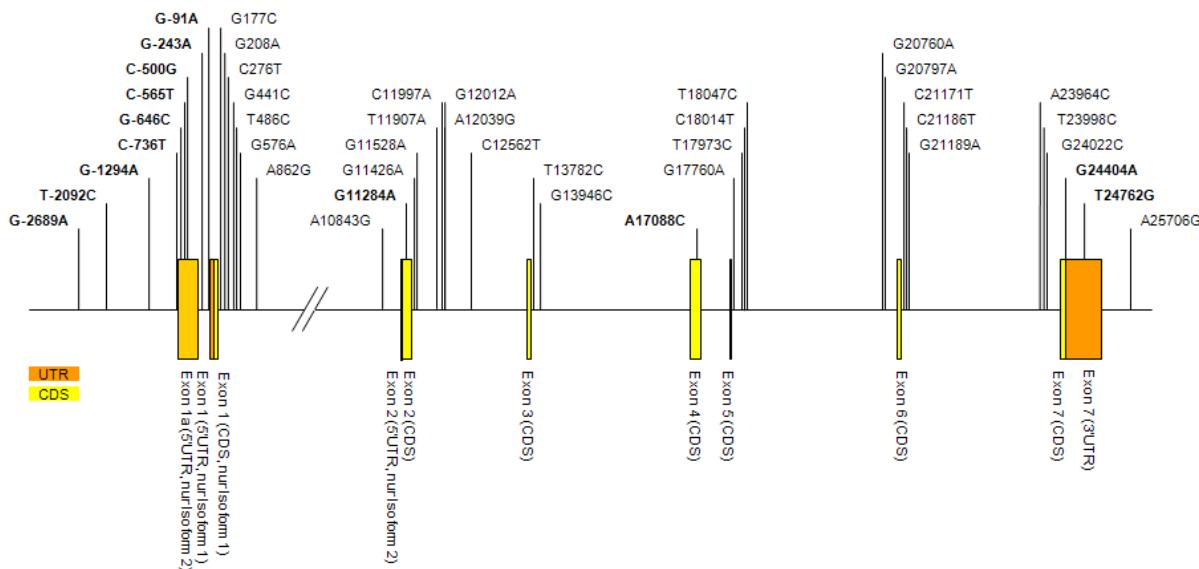
3.2. IL-15R α – der Weg von der Mutation zur Assoziation

3.2.1. Mutationsscreening des IL-15R α -Gens

Für das Mutationsscreening wurde die DNA der Kontrollpopulation (siehe 2.1.1.) nach der Didesoxymethode nach Sanger sequenziert, mit Ethanol gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und die im Elektropherogramm dargestellten Sequenzen mit Hilfe des *BioEdit Sequence Alignment Editors* untereinander verglichen. Für das Gen IL-15R α wurden durch diese Methode 43 SNPs detektiert: in der Isoform 1 liegen 9 SNPs in der Promotorregion, jeweils 2 SNPs in den Exons und in der 3'UTR, ein SNP liegt in der flankierenden Region am 3' Ende des Gens und 29 SNPs liegen in den Introns des Gens; durch das alternative Exon 1a der Isoform 2 liegen hier 4 SNPs in der Promotorregion, 3 SNPs in der 5'UTR und 2 zusätzliche SNPs im alternativen Intron 1a. Die Abbildung 3.2 zeigt eine grafische Verteilung der SNPs in den beiden Isoformen.

Abb. 3.2 SNPs des IL-15R α -Gens

(gelb = kodierende Sequenz, orange = UTR; SNPs in Promotor, Exons und UTRs fett gedruckt)



3.2.2. Genotypisierung

Für diejenigen SNPs, die in der Kontrollpopulation eine MAF von mindestens 10 % aufwiesen, wurde durch das Programm *Haploview* ihr jeweiliges Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) berechnet und aus jeder Gruppe der miteinander verknüpften Polymorphismen ein *tagging SNP* für die Genotypisierung ausgewählt (siehe 2.8.). Die SNPs mit einer MAF > 10 % in der Kontrollpopulation und die daraus ermittelten *tagging SNPs* sind

in der Tabelle 3.6 dargestellt. Obwohl ihre MAF in der Kontrollpopulation unter der Marke von 10 % lag, wurden die SNPs C-736T und G-91A ebenfalls genotypisiert, da sie aufgrund ihrer Lage im Promotor eine erhöhte funktionelle Relevanz vermuten ließen.

Tab. 3.6 SNPs des IL-15Ra-Gens mit einer MAF > 10 % im Mutationsscreening und genotypisierte SNPs

SNP	Position zu ATG (Isoform 1)	Position im Gen	MAF	LD (r ²) mit ...	Tagging SNP	genotypisierte SNPs
1	G-2689A	-2689	"Promotor"	0,316	1	1
2	T-2092C	-2092	"Promotor"	0,458	0,89	10
3	G-1294A	-1294	"Promotor"	0,417	1	3
	C-736T	-736	"Promotor"	0,040		C-736T
4	G-646C	-646	5'UTR	0,447	0,897	7
5	G-243A	-243	"Promotor"	0,145	1	5
	G-91A	-91	"Promotor"	0,040		G-91A
6	G177C	177	Intron 1	0,392	0,83	10
7	G208A	208	Intron 1	0,486	1	7
8	G441C	441	Intron 1	0,408	0,844	10
9	T486C	486	Intron 1	0,405	1	9
10	A862G	862	Intron 1	0,458	1	10
11	A10843G	10843	Intron 1	0,132	1	11
12	G11284A	11284	Exon 2	0,153	1	12
13	G11426A	11426	Intron 2	0,111	1	13
14	G12012A	12012	Intron 2	0,118	1	14
15	T13782C	13782	Intron 3	0,224	1	15
16	G13946C	13946	Intron 3	0,211	1	16
17	A17088C	17088	Exon 4	0,500	1	17
18	G17760A	17760	Intron 5	0,486	0,895	17
19	T17973C	17973	Intron 5	0,243	1	19
20	C18014T	18014	Intron 5	0,176	1	20
21	T18047C	18047	Intron 5	0,257	1	21
22	C21171T	21171	Intron 6	0,459	1	22
23	G24022C	24022	Intron 6	0,461	1	23
24	G24762T	24762	3' UTR	0,487	1	24
25	G25706A	25706	flanking region	0,486	0,947	24

Von den 21 SNPs, die für die Genotypisierung vorgesehen waren, konnten in der ersten Genotypisierungsrounde durch den *iPLEX™ Assay* der Firma Sequenom 18 SNPs erfolgreich genotypisiert werden; für die fehlenden 3 SNPs erfolgte ein weiterer Genotypisierungsversuch durch den *TaqMan™ Assay* der Firma Applied Biosystems, doch der SNP G208A konnte auch in diesem Assay nicht erfolgreich genotypisiert werden. Von den 20 erfolgreich genotypisierten SNPs zeigten 2 SNPs in der Dresden-Population keine Mutation und wurden daher nicht näher analysiert. Der SNP T18047C wich bei der Auswertung signifikant vom HWE ab ($p=0,001$), sodass hier ein Genotypisierungsfehler nicht ausgeschlossen werden und diese Daten somit nicht verwendet werden konnten. Alle weiteren genotypisierten SNPs zeigten eine *Call Rate* von mindestens 92,5 % und keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (siehe Tabelle 3.7). Für den

SNP G24022C war das Allel C in der Studienpopulation aus Dresden häufiger, sodass dieser in der Folge als C24022G bezeichnet wird. In dieser Übersicht ist zudem die in der Dresden-Population ermittelte MAF angegeben.

Tab. 3.7 Call Rate und p-Werte der Abweichungen vom HWE

SNP	MAF	Call Rate (%)	p-Werte der Abweichungen vom HWE
G-2689A	0,33	97,0	0,426
G-1294A	<i>war in der Dresden-Population monomorph</i>		
C-736T	0,07	99,3	0,845
G-243A	0,17	94,9	0,347
G-91A	0,03	98,9	0,782
G208A	<i>könnte wiederholt nicht genotypisiert werden</i>		
T486C	0,42	97,4	0,749
A862G	0,41	99,1	0,519
A10843G	0,13	99,2	0,676
G11284A	0,13	99,5	0,758
G11426A	0,09	99,5	1,000
G12012A	<i>war in der Dresden-Population monomorph</i>		
T13782C	0,21	99,5	0,736
G13946C	0,19	93,2	0,631
A17088C	0,49	98,8	0,184
T17973C	0,18	99,4	0,144
C18014T	0,20	97,1	1,000
T18047C	0,28	98,8	0,011
C21171T	0,47	95,2	0,177
C24022G	0,44	92,5	0,676
G24762T	0,48	97,9	0,946

3.2.3. Assoziationsanalyse der einzelnen SNPs

Bei der statistischen Auswertung zeigten verschiedene der 17 erfolgreich genotypisierten SNPs einen Zusammenhang zu den atopischen Phänotypen Asthma und Atopie sowie zu mit diesen Erkrankungen vergesellschafteten Merkmalen (pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, veränderte IgE-Werte). In den Tabellen 3.8 und 3.9 sind für jeden genotypisierten SNP die Odd's Ratio (OR) mit dem zugehörigen Konfidenzintervall (CI) und der jeweilige p-Wert des allelischen Rechenmodells dargestellt.

Tab. 3.8 Zusammenhang zwischen den SNPs und den atopischen Phänotypen und Merkmalen
 (allelisches Modell, signifikante Assoziationen fett gedruckt)

		Asthma	pfeifendes / keuchendes Atemgeräusch	allergische Rhino-konjunktivitis	atopische Dermatitis	Atopie
G-2689A	p OR (CI)	0,1760 0,8284 (0,6304 1,0885)	0,6113 0,9364 (0,7266 1,2067)	0,3333 1,1204 (0,8898 1,4108)	0,1155 0,8614 (0,7152 1,0374)	0,8228 1,0183 (0,8689 1,1933)
C-736T	p OR (CI)	0,2526 1,2976 (0,8294 2,0302)	0,9243 1,0227 (0,6438 1,6247)	0,7340 1,0771 (0,7015 1,6539)	0,0988 1,3075 (0,9503 1,7989)	0,6205 1,0760 (0,8051 1,4380)
G-243A	p OR (CI)	0,1651 1,2488 (0,9120 1,7099)	0,7552 1,0519 (0,7651 1,4463)	0,8358 1,0317 (0,7681 1,3858)	0,0860 1,2169 (0,9724 1,5229)	0,6920 1,0414 (0,8519 1,2730)
G-91A	p OR (CI)	0,5410 0,7978 (0,3861 1,6484)	0,4369 1,2606 (0,7021 2,2634)	0,2957 0,6949 (0,3499 1,3799)	0,1493 0,6779 (0,3983 1,1536)	0,0738 1,4095 (0,9659 2,0567)
T486C	p OR (CI)	0,4548 1,0995 (0,8573 1,4101)	0,3535 1,1187 (0,8826 1,4180)	0,3580 0,9004 (0,7197 1,1263)	0,5709 1,0515 (0,8838 1,2510)	0,0913 1,1379 (0,9794 1,3221)
A862G	p OR (CI)	0,5494 1,0784 (0,8423 1,3805)	0,5273 1,0785 (0,8531 1,3635)	0,4902 0,9246 (0,7399 1,1553)	0,5927 1,0480 (0,8825 1,2446)	0,1257 1,1232 (0,9680 1,3033)
A10843G	p OR (CI)	0,8019 1,0472 (0,7305 1,5010)	0,8204 1,0406 (0,7381 1,4671)	0,8179 1,0387 (0,7519 1,4347)	0,1614 0,8248 (0,6297 1,0804)	0,8765 0,9826 (0,7878 1,2256)
G11284A	p OR (CI)	0,2360 1,2251 (0,8752 1,7147)	0,9986 0,9997 (0,7094 1,4087)	0,8371 0,9665 (0,6983 1,3377)	0,1209 1,2096 (0,9508 1,5388)	0,0329 0,7829 (0,6249 0,9808)
G11426A	p OR (CI)	0,5257 1,1410 (0,7591 1,7150)	0,7597 1,0644 (0,7136 1,5877)	0,8522 1,0365 (0,7109 1,5112)	0,1714 1,2193 (0,9174 1,6207)	0,0218 0,7260 (0,5516 0,9553)
T13782C	p OR (CI)	0,4541 1,1167 (0,8364 1,4910)	0,5390 1,0912 (0,8258 1,4419)	0,9596 0,9931 (0,7610 1,2962)	0,9802 0,9974 (0,8113 1,2262)	0,1243 1,1486 (0,9625 1,3707)
G13946C	p OR (CI)	0,1825 0,7934 (0,5643 1,1157)	0,5242 0,9021 (0,6569 1,2389)	0,3583 0,8686 (0,6431 1,1733)	0,3526 0,8962 (0,7112 1,1293)	0,6377 1,0474 (0,8638 1,2700)
A17088C	p OR (CI)	0,0194 0,7458 (0,5827 0,9544)	0,1136 0,8271 (0,6537 1,0466)	0,8660 0,9814 (0,7891 1,2205)	0,7809 0,9761 (0,8233 1,1573)	0,6810 1,0313 (0,8902 1,1949)
T17973C	p OR (CI)	0,0849 0,7388 (0,5230 1,0437)	0,4453 0,8846 (0,6455 1,2122)	0,1885 0,8178 (0,6057 1,1042)	0,3267 1,1146 (0,8972 1,3848)	0,9127 0,9893 (0,8169 1,1983)
C18014T	p OR (CI)	0,1720 0,7944 (0,5706 1,1060)	0,1957 0,8121 (0,5923 1,1136)	0,7460 0,9548 (0,7217 1,2632)	0,1491 0,8492 (0,6800 1,0606)	0,6124 1,0490 (0,8718 1,2622)
C21171T	p OR (CI)	0,0246 0,7463 (0,5778 0,9640)	0,0320 0,7678 (0,6027 0,9781)	0,2551 0,8783 (0,7022 1,0984)	0,9022 0,9892 (0,8314 1,1769)	0,7340 1,0264 (0,8833 1,1927)
C24022G	p OR (CI)	0,0806 1,2543 (0,9724 1,6181)	0,1850 1,1810 (0,9233 1,5106)	0,6659 1,0515 (0,8372 1,3206)	0,8440 0,9824 (0,8231 1,1725)	0,9980 1,0002 (0,8580 1,1660)
G24762T	p OR (CI)	0,0357 1,2975 (1,0170 1,6553)	0,0382 1,2808 (1,0130 1,6193)	0,5654 1,0660 (0,8572 1,3257)	0,9328 0,9927 (0,8368 1,1776)	0,8937 1,0102 (0,8710 1,1716)

Tab. 3.9 Zusammenhang zwischen den SNPs und dem Gesamt-IgE (in IU / ml, signifikante Assoziationen fett gedruckt)

	häufigeres Allel		selteneres Allel		p-Wert
	Mittelwert	(CI)	Mittelwert	(CI)	
G-2689A	68,77	(65,08 72,66)	72,78	(67,31 78,71)	0,2442
C-736T	71,76	(68,53 75,14)	60,81	(50,73 72,91)	0,0722
G-243A	71,56	(68,10 75,20)	69,58	(62,18 77,84)	0,6510
G-91A	70,81	(67,69 74,08)	68,31	(53,19 87,73)	0,7733
T486C	71,10	(67,02 75,43)	71,82	(67,03 76,97)	0,827
A862G	70,67	(66,70 74,88)	71,47	(66,61 76,68)	0,8078
A10843G	70,39	(67,09 73,83)	73,54	(64,98 83,24)	0,5204
G11284A	72,15	(68,80 75,67)	63,28	(55,79 71,79)	0,0510
G11426A	71,85	(68,59 75,27)	62,98	(53,83 73,67)	0,0991
T13782C	68,93	(65,55 72,48)	80,33	(72,92 88,48)	0,0058
G13946C	72,18	(68,57 75,98)	67,95	(61,15 75,51)	0,3166
A17088C	71,29	(66,93 75,93)	70,97	(66,63 75,60)	0,9211
T17973C	72,04	(68,56 75,69)	66,31	(59,90 73,41)	0,1621
C18014T	70,20	(66,76 73,83)	73,33	(66,27 81,14)	0,4494
C21171T	70,95	(66,56 75,63)	69,91	(65,52 74,58)	0,7492
C24022G	70,25	(66,14 74,61)	72,41	(67,45 77,73)	0,5207
G24762T	71,19	(66,98 75,66)	71,95	(67,34 76,87)	0,8167

Einige signifikante Ergebnisse des allelischen Modells konnten in anderen Rechenmodellen ebenfalls gezeigt werden: das seltene Allel A des SNPs G11426A zeigte auch im dominanten und linearen Modell einen signifikanten inversen Zusammenhang zu einer vorhandenen Atopie (OR 0.69, CI 0.52-0.93 im dominanten Modell bzw. OR 0.73, CI 0.55-0.96 im linearen Modell); das seltene Allel C des SNPs A17088C ist wie im allelischen Modell auch im dominanten Modell signifikant invers mit dem Vorhandensein eines allergischen Asthma assoziiert (OR 0.68, CI 0.47-0.97); das Allel T des SNPs C21171T zeigt ebenfalls in weiteren Rechenmodellen einen signifikant inversen Zusammenhang mit einer Asthmaerkrankung (OR 0.54, CI 0.33-0.89 im rezessiven Modell bzw. OR 0.76, CI 0.59-0.97 im linearen Modell); für den SNP G24762T konnte der bereits im allelischen Modell gezeigte signifikante Zusammenhang des Allels T mit dem Merkmal „pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch“ auch im linearen Modell bestätigt werden (OR 1.28, CI 1.01-1.62).

Einzelne weitere SNPs zeigten in den zusätzlich verwendeten Rechenmodellen ebenfalls signifikante Zusammenhänge. Da diese Effekte aber im allelischen Modell nicht nachweisbar waren, werden diese SNPs hier nicht weiter dargestellt.

Diejenigen SNPs, die in der Dresden-Population signifikante Assoziationen zu mindestens einem Phänotyp aufwiesen, wurden hinsichtlich solcher Effekte in der München-Population analysiert. Da wir für den SNP A17088C eine große funktionelle Relevanz vermuteten, wurde dieser SNP zusätzlich zu der Dresden- und der München-Population auch in der Leipzig-Population genotypisiert. Bei der Analyse der Dresden-München-Leipzig-

Gesamtpopulation erwies sich das rezessive Modell als besonders aussagekräftig: das selteneren Allel C des SNPs A17088C zeigte in allen drei Einzelpopulationen sowie in der Gesamtpopulation einen protektiven Effekt auf die Entstehung eines Asthmas; in der Betrachtung der Gesamtpopulation war diese Assoziation signifikant (siehe Tabelle 3.10).

Tab. 3.10 Effekt des SNPs A17088C auf die Entstehung eines Asthmas
(rezessives Modell, signifikante Assoziationen fett gedruckt)

A17088C	Dresden	München	Leipzig	gesamt
MAF	0,49	0,47	0,46	0,47
OR (CI)	0,69 (0,45-1,07)	0,76 (0,46-1,24)	0,55 (0,27-1,13)	0,68 (0,50-0,91)
p-Wert	0,098	0,266	0,099	0,010

3.2.4. Haplotypanalyse

Aus den 17 SNPs, die in der Dresden-Population erfolgreich genotypisiert werden konnten, bildeten wir mit Hilfe des Programms *Haplovew* Haplotypen und führten für diese eine Assoziationsanalyse für die Dresden-Population durch. Diejenigen SNPs, die in der Kontrollpopulation eine MAF von über 10 % aufwiesen und in der Dresden-Population erfolgreich genotypisiert werden konnten, bilden die Haplotypen H1-H17 (siehe Tabelle 3.11). Die Assoziationen der SNPs A17088C und G24762T zu dem Merkmal „Asthma“ waren in der Dresden-Population signifikant (allelisches Modell), sodass wir die aus diesen beiden SNPs gebildeten Haplotypen HA, HB und HC analysierten (siehe Tabelle 3.11). Hierbei zeigt der Haplotype HB, der die Risikoallele A und T kombiniert, ein signifikant erhöhtes Risiko für Asthma. Wie aus der Tabelle 3.11 ersichtlich, gilt dieses signifikant erhöhte Risiko auch für die Haplotypen H13 und H14.

Tab. 3.11 Haplotypen und ihre Frequenz für das Merkmal „Asthma“ in der Dresden-Population
 (allelisches Modell, signifikante Assoziationen fett gedruckt)

Haplotypen	Frequenz	p-Wert
Block 1		
G-2689A		
G-243A		
T486C		
A862G		
A10843G		
G11284A		
G11426A		
T13782C		
G13946C		
A17088C		
T17973C		
C18014T		
C21171T		
G24022C		
T24762G		
Kinder ohne Asthma		
Kinder mit Asthma		
H1 A G T A A G G T G C T T C G G	0,149	0,183
H2 G G C G A G G T C C C C T G G	0,111	0,136
H3 A G T A A G G T G A T C T C T	0,108	0,100
H4 G G T A G G G T G A T C T C T	0,104	0,102
H5 G A C G A G G C G A T C T C T	0,101	0,070
H6 G G T A A A A T G A T C T C T	0,060	0,065
H7 G G C G A G G C G A T C T C T	0,057	0,054
H8 G A C G A G G T G C T C C G G	0,031	0,034
H9 G A C G A G G C G A T C T G G	0,031	0,030
H10 G G C G A G G T C A T C T C T	0,027	0,024
H11 G G T A A G G C G A T C T G G	0,019	0,025
H12 G G T A A A G T G C C C T G G	0,021	0,023
H13 G A C G A A A T G A T C T C T	0,037	0,017
H14 G G T A A A G T G A T C T C T	0,032	0,015
H15 A G T A A G G T G C T C C G G	0,016	0,016
H16 G G C G A G G T C C T C C G G	0,012	0,013
H17 A G T A G G G C G C T C T G G	0,011	0,013
Block 2		
A17088C		
G24762T		
Kinder mit Asthma		
Kinder ohne Asthma		
HA C G	0,410	0,470
HB A T	0,530	0,451
HC A G	0,052	0,058

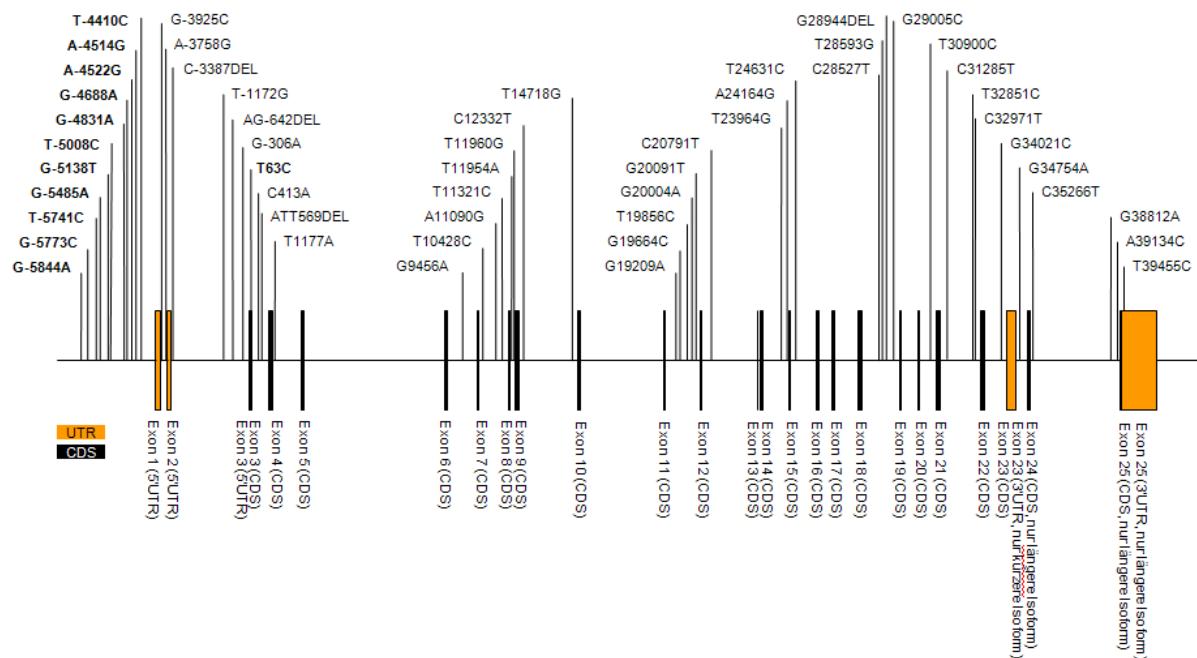
3.3. STAT-1 – der Weg von der Mutation zur Assoziation

3.3.1. Für das Gen STAT-1 analysierte SNPs

Für das Gen STAT-1 sind bereits 52 SNPs auf der Homepage <http://www.innateimmunity.net> veröffentlicht: in der längeren Isoform des Gens liegen 11 SNPs in der Promotorregion, jeweils 1 SNP in einem Exon und der 3'UTR und 39 SNPs in Introns. Bei der kürzeren Isoform liegen die letzten 4 intronischen SNPs und der SNP der 3'UTR bereits in der flankierenden Region am 3' Ende des Gens. Die Abbildung 3.3 zeigt eine grafische Verteilung der SNPs in beiden Isoformen.

Abb. 3.3 SNPs des STAT-1-Gens

(gelb = kodierende Sequenz, orange = UTR; SNPs in Promotor, Exons und UTRs fett gedruckt)



3.3.2. Genotypisierung

Um die Prävalenz der Mutationen des Gens STAT-1 in der Studienpopulation aus Dresden zu untersuchen wurden die in der Datenbank von innateimmunity.de veröffentlichten SNPs genotypisiert. Wie schon für das IL-15Ra-Gen wurden auch hier *tagging* SNPs für die Genotypisierung bestimmt. Hierfür wurden nur diejenigen SNPs berücksichtigt, die in der Kontrollpopulation eine MAF von mindestens 10 % aufwiesen. Diese SNPs, die jeweilige MAF in der Kontrollpopulation, ihr LD und die *tagging* SNPs sind in der Tabelle 3.12 dargestellt. Obwohl der SNP T63C in der Kontrollpopulation nur eine MAF von 6,52 % zeigte,

wurde er aufgrund seiner Lage im Exon 3 des STAT-1-Gens, dem damit verbundenen Aminosäureaustausch im Protein (siehe 3.5.) und der dadurch vermuteten erhöhten funktionellen Relevanz ebenfalls genotypisiert. Der SNP T39455C in der 3'UTR wurde ebenfalls genotypisiert obwohl seine MAF mit 4,35 % unter der 10 %-Marke lag.

Tab. 3.12 SNPs des STAT-1-Gens mit einer MAF > 10 % im Mutationsscreening und genotypisierte SNPs

SNP	Position zu ATG (Isoform 1)	Position im Gen	MAF	LD (r2) mit ...	Tagging SNP	genotypisierte SNPs
1	G-5773C	-5773	"Promoter"	0,326	1	3
2	T-5741C	-5741	"Promoter"	0,457	1	2
3	G-4831A	-4831	"Promoter"	0,326	1	3
4	G-4688A	-4688	"Promoter"	0,478	0,912	11
5	T-4410C	-4410	"Promoter"	0,13	1	5
6	G-3925C	-3925	Intron 1	0,37	0,825	3
7	A-3758G	-3758	Intron 1	0,13	1	7
8	C-3387DEL	-3387	Intron 2	0,478	0,832	11
9	AG-642DEL	-642	Intron 2	0,326	1	3
10	G-306A	-306	Intron 2	0,114	1	10
	T63C	63	Exon 3	0,065		T63C
11	ATT569DEL	569	Intron 3	0,432	1	11
12	T1177A	1177	Intron 4	0,391	1	12
13	G19209A	19209	Intron 11	0,478	1	13
14	T19856C	19856	Intron 11	0,109	1	14
15	T23964G	23964	Intron 14	0,283	1	15
16	A24164G	24164	Intron 14	0,37	1	16
17	C24631T	24631	Intron 15	0,5	1	17
18	T28593G	28593	Intron 18	0,152	1	26
19	G28944DEL	28944	Intron 18	0,455	1	19
20	G29005C	29005	Intron 18	0,435	1	20
21	T30900C	30900	Intron 20	0,348	1	25
22	C31285T	31285	Intron 21	0,152	1	26
23	T32851C	32851	Intron 21	0,348	1	25
24	C32971T	32971	Intron 21	0,348	1	25
25	G34754A	34754	Intron 23	0,348	1	25
26	C35266T	35266	Intron 24	0,152	1	26
27	G38812A	38812	Intron 24	0,159	1	27
28	A39134C	39134	Intron 24	0,364	1	28
	T39455C	39455	3'UTR	0,044		T39455C

Alle 20 SNPs konnten durch den den *iPLEX™ Assay* der Firma Sequenom erfolgreich genotypisiert werden. Alle genotypisierten SNPs zeigten eine *Call Rate* von mindestens 93 % und keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (siehe Tabelle 3.13). In der Studienpopulation aus Dresden waren für die SNPs ATT569DEL, A24164G, G28944DEL und A39134C die vermeintlich selteneren Allele häufiger vertreten, sodass diese SNPs in der Folge als DEL569ATT, G24164A, DEL28944G und C39134A bezeichnet werden. In dieser Übersicht ist zudem die in der Dresden-Population ermittelte MAF angegeben.

Tab. 3.13 Call Rate und p-Werte der Abweichungen vom HWE

SNP	MAF	Call Rate (%)	p-Werte der Abweichungen vom HWE
T-5741C	0,31	97,99	0,190
G-4831A	0,20	97,99	0,233
T-4410C	0,13	96,86	0,912
A-3758G	0,10	93,45	0,630
G-306A	0,12	98,20	0,774
T63C	0,06	98,50	0,094
DEL569ATT	0,42	98,86	0,313
T1177A	0,32	97,53	0,766
G19209A	0,36	98,20	0,628
T19856C	0,13	97,01	0,486
T23964G	0,24	98,40	0,090
G24164A	0,48	98,76	0,693
C24631T	0,35	98,71	0,624
DEL28944G	0,35	98,45	0,756
G29005C	0,32	98,61	0,527
G34754A	0,20	97,84	0,941
C35266T	0,12	98,14	0,763
G38812A	0,11	99,02	0,768
C39134A	0,46	97,94	0,587
T39455C	0,03	98,55	0,735

3.3.3. Assoziationsanalyse der einzelnen SNPs

Bei der statistischen Auswertung zeigten 3 der 17 analysierten SNPs protektive Effekte: liegt das seltenerne Allel des SNPs G-306A vor, ist der protektive Effekt auf das Vorliegen einer atopischen Dermatitis sowie einer Atopie signifikant; das seltenerne Allel T des SNPs C35266T wies ebenfalls einen signifikant protektiven Effekt für das Auftreten einer atopischen Dermatitis auf. Des Weiteren wurde ein signifikanter Zusammenhang des SNPs C39134A zu einer erniedrigten Menge an Gesamt-IgE-Antikörpern nachgewiesen. In den Tabellen 3.14 und 3.15 sind für jeden genotypisierten SNP die Odd's Ratio (OR) mit dem zugehörigen Konfidenzintervall (CI) und der jeweilige p-Wert des allelischen Rechenmodells dargestellt.

Tab. 3.14 Zusammenhang zwischen den SNPs und den atopischen Phänotypen und Merkmalen
 (allelisches Modell, signifikante Assoziationen fett gedruckt)

		Asthma	pfeifendes / keuchendes Atemgeräusch	allergische Rhino-konjunktivitis	atopische Dermatitis	Atopie
T-5741C	p OR (CI)	0,8539 0,9754 (0,7478 1,2721)	0,8073 1,0318 (0,8021 1,3273)	0,5659 0,9324 (0,7342 1,1841)	0,7345 1,0322 (0,8595 1,2397)	0,4547 1,0623 (0,9066 1,2447)
G-4831A	p OR (CI)	0,7766 0,9564 (0,7029 1,3014)	0,7946 0,9612 (0,7134 1,2951)	0,0596 0,7550 (0,5632 1,0122)	0,9312 1,0094 (0,8155 1,2494)	0,6907 1,0381 (0,8635 1,2480)
T-4410C	p OR (CI)	0,6586 0,9185 (0,6299 1,3393)	0,2303 0,7930 (0,5424 1,1593)	0,6891 0,9340 (0,6684 1,3051)	0,4870 0,9112 (0,7009 1,1845)	0,3221 1,1169 (0,8973 1,3901)
A-3758G	p OR (CI)	0,8226 0,9523 (0,6209 1,4605)	0,7009 1,0794 (0,7310 1,5937)	0,0954 1,3346 (0,9496 1,8757)	0,9198 0,9852 (0,7367 1,3175)	0,5575 1,0754 (0,8435 1,3710)
G-306A	p OR (CI)	0,9097 0,9784 (0,6709 1,4269)	0,8224 1,0415 (0,7303 1,4852)	0,7848 0,9535 (0,6777 1,3416)	0,0498 0,7522 (0,5655 1,0006)	0,0221 0,7558 (0,5942 0,9612)
T63C	p OR (CI)	0,4981 1,1882 (0,7211 1,9579)	0,4848 1,1848 (0,7359 1,9073)	0,2457 0,7284 (0,4257 1,2464)	0,6390 0,9124 (0,6222 1,3382)	0,1538 0,7815 (0,5564 1,0975)
DEL569ATT	p OR (CI)	0,7143 0,9521 (0,7382 1,2247)	0,9391 0,9907 (0,7842 1,2534)	0,4387 0,9134 (0,7323 1,1387)	0,4002 0,9198 (0,7782 1,1058)	0,4465 0,9374 (0,8072 1,0911)
T1177A	p OR (CI)	0,8224 1,0302 (0,7942 1,3364)	0,9556 1,0071 (0,7838 1,2941)	0,0913 0,8121 (0,6375 1,0344)	0,4045 0,9244 (0,7684 1,1121)	0,4192 0,9366 (0,7990 1,0979)
G19209A	p OR (CI)	0,4677 1,0970 (0,8544 1,4084)	0,4622 1,0942 (0,8607 1,3910)	0,2870 0,8830 (0,7022 1,1104)	0,7907 1,0241 (0,8590 1,2209)	0,7083 1,0295 (0,8842 1,1986)
T19856C	p OR (CI)	0,6380 1,0894 (0,7625 1,5563)	0,9831 1,0038 (0,7067 1,4257)	0,6602 0,9270 (0,6612 1,2997)	0,1104 0,8019 (0,6112 1,0520)	0,2154 0,8662 (0,6899 1,0874)
T23964G	p OR (CI)	0,9078 0,9832 (0,7377 1,3103)	0,7031 0,9476 (0,7186 1,2496)	0,5887 1,0715 (0,8341 1,3765)	0,2313 0,8832 (0,7206 1,0825)	0,3905 0,9270 (0,7798 1,1021)
G24164A	p OR (CI)	0,9991 0,9999 (0,7842 1,2748)	0,6678 0,9500 (0,7516 1,2008)	0,2824 0,8870 (0,7128 1,1039)	0,2403 0,9034 (0,7624 1,0704)	0,2083 0,9100 (0,7856 1,0540)
C24631T	p OR (CI)	0,7125 1,0489 (0,8138 1,3519)	0,5297 1,0804 (0,8488 1,3752)	0,2657 0,8767 (0,6954 1,1054)	0,5112 1,0611 (0,8890 1,2665)	0,8848 0,9887 (0,8475 1,1534)
DEL28944G	p OR (CI)	0,1033 0,8041 (0,6176 1,0463)	0,5535 0,9279 (0,7241 1,1893)	0,9765 0,9972 (0,7929 1,2532)	0,1540 0,8781 (0,7334 1,0503)	0,2435 0,9119 (0,7816 1,0641)
G29005C	p OR (CI)	0,9414 0,9903 (0,7631 1,2852)	0,7242 0,9559 (0,7439 1,2283)	0,2821 0,8783 (0,6933 1,1127)	0,9040 0,9889 (0,8248 1,1857)	0,3048 0,9210 (0,7869 1,0778)
G34754A	p OR (CI)	0,6834 1,0638 (0,7903 1,4320)	0,6440 1,0694 (0,8044 1,4218)	0,3353 0,8715 (0,6587 1,1531)	0,5011 1,0738 (0,8726 1,3215)	0,9081 0,9893 (0,8241 1,1876)
C35266T	p OR (CI)	0,2835 0,7993 (0,5305 1,2045)	0,5166 0,8817 (0,6026 1,2901)	0,5881 1,0963 (0,7858 1,5295)	0,0245 0,7151 (0,5334 0,9588)	0,2250 0,8637 (0,6815 1,0946)
G38812A	p OR (CI)	0,5191 1,1327 (0,7754 1,6544)	0,5726 0,8934 (0,6040 1,3217)	0,9596 1,0091 (0,7114 1,4313)	0,6698 1,0603 (0,8101 1,3878)	0,3538 1,1161 (0,8848 1,4079)
C39134A	p OR (CI)	0,7493 1,0405 (0,8158 1,3269)	0,3062 0,8842 (0,6985 1,1193)	0,3351 0,8975 (0,7202 1,1184)	0,3423 0,9203 (0,7752 1,0924)	0,3350 0,9298 (0,8019 1,0781)
T39455C	p OR (CI)	0,8784 1,0588 (0,5091 2,2023)	0,3769 0,6884 (0,2993 1,5833)	0,1454 1,5280 (0,8600 2,7149)	0,4882 1,1921 (0,7248 1,9607)	0,2327 1,3002 (0,8439 2,0031)

Tab. 3.15 Zusammenhang zwischen den SNPs und dem Gesamt-IgE (in IU / ml, signifikante Assoziationen fett gedruckt)

	häufigeres Allel	selteneres Allel	p-Wert
	Mittelwert (CI)	Mittelwert (CI)	
T-5741C	71,89 (68,12 75,88)	69,05 (63,73 74,81)	0,4141
G-4831A	71,34 (67,86 74,99)	72,01 (65,05 79,72)	0,8700
T-4410C	70,80 (67,46 74,31)	75,68 (66,98 85,51)	0,3321
A-3758G	71,27 (67,90 74,81)	65,34 (56,82 75,14)	0,2596
G-306A	71,43 (68,12 74,90)	66,35 (58,23 75,60)	0,2948
T63C	71,54 (68,33 74,90)	60,52 (50,53 72,47)	0,0925
DEL569ATT	72,24 (70,11 74,44)	68,71 (66,69 70,81)	0,2860
T1177A	71,19 (67,43 75,17)	70,63 (65,26 76,46)	0,8728
G19209A	71,95 (68,01 76,11)	68,75 (63,91 73,95)	0,3363
T19856C	71,90 (68,52 75,46)	66,89 (58,96 75,89)	0,2954
T23964G	71,62 (68,04 75,38)	69,31 (63,25 75,94)	0,5387
G24164A	72,76 (68,38 77,42)	69,46 (65,14 74,05)	0,3071
T24631C	73,13 (69,19 77,30)	67,13 (62,30 72,33)	0,0732
DEL28944G	70,34 (66,58 74,32)	71,71 (66,48 77,35)	0,6848
G29005C	72,92 (69,06 76,99)	66,97 (61,95 72,40)	0,0799
G34754A	71,69 (68,19 75,38)	67,96 (61,58 75,01)	0,3441
C35266T	70,21 (66,97 73,60)	76,04 (66,43 87,03)	0,2607
G38812A	71,95 (68,62 75,43)	63,12 (55,50 71,79)	0,0750
C39134A	73,70 (69,52 78,59)	67,35 (63,07 71,79)	0,0393
T39455C	70,65 (67,54 73,91)	65,32 (50,60 84,32)	0,5746

Zusätzlich zum allelischen Modell konnte auch im dominanten Rechenmodell der signifikante inverse Zusammenhang der SNPs G-306A und C35266T zum Vorhandensein einer Atopie bzw. einer atopischen Dermatitis gezeigt werden (SNP G-306A: OR 0.76, CI 0.58-0.98; SNP C35266T: OR 0.69, CI 0.50-0,95).

Einzelne weitere SNPs zeigten in den zusätzlich verwendeten Rechenmodellen ebenfalls signifikante Zusammenhänge. Da diese Effekte aber im allelischen Modell nicht nachweisbar waren, werden diese SNPs hier nicht weiter dargestellt.

Da die SNPs G-306A, C35266T und C39134A in der Assoziationsanalyse der Dresden-Population signifikante Zusammenhänge zu den untersuchten Phänotypen und Merkmalen zeigten, wurden diese in der München-Population repliziert. Die SNPs G-306A und C35266T zeigten keine signifikanten Assoziationen zu den untersuchten Merkmalen.

Für den SNP C39134A konnte entgegen der Analyse in der Dresden-Population keine signifikante Assoziation zu Gesamt-IgE-Werten gezeigt werden, allerdings wiesen die Träger des selteneren Allels A in der München-Population signifikant seltener eine Atopie auf (OR 0.80, CI 0.65-0.97). Betrachtet man die Gesamtpopulation aus Dresden und München, war das seltene Allel A des SNPs C39134A sowohl in Bezug auf das Gesamt-IgE (wie auch in der Dresden-Population) als auch in Bezug auf die bestimmten spezifischen IgE-Antikörper als auch in Bezug auf das Vorliegen einer Atopie (wie auch in der München-Population) protektiv (siehe Tabelle 3.16).

Tab. 3.16 Zusammenhang zwischen dem SNP C39134A mit Gesamt-IgE, spezifischem IgE und Atopie (allelisches Modell, signifikante Assoziationen fett gedruckt)

Gesamt-IgE (IU / ml)			Spezifisches IgE (IU / ml)		Atopie	
Häufigeres Allel (Mittelwert log IgE ± SA)	Selteneres Allel (Mittelwert log IgE ± SA)	p-Wert	OR (CI)	p-Wert	OR (CI)	p-Wert
Dresden						
73,70 <i>4,30 ± 0,031</i>	67,35 <i>4,21 ± 0,033</i>	0,039	0,88 (0,77-1,01)	0,066	0,93 (0,88-1,08)	0,335
München						
65,37 <i>4,18 ± 0,045</i>	63,43 <i>4,15 ± 0,044</i>	0,618	0,87 (0,73-1,03)	0,101	0,80 (0,65-0,97)	0,022
Dresden + München						
70,28 <i>4,26 ± 0,026</i>	66,02 <i>4,19 ± 0,026</i>	0,043	0,88 (0,79-0,98)	0,017	0,88 (0,78-0,99)	0,027

3.3.4. Haplotypanalyse

Mit Hilfe des Programms *Haplovew* wurden Haplotypen gebildet und in einer Assoziationsanalyse untersucht, ob die gekoppelte Vererbung der SNPs zu einem synergistischen Effekt auf die untersuchten Merkmale führt. Für das STAT-1-Gen wurden Haplotypen, deren Häufigkeit in der Dresden-Population über 1 % lag, einer solchen Analyse unterzogen. Die 17 Haplotypen, auf die dieses Kriterium zutraf, konnten in 4 Blöcke unterteilt werden: keiner der analysierten Haplotypen zeigte einen signifikanten Zusammenhang zu den Merkmalen „Asthma“ und „Atopie“ (siehe Tabelle 3.17).

Tab. 3.17 Haplotypen, ihre Frequenz in der Dresden-Population und p-Werte für die Merkmale „Asthma“ und „Atopie“ (allelisches Modell)

Haplotypen	Frequenz	p-Werte	
Block 1			
T-5741C		Dresden	
G-4831A		Asthma	
T-4410C		Atopie	
A-3758G			
G-306A			
T63C			
T G T A G T	0,457	0,3356	0,7299
C A T A G T	0,200	0,3737	0,8068
T G C A G T	0,129	0,8236	0,2410
C G T G G T	0,098	0,7526	0,3530
T G T A A T	0,061	0,3425	0,1173
T G T A A C	0,055	0,7066	0,1055
Block 2			
DEL569ATT		Dresden	
T1177A		Asthma	
DEL T	0,584	0,5297	0,4992
ATT A	0,313	0,4979	0,0876
ATT T	0,100	0,9777	0,2710
Block 3			
G24164A		Dresden	
C24631T		Asthma	
G C	0,524	0,5679	0,1838
A T	0,339	0,7274	0,9101
A C	0,133	0,2513	0,0884
Block 4			
G34754A		Dresden	
C35266T		Asthma	
G38812A		Atopie	
C39134A			
G C G C	0,546	0,9325	0,2679
A C G A	0,210	0,8971	0,5969
G T G A	0,113	0,3560	0,2243
G C A A	0,103	0,3273	0,3544
G C G A	0,029	0,5855	0,1626

3.4. Phylogenetischer Vergleich

Durch das Programm *Vista Genome Browser* wurden die Sequenzen der untersuchten Gene bei verschiedenen Spezies (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*) dargestellt und miteinander verglichen. Diese *in silico* Analyse der Gene ermöglicht die Identifikation konservierter Regionen und erlaubt dadurch Rückschlüsse auf die Phylogenetese (siehe auch 2.13.): ab einer Übereinstimmung von 70 % gelten die Sequenzen als konserviert und werden farblich hervorgehoben (siehe Legende in den Abbildungen 3.4, 3.5 und 3.6).

Abb. 3.4 Phylogenetischer Vergleich des IL-15-Gens

(*Homo sapiens* – *Mus musculus* und *Homo sapiens* – *Canis familiaris*, Abbildung des Gens in 5'→3'Richtung, horizontale Linie markiert 70 %ige Übereinstimmung zwischen den Sequenzen, konservierte Sequenzen in CNS rot, in Exon blau, in UTR türkis)

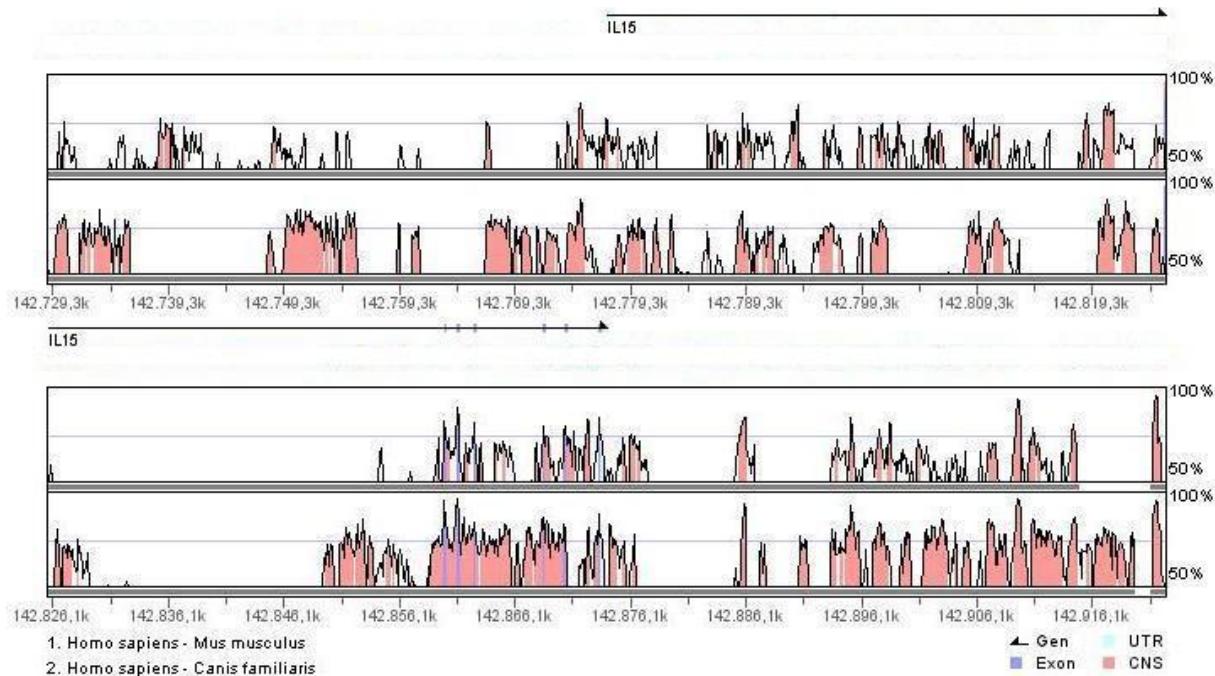
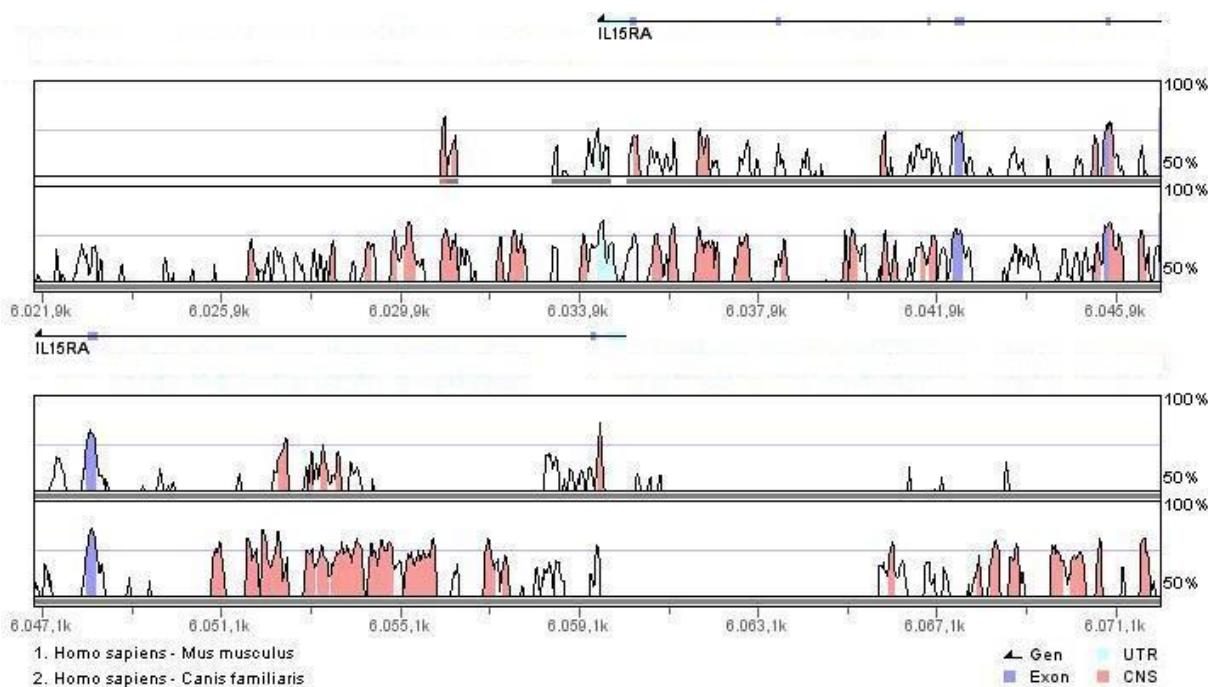
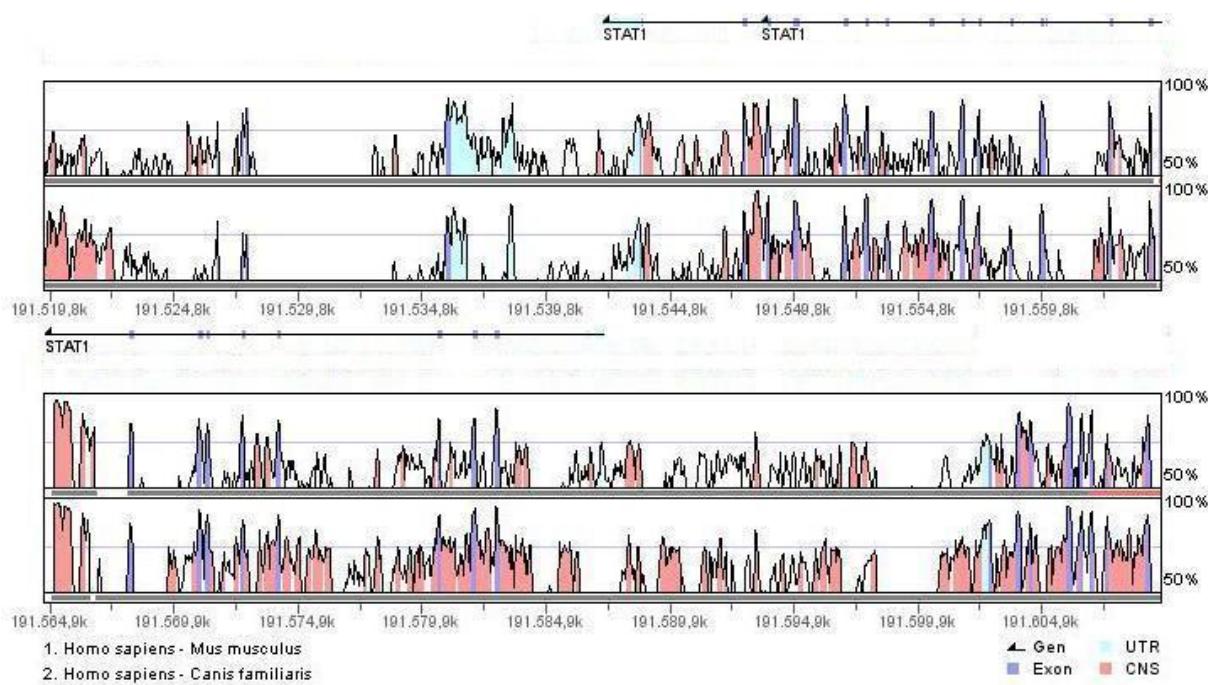


Abb. 3.5 Phylogenetischer Vergleich des IL-15RA-Gens

(*Homo sapiens – Mus musculus* und *Homo sapiens – Canis familiaris*, Abbildung des Gens in 3'→5'Richtung, horizontale Linie markiert 70 %ige Übereinstimmung zwischen den Sequenzen, konservierte Sequenzen in CNS rot, in Exon blau, in UTR türkis)

**Abb. 3.6 Phylogenetischer Vergleich des STAT1-Gens**

(*Homo sapiens – Mus musculus* und *Homo sapiens – Canis familiaris*, Abbildung des Gens in 3'→5'Richtung, horizontale Linie markiert 70 %ige Übereinstimmung zwischen den Sequenzen, konservierte Sequenzen in CNS rot, in Exon blau, in UTR türkis)



Der phylogenetische Vergleich zeigt in allen drei Genen der IL-15-Signalkaskade konservierte Regionen. Diese sind bei der Gegenüberstellung *Homo sapiens* – *Canis familiaris* ausgeprägter, da der Haushund dem Menschen evolutionsbiologisch näher steht als die Maus. Die Exone und die UTRs der Gene sind meistens konserviert; dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Regionen über die Proteinbiosynthese das zugehörige Protein kodieren und damit im Laufe der Evolution nur gering modifiziert wurden.

Neben diesen erwarteten Ergebnissen zeigt der phylogenetische Vergleich in allen drei analysierten Genen aber vor allem konservierte Regionen in nicht-kodierenden Sequenzen. Bei dem IL-15-Gen (siehe Abbildung 3.4) ist im Vergleich *Homo sapiens* – *Canis familiaris* nahezu der ganze Bereich zwischen dem Exon 3 und dem Exon 7 konserviert: in diesem Bereich liegen auch die SNPs C-80T, G20A und A10284G. Der Bereich des Exons 8, in dem die SNPs C13467A und A13815T lokalisiert sind, ist ebenfalls konserviert, sodass alle 5 in dieser Arbeit analysierten SNPs des IL-15-Gens in konservierten Regionen liegen.

Bei der Analyse des IL-15Ra-Gens (siehe Abbildung 3.5) fällt auf, dass die Exone 2, 3 und 4 sowohl im Vergleich mit der Maus als auch mit dem Hund konserviert sind; sowohl im Exon 2 als auch im Exon 4 fanden wir im Mutationsscreening einen SNP (G11284A bzw. A17088C). Auch die 3'UTR, in der die SNPs G24404A und T24762G lokalisiert sind, sowie zahlreiche Regionen der nicht-kodierenden Sequenzen sind im Vergleich mit beiden Spezies konserviert.

Im STAT-1-Gen sind alle 25 Exons im Vergleich mit beiden Spezies konserviert: dies gilt auch für das Exon 3, in dem der SNP T63C lokalisiert ist. Des Weiteren sind auch in diesem Gen weite Teile der CNS stark konserviert: während in manchen konservierten CNS-Regionen keine SNPs lokalisiert sind (beispielsweise in den langen konservierten Bereichen kurz vor Exon 11 sowie zwischen den Exons 5 und 6), finden sich in anderen konservierten Regionen zahlreiche SNPs (SNP G34754A zwischen den Exons 23 und 24, SNPs G38812A und A39134C kurz vor dem Exon 25).

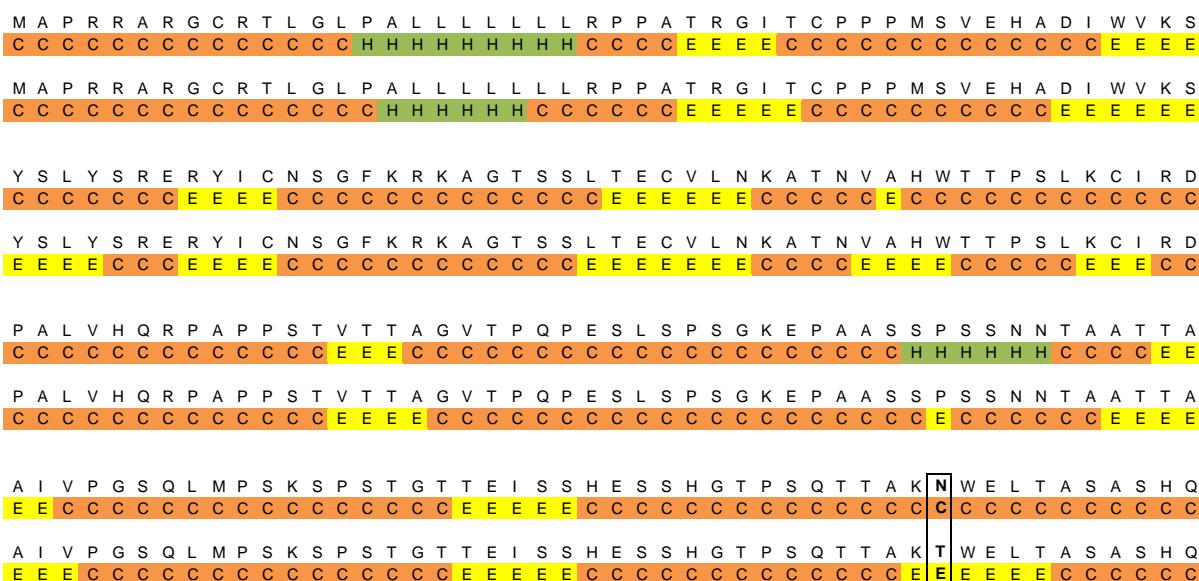
3.5. Strukturanalyse der in den Exons lokalisierten SNPs

In den Genen IL-15Ra und STAT-1 wurden auch SNPs identifiziert, die in exonischen Sequenzen liegen. Mutationen in diesen Bereichen können zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz im Protein führen. Ist die Aminosäuresequenz des Proteins verändert, kann dies eine veränderte Proteinsekundärstruktur und damit eine funktionelle Beeinträchtigung des Proteins bedingen. Um abschätzen zu können, inwiefern diejenigen exonischen SNPs der IL-15Ra- und STAT-1-Gene, die zu einem Aminosäureaustausch führen, auch die Sekundärstruktur des Proteins verändern, führten wir mit Hilfe des Programms *ProF 1.0* eine *in silico* Analyse des Wildtyp- und des Mutation-Proteins durch.

Während der SNP IL-15Ra_G11284A zu keiner Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins führt, bedingt der SNP IL-15Ra_A17088C einen Aminosäureaustausch an der Position 182 der Isoform 1 bzw. an der Position 146 der Isoform 2: da im Mutationstyp ein Cytidin das Adenosin ersetzt, liegt im Protein anstatt des Asparagins ein Threonin vor. Die Abbildung 3.7 zeigt die jeweilige Aminosäuresequenz und die daraus berechnete Sekundärstruktur der IL-15Ra-Protein-Isoformen und stellt den Wildtyp dem Mutationstyp gegenüber. In der Abbildung wird deutlich, dass der Aminosäureaustausch zu einer Änderung der Proteinsekundärstruktur führt: statt der *Coil*-Struktur des Wildtyps (diese entspricht weder einer α -Helix- noch einer β -Faltblatt-Struktur) wird im Mutationstyp eine β -Faltblatt-Struktur ausgebildet.

Abb. 3.7a Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der Isoform 1 des Proteins IL-15Ra

(1./2. Zeile Wildtyp, 3./4. Zeile Mutationstyp, 1./3. Zeile: Aminosäuresequenz in Einbuchstaben-kodierung [siehe Anhang], 2./4. Zeile Proteinsekundärstruktur; H= α -Helix, E= β -Faltblatt, C=*Coil*; im Rahmen die veränderte Aminosäuresequenz und die daraus resultierende Proteinstruktur)



P P G V Y P Q G H S D T T V A I S T S T V L L C G L S A V S L L A C Y L K S R Q T P P L A S V E
 C C C C C C C C C C C C C C E E E E E E C C C E E E C C C C C H H H H H H H H H C C C C C C C C C C C C H

 P P G V Y P Q G H S D T T V A I S T S T V L L C G L S A V S L L A C Y L K S R Q T P P L A S V E
 C C C C C C C C C C C C C C E E E E E E C C E E E E C C C C C H H H H H H H H H C C C C C C C C C C C C E E

M E A M E A L P V T W G T S S R D E D L E N C S H H L
 H H H H H C

M E A M E A L P V T W G T S S R D E C L E N C S H H L
 E H H C C C C C C C E C C C C C C C C C C H C C C C C C C

Abb. 3.7b Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der Isoform 2 des Proteins IL-15R α

(1./2. Zeile Wildtyp, 3./4. Zeile Mutationstyp, 1./3. Zeile: Aminosäuresequenz in Einbuchstabenkodierung [siehe Anhang], 2./4. Zeile Proteinsekundärstruktur; H=α-Helix, E=β-Faltblatt, C=Coil; im Rahmen die veränderte Aminosäuresequenz und die daraus resultierende Proteinstruktur)

Der SNP STAT-1_T63C liegt im Exon 3 des Gens (siehe Abbildung 3.3) und bedingt einen Aminosäureaustausch an der Position 21 des STAT-1-Proteins: da im Mutationstyp ein Cytidin das Thymidin ersetzt, liegt im Protein anstatt des Leucins ein Prolin vor. Die Abbildung 3.8 zeigt die jeweilige Aminosäuresequenz und die daraus berechnete Sekundärstruktur der STAT-1-Protein-Isoformen und stellt den Wildtyp dem Mutationstyp gegenüber. Aus der Abbildung wird deutlich, dass der Aminosäureaustausch zu keiner Änderung der Proteinsekundärstruktur führt.

Abb. 3.8a Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der längeren Isoform des Proteins STAT-1

(1./2. Zeile Wildtyp, 3./4. Zeile Mutationstyp, 1./3. Zeile: Aminosäuresequenz in Einbuchstabenkodierung [siehe Anhang], 2./4. Zeile Proteinsekundärstruktur; H=α-Helix, E=β-Faltblatt, C=Coil; im Rahmen die veränderte Aminosäuresequenz und die daraus resultierende Proteinstruktur)

Abb. 3.8b Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der kürzeren Isoform des Proteins STAT-1

(1./2. Zeile Wildtyp, 3./4. Zeile Mutationstyp, 1./3. Zeile: Aminosäuresequenz in Einbuchstabenkodierung [siehe Anhang], 2./4. Zeile Proteinsekundärstruktur; H=α-Helix, E=β-Faltblatt, C=Coil; im Rahmen die veränderte Aminosäuresequenz und die daraus resultierende Proteinstruktur)

Sequence logo showing the conservation of amino acids across 10 homologous protein sequences. The x-axis represents the position of each amino acid, and the y-axis lists the amino acids: M, S, Q, W, Y, E, L, Q, G, L, D, S, K, F, I, R, V, H, Q, P, Y, C, H, N, F, L, L, Q, H, N, I, R, K, S, K, R, N, L, Q, D, N, F, Q, E.

3.6. Strukturanalyse der in den Introns lokalisierten SNPs

In den nicht kodierenden Sequenzen eines Gens liegen Elemente, die die Proteinbiosynthese durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren regulieren. Durch Mutationen in diesen Genbereichen kann das Bindungsverhalten dieser Faktoren beeinflusst und die Transkription des Gens gestört werden (siehe auch 1.5.1.). In unserer *in silico* Analyse durch das Programm *MatInspector* detektierten wir die potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen um die identifizierten SNPs und stellten die Ergebnisse des Mutationstyps denen des Wildtyps gegenüber. Die Tabelle 3.18 zeigt ausgewählte Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die sich in der Gegenüberstellung des Wildtyps und Mutationstyps wesentlich voneinander unterscheiden. Die vollständige Aufführung der Transkriptionsfaktorbindungsstellen ist unter <http://www.asthmagene.de/supplement> einsehbar.

Bei der Gegenüberstellung der Transkriptionsfaktorbindungsstellen fällt auf, dass einige SNPs die Bindung wesentlicher Transkriptionsfaktoren beeinflussen könnten. Der Mutationstyp der SNPs IL-15_G20A und STAT-1_T-5008C führt laut unserer *in silico* Analyse dazu, dass STAT-1 als Transkriptionsfaktor nicht mehr an die entsprechenden Gensequenzen binden kann bzw. dazu, dass statt STAT-3 andere Faktoren aus der STAT-Familie binden (siehe Tabelle 3.18). Des Weiteren bedingen SNPs in allen drei untersuchten Genen der IL-15-Signalkaskade potentiell eine veränderte Bindung der TATA-Box, welche für die Regulation der Gentranskription essentiell ist (siehe IL-15_A10284G, IL-15Ra_T-2092C, STAT-1_T-1172G in der Tabelle 3.18). Auch die Bindung ubiquitär verbreiteter Transkriptionsfaktoren aus den Familien der GATA- und IRF-Faktoren wird durch verschiedene SNPs beeinflusst (siehe IL-15Ra_C11997A, STAT-1_G-5485A, STAT-1_C413A, STAT-1_T1177A, STAT-1_T11321C, STAT-1_T11954A, STAT-1_C28527T, STAT-1_C31285T, STAT-1_C32971T und STAT-1_A39134C in der Tabelle 3.18).

Tab. 3.18 Strukturanalyse der im Promotorbereich und in den Introns lokalisierten SNPs
(selektierte SNPs; (+)=Bindung an Matrizenstrang, (-) = Bindung an komplementären Strang)

SNP	Wildtyp Transkriptionsfaktor	Strang	Mutationstyp Transkriptionsfaktor	Strang
IL-15				
G20A	Signal transducer and activator of transcription 1	(+)	Ecotropic viral integration site 1 encoded factor	(+)
	Transcriptional repressor CDP	(-)	Transcriptional repressor CDP	(-)
A10284G	MEF2	(-)		
	Cellular and viral TATA box elements	(-)		
	Xenopus fork head domain factor 2 (Foxl1a)	(-)		
	Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. Factor	(-)		
	Brn-3, POU-IV protein class	(+)		
	Cellular and viral TATA box elements	(+)		

Tab. 3.18 (Forts.) Strukturanalyse der im Promotorbereich und in den Introns lokalisierten SNPs
 (selektionierte SNPs; (+)=Bindung an Matrizenstrang, (-) = Bindung an komplementären Strang)

SNP	Wildtyp Transkriptionsfaktor	Strang	Mutationstyp Transkriptionsfaktor	Strang
IL-15Rα				
T-2092C	Cellular and viral TATA box elements	(+)		
C11997A			Special AT-rich sequence-binding protein 1, (-) predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	
			GATA-binding factor 3	(-)
STAT-1				
G-5485A			GATA-binding factor 3	(+)
T-5008C	Signal transducer and activator of transcription 3	(+) (+)	Signal transducers and activators of transcription	(-)
			Signal transducer and activator of transcription 1	(+)
T-1172G	Pdx1 (IDX1/IPF1) pancreatic and intestinal homeodomain TF	(+)	Cellular and viral TATA box elements	(+)
	Hepatic nuclear factor 1	(-)		
C413A	TG-interacting factor belonging to TALE class of homeodomain factors	(-)	Zebrafish PAX2 paired domain protein	(+)
			Interferon regulatory factor 1	(+)
			AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	(-)
T1177A	Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	(-)	cAMP-responsive element binding protein 1	(-)
			E4BP4, bZIP domain, transcriptional repressor	(+)
			GATA-binding factor 1	(-)
			Promyelocytic leukemia zink finger (TF with nine Krueppel-like zink fingers)	(+)
T11321C	Sex-deter-ing region Y gene product	(-)	Interferon regulatory factor 3 (IRF-3)	(-)
	Multifunctional c-Abl src type tyrosine kinase	(-)	Lentiviral TATA upstream element	(-)
	HNF-3/Fkh Homolog 2 (FOXD3)	(-)	Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	(-)
T11954A	Xenopus homeodomain factor Xvent-2; early BMP signaling response	(+)	Intestine specific homeodomain factor CDX-1	(-)
	Growth factor independence 1 zinc finger protein Gfi-1B	(-)	GATA-binding factor 3	(+)
	Brn-3, POU-IV protein class	(-)	Ecotropic viral integration site 1 encoded factor	(+)
	Cone-rod homeobox-containing transcription factor / otx-like homeobox gene	(-)	Pu.1 (Pu120) Ets-like transcription factor identified in lymphoid B-cells	(+)
	Myocyte enhancer factor	(+)		
C28527T	Cut-like homeodomain protein	(-)	PAX 2/5/8 binding site	(+)
	Complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site 2	(+)	GATA-binding factor 1	(+)
C31285T	Bipartite binding site of VDR/RXR heterodimers: 2 spacer nucleotides between the two directly repeated motifs	(-)	Nuclear factor Y (Y-box binding factor)	(-)
			GATA-binding factor 1	(+)
C32971T			Interferon regulatory factor 2	(-)
			PPAR/RXR heterodimers	(-)
A39134C			Bel-1 similar region (defined in Lentivirus LTRs)	(-)
	GATA 3 binding factor	(+)	GATA 3 binding factor	(+)

3.7. Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit identifizierten wir für die Gene der IL-15-Signalkaskade 100 SNPs. 45 der 46 für die Genotypisierung ausgewählten SNPs konnten erfolgreich genotypisiert werden. Hiervon entsprachen 44 SNPs unseren Qualitätskriterien und konnten in einer anschließenden Assoziationsanalyse näher untersucht werden. 9 SNPs aus den Genen IL-15R α und STAT-1 zeigten in der ersten genotypisierten Population (Dresden) signifikante Assoziationen zu den untersuchten Merkmalen „Asthma“, „pfeifendes / keuchendes Atemgeräusch“, „atopische Dermatitis“, „Atopie“ und „Gesamt-IgE“ und wurden in einer weiteren Population (München) genotypisiert.

Von den 9 SNPs, die signifikante Assoziationen zeigten, erscheinen die SNPs IL-15R α _A17088C und STAT-1_C39134A besonders interessant: sowohl das Risikoallel C des SNPs IL-15R α _A17088C alleine als auch der Haplotyp, der neben diesem Risikoallel auch das Risikoallel T des SNPs IL-15R α _G24762T enthält, wirken protektiv auf die Entstehung eines Asthmas (siehe Tabellen 3.8 und 3.10). Des Weiteren zeigten die *in silico* Analysen, dass die Region um den SNP konserviert ist (siehe Abbildung 3.5) und dass der durch den SNP bedingte Aminosäureaustausch zu einer Strukturänderung des Proteins führt (siehe Abbildung 3.7).

Tritt der SNP STAT-1_C39134A auf, war dies signifikant mit weniger Gesamt-IgE-Antikörpern, mit weniger spezifischen IgE-Antikörpern und mit einem geringeren Atopierisiko assoziiert (siehe Tabelle 3.16). Der SNP liegt in einer konservierten Genregion (siehe Abbildung 3.6) und innerhalb dieser in unmittelbarer Nähe zu der Kernbindungsstelle des Transkriptionsfaktors GATA-3 (siehe Tabelle 3.18), welcher die Differenzierung und den Erhalt von Th₂-Zellen im menschlichen Körper reguliert.

4. Diskussion

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Proteine der IL-15-Signalkaskade immunologisch wirksam sind und die Pathogenese atopischer Erkrankungen beeinflussen.

Das proinflammatorische Zytokin IL-15 wirkt auf viele an Immunreaktionen beteiligte Zellen in unterschiedlicher Weise, wobei es weniger eine universelle Aufgabe im Rahmen der Immunantwort besitzt, sondern vielmehr die Quantität immunologischer Reaktionen reguliert. Wie unter 1.4. genauer dargestellt, wirkt IL-15 chemotaktisch auf viele Immunzellen, bedingt dadurch deren Infiltration in den Entzündungsherd und beeinflusst sie sowohl in ihrer Proliferation als auch in ihrer funktionellen Reifung. IL-15 fördert diese Zellen zudem in der Ausführung der Phagozytose, Zytokinsekretion und Zytotoxizität. Bezuglich der Proliferation scheinen vor allem $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-, NKT-Zellen und CD8 $^+$ T-Zellen stark IL-15-abhängig zu sein, wohingegen lediglich geringe Einflüsse des Zytokins auf die Vermehrung von CD4 $^+$ T-Zellen gezeigt werden konnten. Durch die zusätzliche antiapoptotische Wirkung auf viele dieser Zellen ermöglicht IL-15 außerdem deren Persistenz im entzündlichen Gewebe und trägt somit über viele Wege zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündung bei.

IL-15 kann sowohl in die Membran integriert sein als auch als Rezeptor fungieren als auch „klassisch“ als freies Zytokin agieren und als solches an den IL-15R binden. Der IL-15R besteht aus drei Ketten: während die β - und die γ -Kette auch Elemente anderer Rezeptoren sind, ist die α -Kette (IL-15Ra) spezifisch für diesen Rezeptor und verhält sich hochaffin gegenüber IL-15.³¹

Die Bindung des IL-15 an den IL-15R vermittelt wiederum die Aktivierung und damit verbundene Zellkernmigration von Faktoren aus der Familie der *signal transducer and activator of transcription* (STAT), die das Signal in den Kern übertragen und dadurch die Transkription von Genen modulieren können.^{26,31} Hierbei kann eine Bindung von IL-15 an den IL-15R neben einer Aktivierung von STAT-3 und STAT-5 zu einer solchen von STAT-1 führen.^{51,52}

Während für die Gene IL-15 und STAT-1 in früher durchgeföhrten Mutationsanalysen bereits SNPs identifiziert wurden, wurde ein solches Mutationsscreening für das Gen IL-15Ra bisher noch nicht veröffentlicht. Da die Proteine der IL-15-Signalkaskade durch ihre im Tiermodell dargestellte funktionelle Relevanz in der Entstehung und Unterhaltung atopischer Erkrankungen als Kandidatengene für diese anzusehen sind, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein Mutationsscreening für das IL-15Ra-Gen durchgeführt; in einer anschließenden Assoziationsanalyse wurden die Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1 detailliert hinsichtlich ihres Einflusses auf atopische Phänotypen und Merkmale untersucht.

4.1. Kritische Betrachtung des Studienaufbaus

Da wir auf der Grundlage bereits publizierter Daten unterschiedliche Kenntnisse über die Gensequenz und über die in den Genen vorliegenden SNPs besaßen, gingen wir bei der Auswahl der zu genotypisierenden SNPs unterschiedlich vor:

Kurz et al. zeigten bereits einen Zusammenhang von Haplotypen, die aus fünf SNPs des Gens IL-15 gebildet wurden, zu Asthma und Atopie.⁷⁰ Diese Ergebnisse wurden in unserer Studienpopulation aus Dresden auf ihre Konstanz getestet.

Für das Gen IL-15R α detektierten wir in einem initialen Mutationsscreening 43 SNPs. Hiervon zeigten 25 SNPs in unserer Kontrollpopulation eine MAF > 10 %, aus welchen über die Berechnung des Kopplungsungleichgewichts 19 *tagging SNPs* für die anschließende Genotypisierung ausgewählt wurden. Aufgrund ihrer Lage im Promotor und einer dadurch vermuteten funktionellen Relevanz wurden zwei zusätzliche seltene SNPs genotypisiert.

Von den 52 SNPs des Gens STAT-1, die auf <http://www.innateimmunity.net> veröffentlicht wurden, zeigten 28 eine MAF > 10 %.⁷¹ Aus diesen wurden 18 *tagging SNPs* für die anschließende Genotypisierung ausgewählt. Wie auch für IL-15R α wurden zwei aufgrund ihrer Lage interessante aber seltene SNPs zusätzlich genotypisiert.

Die Kontrollpopulation für das initiale Mutationsscreening des IL-15R α -Gens bestand aus 40 nichtverwandten, freiwilligen, zufällig ausgewählten erwachsenen Personen. Aufgrund der Größe des IL-15R α -Gens sequenzierten wir im Rahmen dieser Arbeit nicht das ganze Gen, sondern beschränkten uns auf die Exons (einschließlich eines flankierenden Bereichs von ca. 500 bp) und auf funktionell interessante Bereiche wie den Promotorbereich. Nur diejenigen SNPs, deren MAF in der Kontrollpopulation über 10 % lag, wurden in der anschließenden Genotypisierung näher untersucht. Diese Grenze galt auch für die auf <http://www.innateimmunity.net> veröffentlichten SNPs des STAT-1-Gens.

Für die Genotypisierung der Gene IL-15, IL-15R α und STAT-1 diente eine Querschnittspopulation aus 9-11jährigen Kindern deutscher Abstammung (ISAAC II). Heath et al. zeigten erst kürzlich, dass diese Population die westeuropäische Bevölkerung uneingeschränkt repräsentiert, und sichern damit ihre Qualität und Aussagekraft.⁹⁷

Mit einer Gesamtzahl von 1940 untersuchten Kindern ist die dieser Arbeit zugrundeliegende Studie die bisher größte Assoziationsstudie für das Gen IL-15; des Weiteren ist sie die erste Studie ihrer Art für das Gen IL-15R α .

Im Gegensatz zu klassischen Fall-Kontroll-Studien können in auf Querschnittspopulationen basierenden Studien nur häufig auftretende Erkrankungen untersucht werden. Da die von uns untersuchten Phänotypen in den westlichen Industrienationen jedoch mit einer

Prävalenz von circa 10 % auftreten (siehe auch 1.1. und 1.2.), beeinträchtigt dieser Aspekt unser Studiendesign nicht. Ein Vorteil von Querschnittsstudien gegenüber Fall-Kontroll-Studien liegt darin, dass diese die separate, parallele Analyse verschiedener Phänotypen ermöglichen, ohne eine Verlinkung der untersuchten Merkmale miteinander und damit eine statistische Verfälschung der Ergebnisse befürchten zu müssen.

Für die Zuordnung der Probanden unserer Studienpopulation zu den untersuchten Phänotypen (Asthma, atopische Dermatitis, allergische Rhinokonjunktivitis, allergische Sensibilisierung, pfeifendes / keuchendes Atemgeräusch, erhöhte Menge an IgE-Antikörpern) wurden neben objektiven Untersuchungsmethoden auch Fragebögen verwendet: ein Kind wurde als an Asthma / allergischer Rhinokonjunktivitis / atopischer Dermatitis erkrankt kategorisiert, wenn anhand des Fragebogens eine dieser Krankheiten von einem Arzt diagnostiziert wurde. Dieses Vorgehen wird häufig als Schwachstelle von Assoziationsstudien aufgeführt, da davon ausgegangen wird, dass die Angaben in den Fragebögen einer hohen Subjektivität der Eltern unterliegen. Neue Studien, in welchen stichprobenartig die schriftlich angegebenen Beschwerden durch objektive Untersuchungsmethoden überprüft wurden, zeigen jedoch eine hohe Validität solcher standardisierter Fragebögen.⁹⁸

In der vielschichtigen kritischen Betrachtung unserer Studienpopulation können wir somit eine hohe Validität dieser annehmen.

Für die Genotypisierung der Gene IL-15Ra und STAT-1 wurden diejenigen SNPs ausgewählt, deren MAF in der jeweiligen Kontrollpopulation über 10 % lag. Es kann argumentiert werden, dass auch SNPs mit einer MAF unter 10 % eine Assoziation zu den untersuchten Phänotypen und Merkmalen zeigen könnte, welche uns aber aufgrund der fehlenden Genotypisierung entgangen sein könnte. Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass so weit verbreitete Erkrankungen wie Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis und allergische Dermatitis eher von häufigeren als von selteneren Mutationen maßgebend beeinflusst werden. Die bisherigen Erfahrungen in der genetischen Erforschung verschiedener Krankheitsbilder zeigen, dass die genetischen Mutationen, die diesen häufigen Erkrankungen zugrundeliegen, meistens auch in einem großen Anteil der Bevölkerung zu finden sind.

Des Weiteren würden seltene SNPs, die dennoch diese Krankheiten maßgebend beeinflussen, nicht allein sondern generell in Kombination mit anderen Mutationen vererbt werden, sodass die von uns durchgeführten Haplotypanalysen solche seltene, aber dennoch maßgebend relevante SNPs mit großer Wahrscheinlichkeit detektiert hätten. Somit ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass wir durch unsere SNP-Selektion wesentliche, kausale SNPs nicht ausreichend untersucht haben.

Dennoch bleibt zu klären, inwiefern in den in dieser Arbeit nicht sequenzierten Bereichen noch SNPs liegen und ob die von uns gefundenen Assoziationen auch in anderen Populationen, die anderen (Umwelt-) Faktoren ausgesetzt sind, vorliegen.

Um die statistische Aussagekraft von Studien bewerten zu können, muss die sogenannte statistische *Power* einer Studie bestimmt werden (beispielsweise auf <http://dceg.cancer.gov/bb/tools/pga>). Diese setzt sich aus der Populationsgröße, der Häufigkeit der genetischen Mutationen in der Allgemeinbevölkerung und der Stärke des analysierten Effekts auf diese Merkmale (gemessen anhand der OR) zusammen.

Die OR für die Risikoallele der identifizierten, relevanten Polymorphismen lag in dieser Studie zwischen 1.13 und 1.47 und liegt damit in dem von uns im Vorhinein erwarteten Bereich. Die Berechnung der statistischen *Power* zeigt, dass der Effekt von genetischen Mutationen mit einer MAF < 10 % sehr stark sein müsste, um das untersuchte Merkmal wesentlich beeinflussen zu können. Ein solcher starker Effekt ist bei so häufig auftretenden Erkrankungen wie den atopischen Erkrankungen jedoch sehr unwahrscheinlich; zudem hätten wir – wie bereits oben dargestellt – solche seltene, aber wesentliche Mutationen durch unsere Haplotypanalysen detektiert.

Durch die große Gesamtpopulation, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, und das häufige Auftreten der Polymorphismen in der Bevölkerung (die minimale MAF in der Studienpopulation lag bei 36 %) erreichten wir auch bei vermeintlich gering ausgeprägten Effekten eine hohe statistische Aussagekraft und damit eine hohe Relevanz der vorliegenden Arbeit.

Zusätzlich zu der Genotypisierung der ausgewählten 46 SNPs führten wir für alle 100 SNPs der drei Gene verschiedene *in silico* Analysen durch: wir verglichen die Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1 des Menschen mit den analogen Gensequenzen der Maus sowie mit denen des Haushunds und analysierten sowohl die exonischen als auch die intronischen SNPs bezüglich potentieller Strukturänderungen.

Mit Hilfe des Programms *Vista Genome Browser* führten wir eine vergleichende Analyse der Gensequenzen verschiedener Arten durch: für alle drei Gene wurden die jeweiligen Sequenzen zwischen dem Menschen, der Maus (als Beispiel einer dem Menschen phylogenetisch ferneren Tierart) und dem Haushund (als Beispiel einer dem Menschen phylogenetisch näheren Tierart) verglichen. Hierbei zeigten sich in allen drei Genen über alle drei Spezies stark konservierte intronische Elemente (siehe 3.4.). Die Konservierung der Sequenzen ist Ausdruck einer geringen Veränderung der entsprechenden Gensequenzen im Laufe der Evolution, sodass sich die Frage stellt, warum gerade diese Elemente so stark konserviert sind. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass gerade der Inhalt dieser

Genabschnitte funktionell enorm bedeutsam ist und daher im Zuge der Evolution als besonders schützenswerter und notwendiger Genbereich nahezu unverändert blieb. Somit kann eine hohe funktionelle Bedeutung dieser konservierten Regionen vermutet werden. Durch eine Assoziationsanalyse aller intronischen Sequenzen und durch anschließende funktionelle Studien der Mutationen könnten weitere Einblicke in die Funktion dieser konservierten Elemente gewonnen werden.

Die *in silico* Strukturanalyse der in den Promotorregionen und den Introns liegenden SNPs mit Hilfe des Programms *MatInspector* zeigte, dass durch die insgesamt 20 in den Promotorsequenzen und den 70 in den Introns liegenden SNPs zahlreiche Transkriptionsfaktoren in ihrem Bindungsverhalten verändert werden (siehe Tabelle 3.18). In allen drei Genen führen beispielsweise SNPs in der Promotorregion zu einer veränderten Bindung der TATA-Box, welche für die Regulation der Gentranskription in vielen Genen essentiell ist. Kann die TATA-Box nicht mehr regelrecht an die Promotorregion binden, kann dies wiederum die Expression der mRNA und damit die Synthese der Proteine stören (siehe auch 3.6.). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass das Programm *MatInspector* auf rein mathematisch berechneten Ähnlichkeiten der eingegebenen Sequenz mit den gespeicherten, statistisch generierten Matrizen basiert und bei einer Analyse großer genomicscher Sequenzen durchaus zu falsch positiven Ergebnissen führen kann, sodass diese ersten Ergebnisse für eine zuverlässigere Aussage auf ihre funktionelle Relevanz überprüft werden sollten. Da das Programm zudem nicht berücksichtigt, ob der entsprechende Transkriptionsfaktor in dem zu untersuchenden Organismus auch tatsächlich vorkommt, müssen die erlangten Ergebnisse auch auf einen sinnvollen biologischen Kontext überprüft werden. Dennoch ermöglicht die Detektion dieser potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen eine grundlegende Strukturanalyse der untersuchten Promotor- und Intronsequenzen, die weiter ausgebaut werden kann. Zudem stellt die Kenntnis potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen die Grundlage einer genaueren Promotoranalyse dar, die durch die Analyse konservierter Sequenzen sowie durch die Identifikation gemeinsamer Regulationseinheiten von koregulierten Genen weiter ausgebaut werden muss.

Die mit Hilfe des Programms *Prof 1.0* durchgeführte Strukturanalyse der in den Exons liegenden SNPs zeigte potentielle Änderungen der Sekundärstruktur des Proteins IL-15Ra, welche unter 4.2. diskutiert werden.

4.2. Die IL-15-Signalkaskade und ihre Rolle im atopischen Kontext

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Gene der IL-15-Signalkaskade einen Einfluss auf die Entstehung von atopischen Erkrankungen im Kindesalter haben. Nach Abschluss unserer Assoziationsstudie können wir diese Frage bejahen. Im Gegensatz zu anderen Studien weisen unsere Ergebnisse jedoch darauf hin, dass dieser Einfluss eher auf die Genveränderung in den Genen IL-15Ra und STAT-1, nicht jedoch auf solche in IL-15, zurückzuführen ist.

Kurz et al. und Bierbaum et al. zeigten eine Assoziation von Haplotypen, die aus fünf SNPs des IL-15-Gens gebildet wurden, zu Asthma und Atopie.^{70,99} Diese Ergebnisse konnten in unserer Studie nicht bestätigt werden: weder die einzelnen SNPs noch die daraus berechneten Haplotypen zeigten in der ISSAC II-Subpopulation aus Dresden eine Assoziation zu den atopischen Phänotypen Asthma, allergische Rhinokonjunktivitis und atopische Dermatitis oder zu mit diesen Erkrankungen assoziierten Merkmalen. Die durchgeführten *in silico* Analysen des IL-15-Gens ließen keine besondere Bedeutung dieses Gens bei der Entstehung und Unterhaltung atopischer Erkrankungen vermuten; in der Strukturanalyse der SNPs zeigt sich im Vergleich des Wildtyps und des Mutationstyps zwar ein geändertes Bindungsverhalten einzelner Transkriptionsfaktoren, sodass eine durch die SNPs veränderte Expression des IL-15-Gens denkbar wäre. Unsere Assoziationsanalyse belegt aber, dass diese möglicherweise veränderte Genexpression jedoch nicht stark genug ist, um die Entstehung von atopischen Erkrankungen und Merkmalen zu beeinflussen.

Da die Studienpopulation der vorliegenden Arbeit quantitativ und qualitativ hochwertig ist, die Ergebnisse aber noch nicht mal einen Trend weder zu einer positiven noch zu einer negativen Assoziation mit den untersuchten Erkrankungen und Merkmalen zeigen, ist ein statistischer Fehler vom Typ II (falsch negative Ergebnisse) sehr unwahrscheinlich. Auch eine im Anschluss an diese Studie durchgeführte weitere Assoziationsanalyse, die alle *tagging SNPs* aus dem HapMap Projekt (<http://www.hapmap.org>) einschloss, zeigte keine Ergebnisse, die eine atopische Assoziation vermuten ließen und schließt einen statistischen Fehler vom Typ II fast vollständig aus.¹⁰⁰ Diese Erkenntnisse stimmen auch mit Ergebnissen anderer Studien überein: so analysierten Christensen et al. ebenfalls den SNP C-80T und vier weitere, in unserer Studie nicht untersuchte SNPs des Gens IL-15: die Assoziationsanalyse in einer Population aus 135 dänischen Familien und 424 dänischen Einzelpersonen zeigte, dass diese untersuchten SNPs weder mit den drei atopischen Erkrankungen (Asthma, atopische Dermatitis, allergische Rhinokonjunktivitis) noch mit einer allergischen Sensibilisierung gegenüber weitverbreiteten Allergenen noch mit der Bildung spezifischer IgE-Antikörper gegen ubiquitäre Allergene assoziiert waren.¹⁰¹

Aus zahlreichen, nicht genetisch basierten Studien ist bekannt, dass das proinflammatorische IL-15 verschiedene Zellen des Immunsystems in unterschiedlicher Art und Weise beeinflusst. Es besitzt hierbei keine universelle Aufgabe sondern ist vielmehr an der quantitativen Regulation von zahlreichen immunologischen Reaktionen beteiligt. Es scheint daher auf den ersten Blick etwas verwunderlich, dass IL-15 in unserer und weiteren Assoziationsstudien kein Einfluss auf atopische Erkrankungen, insbesondere auf Asthma, zugesprochen werden kann, wo doch diesen atopischen Erkrankungen ein Ungleichgewicht gerade dieser immunologisch wirksamen Zellen zugrunde liegt. Nachdem die ursprünglichen Daten davon ausgingen, dass IL-15 beispielsweise die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen direkt beeinflusst, weist die aktuelle Studienlage aber darauf hin, dass IL-15 zusätzliche indirekte Effekte auf die Regulation der Immunantwort und der Zellhomöostase ausübt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass gar nicht das IL-15 selbst, sondern die Zytokine, die in der IL-15-Signalkaskade dem IL-15 folgen, die immunologische und damit auch die atopische Pathogenese beeinflussen (siehe auch 1.4). Um diese These weiter zu untersuchen, führten wir wie für das IL-15-Gen auch für die Gene IL-15R α und STAT-1 eine Assoziationsanalyse durch.

Der IL-15/IL-15R-Komplex führt in der weiteren Signalkaskade zu einer Aktivierung von STAT-Proteinen. Einigen der ubiquitär verbreiteten Zytokinen der STAT-Familie konnte bereits ein Einfluss auf die atopische Genese zugesprochen werden.^{102,103} Neben STAT-3 und STAT-5 wird in der IL-15-Signalkaskade häufig auch STAT-1 aktiviert. Dieses Zytokin beeinflusst vor allem die Transkription von IFN- γ , kann darüberhinaus aber auch die Transkription von zahlreichen an verschiedenen Immunreaktionen beteiligten Proteinen wie IRF-1, IL-21, ICAM-1, iNOS und SOCS 1-3 und letztendlich auch die von sich selbst modulieren.^{51,61,63} Zudem kann die Protein-Isoform STAT-1 α das Wachstum einiger Zellen (wie beispielsweise B-Lymphozyten und Herzmuskelzellen) hemmen und die Apoptose dieser induzieren.^{62,64} Als Teil der IL-15-Signalkaskade bedingt es vor allem die durch IL-15 induzierte IFN- γ -Expression in NK- und ($\gamma\delta$) T-Zellen.^{51,52} Aufgrund der vielseitigen Wirkungsweise des Proteins STAT-1 auf immunologisch bedeutsame Zellsysteme und aufgrund der Beteiligung an der IL-15-Signalkaskade analysierten wir neben dem IL-15-Gen auch das STAT-1-Gen bezüglich seines Einflusses auf die Genese atopischer Erkrankungen.

Aus den 52 SNPs im Gen STAT-1, die auf <http://www.innateimmunity.net> veröffentlicht wurden⁷¹, wählten wir 20 SNPs für die initiale Genotypisierung in einer ersten Population (Dresden-Subpopulation der ISAAC II Studie) aus. Die Assoziationsanalyse zeigte für einige SNPs signifikante Zusammenhänge mit den untersuchten atopischen Phänotypen und Merkmalen, wobei wir für die statistische Analyse das allelische Rechenmodell verwendeten

(siehe Tabellen 3.14, 3.15 und 3.16). Aufgrund seiner Lage im Gen verdient der SNP C39134A besondere Beachtung.

Das selteneren Allel A des SNPs C39134A war in der Dresden-Population signifikant mit weniger Gesamt-IgE-Antikörpern assoziiert. In der München-Population konnte diese Assoziation nicht gezeigt werden, allerdings war das selteneren Allel hier mit einem signifikant geringeren Risiko einer Atopie assoziiert (OR 0.80, p = 0.02). In der gemeinsamen Population waren für das selteneren Allel sowohl die Gesamt-IgE- als auch die spezifischen IgE-Werte als auch das Atopierisiko signifikant erniedrigt (siehe Tabellen 3.15 und 3.16).

Die leicht divergenten Ergebnisse in den beiden Populationen könnten durch unterschiedliche Umweltbedingungen erklärt werden: während der ersten drei Lebensjahre der Kinder bestand noch die ehemalige DDR, sodass die Kinder aus der Dresden-Population anderen Lebensumständen ausgesetzt waren als die in München lebenden Kinder. Die Unterschiede, die sich bei der Assoziationsanalyse dieses SNPs in den beiden Populationen zeigten, könnten damit also Ausdruck der schon vielfach vermuteten Gen-Umwelt-Interaktion bei der Entstehung atopischer Erkrankungen sein. Hierbei wird davon ausgegangen, dass ein genetisch bedingter Effekt durch verschiedene Umwelteinflüsse eine unterschiedliche Ausprägung zeigt. So könnte die durchschnittlich höhere Geschwisteranzahl sowie die frühe Betreuung in Kindertagesstätten die Kinder aus Dresden im Sinne der Hygienehypothese vor einer allergischen Sensibilisierung bewahrt haben.²³

Der Einfluss auf die atopische Sensibilisierung könnte zudem durch die Lokalisation bedingt sein: der SNP C39134A liegt in einem stark konservierten *cis* regulatorischen Element im Intron 24, das durch den Vergleich der genomischen Sequenz des Menschen mit der Maus und des Haushundes identifiziert wurde (siehe Abbildung 3.6). In diesem Vergleich der genomischen Sequenzen verschiedener Spezies können funktionell bedeutsame Elemente detektiert werden, da diese aufgrund ihrer Funktionalität kaum der Evolution unterliegen und damit konserviert werden. Innerhalb dieses Elements liegt der SNP drei Basenpaare von der stark konservierten Kernbindungsstelle des Transkriptionsfaktors GATA-3 entfernt, welcher wiederum die Differenzierung und den Erhalt von Th₂-Zellen im menschlichen Körper reguliert und damit direkt auf die Pathogenese atopischer Erkrankungen wirkt.

Des Weiteren wird der Region um das Gen STAT-1 auf dem Chromosom 2q32-33 bereits eine Assoziation zu erhöhten Gesamt-IgE-Werten (> 90. Perzentile) zugeschrieben.¹⁰⁴ In der näheren Umgebung des Gens STAT-1 liegen zudem weitere Gene, die als mögliche Kandidatengene für die Genese atopischer Erkrankungen gelten: 15 kb entfernt liegt das Gen STAT-4, 12,6 Mb bzw. 12,8 Mb entfernt liegen die Gene CD28 und CTLA4. Den Genen STAT-4 und CTLA4 konnte bereits ein Zusammenhang mit dem Gesamt-IgE¹⁰⁵ und dem Gen STAT-4 ein Einfluss auf die atopische Sensibilisierung gegenüber Hausstaubmilben¹⁰³

nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer entgegengesetzten Assoziation beeinflussen diese Erkenntnisse unsere Ergebnisse jedoch nicht. Eine Kopplung der Polymorphismen dieser Gene mit dem SNP C39134A des Gens STAT-1 wurde zudem über eine Berechnung des LD auf der Basis der Daten aus der Datenbank HapMap ausgeschlossen.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass das seltener Allel des SNPs C39134A bei deutschen Kindern mit Gesamt-IgE-Werten sowie mit einer allergischen Sensibilisierung invers vergesellschaftet ist. Dieses Phänomen könnte durch eine Änderung des *cis* regulatorischen Elements entstehen und sollte – auch für ein besseres Verständnis der Rolle des STAT-1 in der Entstehung atopischer Erkrankungen – durch funktionelle Analysen des SNPs C39134A weitergehend analysiert werden.

Der dargestellte protektive Effekt des SNPs C39134A kann nur teilweise mit dem bisher bekannten Wissen über STAT-1 bei der Entstehung einer Atopie in Einklang gebracht werden kann: in der Vergangenheit wurde einerseits gezeigt, dass STAT-1 überwiegend allergiebegünstigend wirkt¹⁰⁶, andererseits induziert IL-15 in NK- und T-Zellen über STAT-1 eine gesteigerte IFN-γ-Produktion¹⁰⁷. Dieser antiinflammatorisch wirksame Effekt des STAT-1-Proteins muss zu einer detaillierteren Betrachtung der IL-15-Signalkaskade in diesen Zellen führen: in NK- und T-Zellen erfolgt die IL-15-induzierte STAT-1-Aktivierung über den IL-15R. Dieser besteht aus drei Ketten, doch nur die α-Kette des Rezeptors ist spezifisch für diesen Rezeptor, sodass wir neben den Genen IL-15 und STAT-1 auch das IL-15Rα-Gen bezüglich seines Einflusses auf die Genese atopischer Erkrankungen analysierten.

In vielen Studien wurde die α-Kette des IL-15R bereits mit verschiedenen entzündlichen Krankheiten und Prozessen in Verbindung gebracht: so konnte gezeigt werden, dass IL-15Rα-defiziente Mäuse sowohl in der Differenzierung von T-Zellen als auch in dem Erhalt von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen beeinträchtigt waren⁴⁴, dass die Blockierung des IL-15 durch ein lösliches IL-15Rα-Protein (sIL-15Rα) eine entzündliche Arthritis in Mäusen erfolgreich therapiert werden konnte¹⁰⁸ und dass die Blockierung des IL-15Rα-Signals die Induktion von Th₂-Zellen unterband und damit eine allergische Entzündungsreaktion der Atemwege sowie eine Rekrutierung von weiteren proinflammatorischen Zellen und letztendlich die Entstehung einer bronchialen Hyperreagibilität verhinderte⁵⁷. Die von uns postulierte hohe Relevanz von IL-15Rα im Rahmen der IL-15-Signalkaskade korreliert auch mit den aktuellen Thesen über die molekularbiologische IL-15-Präsenz *in vivo*, die dahingehend tendieren, dass IL-15 eher selten in freier Form vorliegt und damit auch selten „klassisch“ an einen Rezeptor aus IL-15Rα, IL-2Rβ und γc bindet, sondern überwiegend durch IL-15Rα an Zelloberflächen gebunden agieren könnte.²⁶ Die Annahme, dass vor allem IL-15Rα maßgeblich an der

proinflammatorischen Wirkung des IL-15 beteiligt ist, wird dadurch gestützt, dass Immunsuppressiva wie Kortison die Expression von IL-15R α senken.¹⁰⁹

Da für das Gen IL-15R α bisher kein Mutationsscreening veröffentlicht wurde, führten wir ein solches durch und detektierten 43 SNPs. Die initiale Genotypisierung der daraus ausgewählten 21 Polymorphismen in einer ersten Population (Dresden-Subpopulation der ISAAC Phase II Studie) zeigte für einige SNPs signifikante Assoziationen zu den untersuchten atopischen Phänotypen und Merkmalen (siehe Tabellen 3.8 und 3.9). Aufgrund ihrer Lage im Gen verdienen die SNPs G11284A, A17088C und G24762T besondere Beachtung.

Das seltenerne Allel A des SNPs G11284A, welcher im Exon 2 liegt, ist mit einem signifikant geringeren Risiko einer Atopie assoziiert. Da aber der SNP trotz seiner Lage im Exon zu keinem Aminosäureaustausch im Protein führt, kann diese gezeigte Assoziation nicht auf eine Änderung der Proteinsekundärstruktur zurückgeführt werden. Allerdings kodiert das Exon 2 die sog. Sushi-Domäne: diese ist ein stark konserviertes, für die Ligandenbindung essentielles Motiv und bedingt im IL-15R α -Protein die hohe Affinität zu IL-15, sodass Protein-Isoformen, die aufgrund eines alternativen Spleißvorgangs in der Proteinbiosynthese kein Exon 2 und damit keine Sushi-Domäne besitzen, kein IL-15 binden können.²⁶

IL-15 steigert als proinflammatorisches Zytokin über die IL-15/IL-15R α -Signalkaskade die Phagozytosefähigkeit von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und fördert zudem die Präsentation eines potentiellen Allergens der antigenpräsentierenden Zellen gegenüber den T-Zellen²⁶, welche durch diesen Allergenerstkontakt B-Zellen zur Produktion spezifischer IgE-Antikörper gegen das Allergen anregen²⁵. Anhand des allergischen Asthmas wurde bereits gezeigt, dass die Blockierung des IL-15R α -Signalwegs neben der Migration inflammatorisch wirksamer Zellen auch die Aktivierung von Th₂-Zellen und damit – im Falle von Asthma – die Entstehung einer allergischen bronchialen Entzündung hemmt. Überträgt man diese Erkenntnisse auf die Entstehung einer allergischen Sensibilisierung, wird durch die gehemmte Aktivierung der Th₂-Zellen weniger IL-4 und IL-13 aus diesen sezerniert, was wiederum eine geringere Produktion von allergenspezifischem IgE durch die B-Zellen bedingt und damit zu einer unterbleibenden Atopieentstehung führt. Ist diese Signalkaskade also durch das Fehlen der Sushi-Domäne und eine damit unterbleibende IL-15/IL-15R α -Interaktion blockiert, könnte dies zum Ausbleiben einer allergischen Sensibilisierung führen. Somit nimmt das Exon 2 eine Sonderstellung innerhalb der Exons des IL-15R α -Gens ein. Selbst wenn die Sushi-Domäne im Rahmen der Proteinbiosynthese in ein IL-15R α -Protein eingebaut wird, könnten bereits kleine Veränderungen – wie beispielsweise der synonome SNP G11284A, der zwar keine Aminosäure austauscht, aber

vielleicht auf einer noch kleineren Ebene Veränderungen hervorruft – im Bereich dieser konservierten Motive zu einer Beeinträchtigung der IL-15-Bindung führen und dadurch zu ähnlichen Auswirkungen wie ein fehlendes Exon 2 – also zu einem erniedrigten Risiko einer Atopieentwicklung – führen. Geht man also von einer starken Sensibilität des Exons 2 und der dadurch kodierten Proteinstruktur gegenüber geringen Mutationen aus, erscheint es durchaus möglich, dass der im Exon 2 liegende SNP trotz eines nicht stattfindenden Aminosäureaustauschs über oben genannte Mechanismen das Risiko, eine Atopie zu entwickeln, senkt.

Das selteneren Allel C des SNPs A17088C, das im Exon 4 einen Aminosäureaustausch bedingt, zeigte im allelischen Modell eine signifikant inverse Assoziation zu Asthma und einen nicht signifikanten inversen Trend zum Vorliegen eines pfeifenden oder keuchenden Atemgeräusches. Träger des selteneren Allels C zeigten des Weiteren eine bessere Lungenfunktion, gemessen am FEV1/FVC-Wert (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von L. A. Pinto et al.). Für die Populationen aus Dresden, München und Leipzig ergaben die Berechnungen im rezessiven Modell jeweils einen protektiven Zusammenhang für Asthma, der jedoch erst unter Berücksichtigung der Dresden-München-Leipzig-Gesamtpopulation signifikant wurde (siehe Tabelle 3.10). Da der SNP G17760A mit dem SNP A17088C gekoppelt ist ($LD = 0,895$), kann davon ausgegangen werden, dass die gezeigten Assoziationen auch für diesen SNP gelten. Signifikante Unterschiede im rezessiven Modell zeigen, dass der untersuchte SNP nur in der homozygoten Form zu einer veränderten Merkmalsausprägung führt, das selteneren Allel sich also nach den Mendelschen Erbregeln rezessiv verhält. In diesem Modell kann der Signifikanznachweis gelegentlich schwierig sein, wenn das selteneren Allel sehr selten und damit im Vergleich unterrepräsentiert ist. Diese Schwierigkeit ist bei diesen beiden SNPs jedoch nicht gegeben, da sie sowohl in der Kontroll- als auch in der Studienpopulation jeweils eine MAF von mindestens 46 % (Mutationsscreening 50 %, Dresden 49 %, München 47 %, Leipzig 46 %) aufwiesen.

Für das selteneren Allel T des SNPs G24762T, der in der 3'UTR des Gens liegt, waren die Risiken einer Asthmaerkrankung sowie eines astmatypischen Atemgeräusches im allelischen Modell signifikant erhöht. Diese Aussagen gelten auch für den SNP G25706A in der flankierenden Region am 3'Ende des Gens, da dieser mit dem SNP G24762T gekoppelt ist ($LD = 0,947$).

Die durchgeführte Haplotypanalyse ergab, dass unter anderem der Haplotyp, der das Risikoallel A des SNPs A17088C und das Risikoallel T des SNPs G24762T in sich vereint, mit einem signifikant höheren Asthma-Risiko assoziiert ist (siehe Tabelle 3.11). Dieses Ergebnis der Haplotypanalyse stützte unsere aus den bisherigen Ergebnissen erlangte

Vermutung, dass der SNP A17088C, eventuell in Verbindung mit dem SNP G24762T, die Entstehung eines allergischen Asthmas beeinflusst.

Diese Vermutung wurde auch durch die *in silico* Analyse durch das Programm *Protein forecasting* bekräftigt: die Berechnung zeigte eine starke Veränderung der Proteinsekundärstruktur durch den SNP A17088C (siehe Abbildung 3.7). Der Austausch von Asparagin durch ein Threonin bedingt scheinbar nicht nur an der entsprechenden Stelle der Aminosäure sondern auch an anderen Stellen des Proteins eine Strukturänderung. Da die Genauigkeit dieser Berechnungen im Allgemeinen um 77 %, im Fall von IL-15Ra zwischen 48 % und 78 % liegen, kann zwar über die Aussagekraft dieser Ergebnisse diskutiert werden, gleichzeitig bekräftigen diese Resultate aber die dringende Notwendigkeit weiterführender funktioneller Studien des Gens und insbesondere des SNPs A17088C.

Im Anschluss an unsere Assoziationsstudie führte die Arbeitsgruppe Immunbiologie des Forschungszentrums Borstel eine auf unseren Ergebnissen basierende funktionelle Studie des SNPs A17088C durch: diese zeigte, dass der homozygote Mutationstyp des SNPs A17088C – im Gegensatz zum Wildtyp und zum heterozygoten Mutationstyp – eine erhöhte IL-15Ra-Expression sowohl auf Monozyten als auch auf Lymphozyten aufwies. Die Erkenntnis, dass lediglich der homozygote Mutationstyp diesen Effekt zeigt, ist direkt kongruent mit unseren statistischen Berechnungen im rezessiven Modell (siehe Tabelle 3.10). Obwohl uns die Strukturanalyse des SNPs A17088C durch das Programm *Prof 1.0* eine veränderte Sekundärstruktur vermuten ließ, war die Bindung von IL-15 an den IL-15Ra aber von der Mutation nicht beeinflusst (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von L. A. Pinto et al.). Die Veränderung in der Rezeptorexpression und die verbesserte FEV1/FVC-Ratio könnte das funktionelle Korrelat zu dem in unserer Assoziationsstudie gezeigten protektiven Effekt des A17088C-Mutationstyps darstellen. Da hiermit unsere Vermutungen, dass dieser SNP unmittelbar protektiv auf die Entstehung eines allergischen Asthmas wirkt, bestätigt werden konnten, ist durchaus denkbar, dass dieser SNP an der Entstehung eines allergischen Asthmas funktionell beteiligt ist.

In der zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse aller drei Gene wird deutlich, dass diejenigen SNPs, bei denen im allelischen Rechenmodell eine signifikante Assoziation gezeigt werden konnte, fast ausschließlich protektiv auf die untersuchten Phänotypen und Merkmale wirken. Lediglich für das seltener Allel eines SNPs in der flankierenden Region am 3'Ende des IL-15Ra-Gens war das Risiko für einzelne untersuchte Merkmale signifikant erhöht. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass alle weiteren SNPs des IL-15Ra- und STAT-1-Gens mit signifikanten Assoziationen protektiv auf die Entstehung von atopischer Dermatitis oder allergischem Asthma wirken oder das Auftreten von einem asthmaassoziierten pfeifenden oder keuchenden Atemgeräusch verhindern oder seltener mit

dem Vorliegen einer Atopie oder von erhöhten IgE-Werten ($> 90.$ Perzentile) vergesellschaftet sind. Somit konnte durch unsere Assoziationsstudie der Kandidatengen-Status dieser beiden Gene in der atopischen Pathogenese bestätigt werden.

4.3. Bedeutung unserer Ergebnisse für die Zukunft

Um die Gene IL-15R α und STAT-1 sowie ihre detaillierte Rolle im atopischen Kontext noch besser evaluieren zu können, sind weitere Assoziationsstudien der Gene und besonders des SNPs A17088C im IL-15R α -Gen sowie des SNPs C39134A im STAT-1-Gen in verschiedenen Populationen mit unterschiedlichem kulturellem, ökologischem und ökonomischem Hintergrund vorgesehen.

Des Weiteren sollten vor allem diejenigen SNPs, die in unserer Studie eine Assoziation zu den untersuchten Merkmalen zeigten, in funktionellen Studien weitergehend analysiert werden, um unsere Ergebnisse auch auf funktioneller Ebene nachzuweisen. Durch unsere *in silico* Strukturanalysen können wir von der funktionellen Relevanz einiger SNPs ausgehen: zum einen konnten wir zeigen, dass besonders die im (potentiellen) Promotorbereich liegenden SNPs zu einem veränderten Bindungsverhalten zahlreicher Transkriptionsfaktoren führen können; zum anderen zeigte unsere Strukturanalyse der exonischen SNPs, dass der SNP A17088C des IL-15R α -Gens scheinbar die Proteinstruktur beeinflusst. Für den SNP A17088C zeigten funktionelle Studien bereits, dass der homozygote Mutationstyp zu einer signifikant erhöhten Rezeptorexpression auf Monozyten und Lymphozyten führte. (siehe auch 4.2.; Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von L. A. Pinto et al.)

Dieses Beispiel zeigt, dass die verschiedenen *in silico* Strukturanalysen lediglich Vermutungen über die morphologischen Korrelate der genetischen Mutationen erlauben, die dann erst in funktionellen Studien belegt werden können; somit sind funktionelle Studien auch für die anderen von uns analysierten SNPs anzustreben. Bei diesen Studien sollte auch an die funktionelle Analyse der jeweiligen *tagged SNPs* gedacht werden, da wir durch unser Studiendesign keine Aussage darüber treffen können, ob die gezeigten Effekte tatsächlich durch den (genotypisierten) *tagging SNP* oder aber durch die mit dem *tagging SNP* gekoppelten *tagged SNPs* hervorgerufen werden.

An der Entstehung atopischer Erkrankungen sind neben den genetischen Voraussetzungen auch die Exposition gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren beteiligt. Diese beiden Seiten können jedoch nicht vollkommen getrennt voneinander betrachtet werden; es muss vielmehr in Betracht gezogen werden, dass die genetischen Voraussetzungen die Reaktion des Immunsystems eines Individuums auf verschiedene Umweltreize modulieren und somit eine

Gen-Umwelt-Interaktion hervorrufen könnte. In den letzten Jahren zeigten Studien bereits einen Zusammenhang zwischen bestimmten Lebensumständen und genetischen Mutationen: Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe 1.1.1.), zeigten epidemiologische Studien, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen, seltener an Asthma und an anderen atopischen Erkrankungen leiden.¹² Eder et al. verknüpften diese Erkenntnisse mit einem Polymorphismus in dem Gen, das für den Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) kodiert: sie wiesen nach, dass auf Bauernhöfen lebende Kinder, die homozygot für das seltenere Allel waren, ähnliche Prävalenzen für Asthma, Asthmasymptome, Atopie und allergischer Rhinitis aufwiesen wie die Kontrollpopulation, die nicht auf einem Bauernhof lebte. Scheinbar können diese für das seltenere Allel homozygoten Kinder also nicht von dem – eigentlich protektiven – Bauernhofleben profitieren.¹¹⁰

Interessanterweise wurde erst kürzlich gezeigt, dass TLR2 auch in direktem Zusammenhang mit IL-15 steht: die durch das Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) induzierte IL-15-Gen-Expression menschlicher Monozyten wird scheinbar über den TLR2 vermittelt.¹¹¹ Somit könnten detaillierte epidemiologische Studien auf der genetischen Grundlage unserer Studienergebnisse enthüllen, inwiefern die Gene der IL-15-Signalkaskade ebenfalls eine Gen-Umwelt-Interaktion eingehen und inwiefern die von uns analysierten SNPs die Reaktion eines Individuums auf verschiedene Umweltfaktoren verändern.

Zusammenfassend können solche Assoziationsstudien der Kandidatengene, die für die Entstehung atopischer Erkrankungen verantwortlich gemacht werden, zu einem besseren Verständnis der multifaktoriellen Entstehung von diesen Erkrankungen beitragen. Langfristig ist es denkbar, aufgrund dieser Kenntnisse neue Präventions- und Therapiestrategien zu entwickeln, die auf den jeweiligen genetischen Hintergrund des Patienten abgestimmt sind.

5. Zusammenfassung

Das proinflammatorisch wirksame Zytokin IL-15 ist über verschiedene molekularbiologische Interaktionen an der Entstehung und Unterhaltung immunologischer Reaktionen beteiligt: es wirkt auf viele Zellen des Immunsystems chemotaktisch und bedingt dadurch deren Infiltration in den Entzündungsherd, beeinflusst diese Zellen sowohl in ihrer Proliferation als auch in ihrer funktionellen Reifung und fördert sie zudem in der Ausführung der unterschiedlichen Funktionen (vor allem Phagozytose, Zytokinsekretion und Zytotoxizität). Durch die zusätzliche antiapoptotische Wirkung auf viele dieser Zellen ermöglicht IL-15 außerdem deren Persistenz im entzündlichen Gewebe und trägt somit über viele Wege zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündung bei. Viele dieser Reaktionen werden über die IL-15-Signalkaskade – bestehend aus dem IL-15R und einem nachgeschalteten JAK-STAT-Signaltransduktionsweg – vermittelt, wobei die α-Kette des IL-15R die hohe Affinität des IL-15 zu seinem Rezeptor bedingt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene IL-15, IL-15R α und STAT-1 als Teil der IL-15-Signalkaskade hinsichtlich ihres Einflusses auf die Entstehung und Unterhaltung atopischer Erkrankungen untersucht. Hierzu wurden zunächst Mutationen in den Genen identifiziert; in einer anschließenden Assoziationsstudie wurden die Zusammenhänge der Polymorphismen mit dem Vorliegen von atopischen Erkrankungen wie Asthma, atopischer Dermatitis und allergischer Rhinokonjunktivitis sowie auf die Präsenz entsprechender Atopie-assozierter Symptome wie ein pfeifendes oder keuchendes Atemgeräusch, eine allergische Sensibilisierung oder erhöhte IgE-Antikörper im Blut aufgezeigt.

Hierbei stellten wir fest, dass die IL-15-Signalkaskade entscheidend an der Entstehung und Unterhaltung atopischer Erkrankungen beteiligt ist, wobei dieser Effekt in unserer Assoziationsstudie eher auf IL-15R α und auf STAT-1 als auf IL-15 selbst zurückzuführen war.

Unter Berücksichtigung zusätzlicher *in silico* Analysen konnte gezeigt werden, dass der SNP C39134A des STAT-1-Gens aufgrund seiner Lage in einem regulatorischen Element besondere Beachtung verdient und in funktionellen Studien weitergehend evaluiert werden sollte.

Die größte Beachtung dieser Studie verdient der SNP A17088C des IL-15R α -Gens. Aufgrund unserer Assoziationsanalyse vermuteten wir eine hohe funktionelle Relevanz dieses SNPs und strebten daher eine detailliertere funktionell orientierte Analyse dieses SNPs an. Die von der Arbeitsgruppe Immunbiologie des Forschungszentrums Borstel durchgeführte funktionelle Studie zeigte, dass der homozygote Mutationstyp des SNPs A17088C zu einer signifikant erhöhten IL-15R α -Expression sowohl auf Monozyten als auch auf Lymphozyten führt. Diese Veränderung in der Rezeptorexpression und die verbesserte

FEV1/FVC-Ratio könnten das funktionelle Korrelat zu dem in unserer Assoziationsstudie gezeigten protektiven Effekt des A17088C-Mutationstyps darstellen. Da hiermit unsere Vermutungen, dass dieser SNP unmittelbar protektiv auf die Entstehung eines allergischen Asthmas wirkt, bestätigt werden konnten, ist durchaus denkbar, dass dieser SNP eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Entstehung eines allergischen Asthmas einnimmt. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass die von uns durchgeführte Assoziationsanalyse der Gene IL-15, IL-15Ra und STAT-1 Ideen für weitere funktionelle Studien der dazugehörigen Proteine liefert.

6. Quellenverzeichnis

1. Marks GB. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33:285-9.
2. Ninan TK, Russell G. The changing picture of childhood asthma. *Paediatr Respir Rev* 2000; 1:71-8.
3. ISAAC Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998; 351:1225-32.
4. von Mutius E, Martinez FD, Fritzsch C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:358-64.
5. Nicolai T, Pereszlenyiova-Bliznakova L, Illi S, Reinhardt D, von Mutius E. Longitudinal follow-up of the changing gender ratio in asthma from childhood to adulthood: role of delayed manifestation in girls. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14:280-3.
6. Almqvist C, Worm M, Leynaert B. Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review. *Allergy* 2008; 63:47-57.
7. Oberbauer B, Nicolai T, von Mutius E. [Bronchial asthma in childhood. Part 1: Clinical manifestations, diagnosis and ground rules of therapy]. *Fortschr Med* 1993; 111:457-60.
8. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87:893-910.
9. Global Initiative For Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. *GINA Workshop Protocol* 2002.
10. von Mutius E. Epidemiologie des Asthma bronchiale. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2001; 149:86-93.
11. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299:1259-60.
12. von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:187-93.
13. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000; 55 Suppl 1:S2-10.
14. Bierbaum S, Heinzmann A. The genetics of bronchial asthma in children. *Respir Med* 2007; 101:1369-75.
15. Kabesch M, Lauener RP. Why Old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis. *J Leukoc Biol* 2004; 75:383-7.

16. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332:133-8.
17. Stein RT, Holberg CJ, Morgan WJ, Wright AL, Lombardi E, Taussig L, et al. Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52:946-52.
18. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, Day-Care Attendance, and the Risk of Asthma and Wheezing During Childhood. *N Engl J Med*. 2000; 343:538-43.
19. Siroux V, Curt F, Oryszczyn MP, Maccario J, Kauffmann F. Role of gender and hormone-related events on IgE, atopy, and eosinophils in the Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:491-8.
20. Novak N, Bieber T. Pathophysiologie der atopischen Dermatitis. *Deutsches Ärzteblatt* 2004; 101:108-20.
21. Hinz T, Staudacher A, Bieber T. Neues in der Pathophysiologie der atopischen Dermatitis. *Hautarzt*, Der 2006; 57:567–75.
22. Kissling S, Wüthrich B. Verlauf der atopischen Dermatitis nach dem Kleinkindalter. *Der Hautarzt* 1993; 44:569–73.
23. Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, Duhme H, Fritzsch C, Werner B, et al. Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J* 1999; 14:862-70.
24. Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Puliti M, Bulfone-Paus S, et al. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect Immun* 1998; 66:2640-7.
25. Renaud JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54:577-89.
26. Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17:259-80.
27. Ruckert R, Brandt K, Bulanova E, Mirghomizadeh F, Paus R, Bulfone-Paus S. Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses. *Eur J Immunol* 2003; 33:3493-503.
28. Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, et al. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood* 1999; 93:3531-9.

29. Korsgren M, Persson CG, Sundler F, Bjerke T, Hansson T, Chambers BJ, et al. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med* 1999; 189:553-62.
30. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:657-79.
31. Lodolce JP, Burkett PR, Koka RM, Boone DL, Ma A. Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:429-39.
32. Niedbala W, Wei X, Liew FY. IL-15 induces type 1 and type 2 CD4+ and CD8+ T cells proliferation but is unable to drive cytokine production in the absence of TCR activation or IL-12 / IL-4 stimulation in vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32:341-7.
33. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-73.
34. Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, et al. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1407-13.
35. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992; 326:298-304.
36. de Vries JE, Punnonen J, Cocks BG, Aversa G. The role of T/B cell interactions and cytokines in the regulation of human IgE synthesis. *Semin Immunol* 1993; 5:431-9.
37. Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* 2000; 21:60-4.
38. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:624-31.
39. Pawankar R, Yamagishi S, Takizawa R, Yagi T. Mast cell-IgE-and mast cell-structural cell interactions in allergic airway disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2:303-12.
40. Filipovic M. The Role of Eosinophils in Asthma. *Medicine and Biology* 2001; 8:6-10.
41. Pare PD, Bai TR, Roberts CR. The structural and functional consequences of chronic allergic inflammation of the airways. *Ciba Found Symp* 1997; 206:71-86; discussion - 9, 106-10.
42. Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, et al. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1:85-93.

43. Meyer EH, Goya S, Akbari O, Berry GJ, Savage PB, Kronenberg M, et al. Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2782-7.
44. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191:771-80.
45. Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Konowal A, O'Brien RL, Gelfand EW, et al. gammadelta T cells as regulators of airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125:203-10.
46. Pawankar R. gammadelta T cells in allergic airway diseases. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:318-23.
47. Biedermann T, Röcken M. Immunologische Grundlagen des atopischen Ekzems. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2001; 149:534-41.
48. Bieber T, de la Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, et al. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 1992; 175:1285-90.
49. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1996; 106:446-53.
50. Kokkonen J, Holm K, Karttunen TJ, Maki M. Children with untreated food allergy express a relative increment in the density of duodenal gammadelta+ T cells. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:1137-42.
51. Strengell M, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates IL-21 and IL-21R expression in human NK and T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76:416-22.
52. Garcia VE, Jullien D, Song M, Uyemura K, Shuai K, Morita CT, et al. IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpeptide] microbial antigens. *J Immunol* 1998; 160:4322-9.
53. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996; 4:329-36.
54. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 1994; 264:965-8.

55. Bamford RN, Battiata AP, Burton JD, Sharma H, Waldmann TA. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2897-902.
56. Ge N, Nishioka Y, Nakamura Y, Okano Y, Yoneda K, Ogawa H, et al. Synthesis and secretion of interleukin-15 by freshly isolated human bronchial epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135:235-42.
57. Ruckert R, Brandt K, Braun A, Hoymann HG, Herz U, Budagian V, et al. Blocking IL-15 prevents the induction of allergen-specific T cells and allergic inflammation in vivo. *J Immunol* 2005; 174:5507-15.
58. McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996; 2:175-82.
59. Bulfone-Paus S, Ungureanu D, Pohl T, Lindner G, Paus R, Ruckert R, et al. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nat Med* 1997; 3:1124-8.
60. Ruckert R, Asadullah K, Seifert M, Budagian VM, Arnold R, Trombotto C, et al. Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol* 2000; 165:2240-50.
61. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277:1630-5.
62. Stephanou A, Latchman DS. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 2005; 23:177-82.
63. Sampath D, Castro M, Look DC, Holtzman MJ. Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *J Clin Invest* 1999; 103:1353-61.
64. Baran-Marszak F, Feuillard J, Najjar I, Le Clorennec C, Bechet JM, Dusanter-Fourt I, et al. Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells. *Blood* 2004; 104:2475-83.
65. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002; 109 Suppl:S121-31.
66. Harris JR, Magnus P, Samuelsen SO, Tambs K. No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:43-9.
67. Burke W, Fesinmeyer M, Reed K, Hampson L, Carlsten C. Family history as a predictor of asthma risk. *Am J Prev Med* 2003; 24:160-9.

68. Becker T. Genidentifizierung bei multifaktoriellen Krankheiten. Medizinische Genetik 2007; 19:300-3.
69. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. Nature 1999; 402:B5-11.
70. Kurz T, Strauch K, Dietrich H, Braun S, Hierl S, Jerkic SP, et al. Multilocus haplotype analyses reveal association between 5 novel IL-15 polymorphisms and asthma. J Allergy Clin Immunol 2004; 113:896-901.
71. Innate Immunity PGA. NHLBI Program in Genomic Applications. Channing Laboratory, 2001.
72. Weiland SK, Bjorksten B, Brunekreef B, Cookson WO, von Mutius E, Strachan DP. Phase II of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II): rationale and methods. Eur Respir J 2004; 24:406-12.
73. Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. Eur Respir J 1995; 8:483-91.
74. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16:1215.
75. Qiagen. FlexiGene® DNA Handbook. Qiagen Handbooks 2003.
76. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucleic Acids Res 1990; 18:6409-12.
77. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85:9436-40.
78. Eppendorf. BioPhotometer Bedienungsanleitung. Eppendorf Bedienungsanleitungen 2005.
79. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74:5463-7.
80. Applied Biosystems. Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers User Guide. Applied Biosystems Manuals 2002.
81. Detwiler MM, Hamp TJ, Kazim AL. DNA sequencing using the liquid polymer POP-7 on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Biotechniques 2004; 36:932-3.
82. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 2005; 21:263-5.
83. Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmoller E, Kerner T, Endl E, et al. Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. Am J Pathol 1999; 154:83-95.

84. Panelli S, Damiani G, Espen L, Micheli G, Sgaramella V. Towards the analysis of the genomes of single cells: further characterisation of the multiple displacement amplification. *Gene* 2006; 372:1-7.
85. Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:5261-6.
86. Amersham Biosciences. Instructions GenomiPhi DNA Amplification Kit. Amersham Biosciences Protokolle 2003.
87. Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, van den Boom D, et al. iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. Sequenom Application Notes 2005.
88. Illig T, Vollmert C, Gohlke H, Klopp N. Hochdurchsatz SNP Genotypisierung mit MALDI TOF MS. *Biospektrum* 2004; 10:670-2.
89. Schild TA. Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie Version 2.1. Applied Biosystems Handbooks 1996.
90. Leal SM. Detection of genotyping errors and pseudo-SNPs via deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. *Genet Epidemiol* 2005; 29:204-14.
91. Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997; 53:1253-61.
92. Couronne O, Poliakov A, Bray N, Ishkhanov T, Ryaboy D, Rubin E, et al. Strategies and tools for whole-genome alignments. *Genome Res* 2003; 13:73-80.
93. Mayor C, Brudno M, Schwartz JR, Poliakov A, Rubin EM, Frazer KA, et al. VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics* 2000; 16:1046-7.
94. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:4878-84.
95. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21:2933-42.
96. Ouali M, King RD. Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci* 2000; 9:1162-76.
97. Heath SC, Gut IG, Brennan P, McKay JD, Bencko V, Fabianova E, et al. Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies. *Eur J Hum Genet* 2008; 16:1413-29.

98. Hederos CA, Hasselgren M, Hedlin G, Bornehag CG. Comparison of clinically diagnosed asthma with parental assessment of children's asthma in a questionnaire. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18:135-41.
99. Bierbaum S, Nickel R, Zitnik S, Ahlert I, Lau S, Deichmann KA, et al. Confirmation of association of IL-15 with pediatric asthma and comparison of different controls. *Allergy* 2006; 61:576-80.
100. Pinto LA, Depner M, Steudemann L, Klopp N, Illig T, von Mutius E, et al. IL-15 gene variants are not associated with asthma and atopy. *Allergy* 2008;in press.
101. Christensen U, Haagerup A, Binderup HG, Vestbo J, Kruse TA, Borglum AD. Family based association analysis of the IL2 and IL15 genes in allergic disorders. *Eur J Hum Genet* 2006; 14:227-35.
102. Schedel M, Carr D, Klopp N, Woitsch B, Illig T, Stachel D, et al. A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1100-5.
103. Park BL, Cheong HS, Kim LH, Choi YH, Namgoong S, Park HS, et al. Association analysis of signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) polymorphisms with asthma. *J Hum Genet* 2005; 50:133-8.
104. Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, et al. Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:498-506.
105. Howard TD, Postma DS, Hawkins GA, Koppelman GH, Zheng SL, Wysong AK, et al. Fine mapping of an IgE-controlling gene on chromosome 2q: Analysis of CTLA4 and CD28. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:743-51.
106. Quarcoo D, Weixler S, Groneberg D, Joachim R, Ahrens B, Wagner AH, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 1 attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:288-95.
107. Strengell M, Matikainen S, Siren J, Lehtonen A, Foster D, Julkunen I, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol* 2003; 170:5464-9.
108. Ruchatz H, Leung BP, Wei XQ, McInnes IB, Liew FY. Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol* 1998; 160:5654-60.
109. Chae DW, Nosaka Y, Strom TB, Maslinski W. Distribution of IL-15 receptor alpha-chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *J Immunol* 1996; 157:2813-9.

110. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrländer C, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:482-8.
111. Ahmad R, El Bassam S, Cordeiro P, Menezes J. Requirement of TLR2-mediated signalling for the induction of IL-15 gene expression in human monocytic cells by HSV-1. *Blood* 2008.

7. Anhang

7.1. Genkarten

Die Genkarten zu den Genen IL-15, IL-15Ra und STAT-1 sind unter <http://www.asthmagene.de/supplement> einsehbar.

7.2. Kodierung der Aminosäuren

Tab. 5.1 Einbuchstabenkodierung der Aminosäuren

Aminosäure	Kodierung
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	E
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
	bei Angabe der Sekundärstruktur: <i>Coil</i>
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD	<i>charge-couple device</i>
CD4 ⁺ Zelle	Zelle mit dem Oberflächenantigen <i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8 ⁺ Zelle	Zelle mit dem Oberflächenantigen <i>Cluster of differentiation 8</i>
CD28	Oberflächenantigen <i>Cluster of differentiation 28</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CNS	konservierte nicht-kodierende Sequenz
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
d	Dicke
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DDR	Deutsche Demokratische Republik
DEL	Deletion
<i>D. farinae</i>	<i>Dermatophagoides farinae</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>D. pteronyssinus</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	β-Faltblatt
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
E_λ	Wellenlänge λ
et al.	<i>et alii</i>

ϵ	Extinktionskoeffizient
FEV1	Einsekundenkapazität
Forts.	Fortsetzung
FVC	forcierte Vitalkapazität
fwd	<i>forward</i>
G	Guanin
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
H	α -Helix
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC-H ₂ O	<i>high performance liquid chromatography</i> -Wasser
HSV-1	Herpes simplex Virus 1
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IDEC	inflammatorische dendritische epidermale Zellen
IFN- $\alpha\beta$	Interferon $\alpha\beta$
IFN- γ	Interferon γ
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IL-x	Interleukin x
IL-15R	Interleukin-15-Rezeptor
IL-15Ra	α -Kette des Interleukin-15-Rezeptors
IL-2R β	β -Kette des Interleukin-15-Rezeptors
γ c	γ -Kette des Interleukin-15-Rezeptors
IU	Internationale Einheit
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IRF-1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
ISAAC II	Phase II der <i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
JAK-1	Januskinase vom Typ 1
JAK-2	Januskinase vom Typ 2
JAK-3	Januskinase vom Typ 3
kb	Kilobase
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat

LD	<i>linkage disequilibrium</i>
LPS	Lipopolsaccharide
M	Molar
mA	Milliampère
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight</i>
Mb	Megabase
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1
MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
n	Anzahl
N ₁₅ -Primer	Primer aus 15 Basenpaaren
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK	Negativkontrolle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO ₂	Stickstoffdioxid
OR	<i>Odd's Ratio</i>
10p	kurzer Arm des Chromosoms 10
P	Phosphat
PAF	plättchenaktivierender Faktor

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEP-PCR	<i>Primer Extension Preamplification PCR</i>
<i>Phi29</i> -Polymerase	Polymerase des Bakteriophagen <i>Phi29</i>
POP-7	<i>Performance Optimized Polymer 7</i>
Prä-mRNA	Präkursor messenger Ribonukleinsäure
2q	langer Arm des Chromosoms 2
4q	langer Arm des Chromosoms 4
Q	<i>Quencher</i>
R	<i>Reporter</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rev	<i>reverse</i>
SA	Standardabweichung
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SBE	<i>single base extension</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
sIL-15Ra	<i>soluble IL-15Ra</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SO ₂	Schwefeldioxid
SOCS x	<i>suppressor of cytokine signaling x</i>
sog.	sogenannte (-r/-s)
STAT-x	<i>signal transducer and activator of transcription x</i>
STAT-1α	Isoform α des STAT-1
STAT-1β	Isoform β des STAT-1
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Tc ₁ -Zelle	zytotoxische T-Zelle vom Typ 1
Tc ₂ -Zelle	zytotoxische T-Zelle vom Typ 2
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
Th ₁ -Zelle	T-Helferzelle vom Typ 1
Th ₂ -Zelle	T-Helferzelle vom Typ 2
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNF-β	Tumor-Nekrose-Faktor β

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
3'UTR	<i>untranslated region</i> am 3'Ende
5'UTR	<i>untranslated region</i> am 5'Ende
UV-Strahlung	Ultraviolett-Strahlung
UVB	Ultraviolett B-Strahlung
V	Volt
Vol%	Volumenprozent

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Kategorien der Studienpopulation
Tab. 2.2	PCR-Bedingungen der Fragmente
Tab. 2.3	Standard-PCR-Ansatz
Tab. 2.4	Temperatur-Zeit-Programm einer Standard-PCR
Tab. 2.5	Temperatur-Zeit-Programm einer <i>touchdown</i> -PCR
Tab. 2.6	Ansatz einer Sequenzierraktion
Tab. 2.7	Temperatur-Zeit-Programm einer Sequenzierraktion
Tab. 2.8	Ansatz einer PEP-PCR
Tab. 2.9	Temperatur-Zeit-Programm einer PEP-PCR
Tab. 2.10	Ansatz einer PCR zur iPLEX™-Reaktion
Tab. 2.11	Temperatur-Zeit-Programm einer iPLEX™-PCR
Tab. 2.12	PCR-Primer für die iPLEX™-PCR der Gene IL-15, IL-15R α und STAT-1
Tab. 2.13	SAP-Mix
Tab. 2.14	Massenunterschiede der iPLEX™-Produkte
Tab. 2.15	Ansatz einer Primer-Extensions-Reaktion
Tab. 2.16	Temperatur-Zeit-Programm einer Primer-Extensions-Reaktion
Tab. 2.17	Extensionsprimer für die Primer-Extensions-Reaktion der Gene IL-15, IL-15R α und STAT-1
Tab. 2.18	PCR-Primer für die TaqMan® PCR der Gene IL-15 und IL-15R α
Tab. 2.19	Sonden für die TaqMan® PCR der Gene IL-15 und IL-15R α
Tab. 2.20	statistische Rechenmodelle
Tab. 3.1	<i>Call Rate</i> und p-Werte der Abweichungen vom HWE
Tab. 3.2	Haplotypen und ihre Frequenz in der Dresden-Population
Tab. 3.3	Zusammenhang zwischen den SNPs und den atopischen Phänotypen und Merkmalen (allelisches Modell)
Tab. 3.4	Zusammenhang zwischen den SNPs und dem Gesamt-IgE (in IU / ml)
Tab. 3.5	Zusammenhang zwischen den Haplotypen und den atopischen Phänotypen und Merkmalen (allelisches Modell)
Tab. 3.6	SNPs des IL-15R α -Gens mit einer MAF > 10 % im Mutationsscreening und genotypisierte SNPs
Tab. 3.7	<i>Call Rate</i> und p-Werte der Abweichungen vom HWE
Tab. 3.8	Zusammenhang zwischen den SNPs und den atopischen Phänotypen und Merkmalen (allelisches Modell)
Tab. 3.9	Zusammenhang zwischen den SNPs und dem Gesamt-IgE (in IU / ml)

- Tab. 3.10 Effekt des SNPs A17088C auf die Entstehung eines Asthmas (rezessives Modell)
- Tab. 3.11 Haplotypen und ihre Frequenz für das Merkmal „Asthma“ in der Dresden-Population (allelisches Modell)
- Tab. 3.12 SNPs des STAT-1-Gens mit einer MAF > 10 % im Mutationsscreening und genotypisierte SNPs
- Tab. 3.13 *Call Rate* und p-Werte der Abweichungen vom HWE
- Tab. 3.14 Zusammenhang zwischen den SNPs und den atopischen Phänotypen und Merkmalen (allelisches Modell)
- Tab. 3.15 Zusammenhang zwischen den SNPs und dem Gesamt-IgE (in IU / ml)
- Tab. 3.16 Zusammenhang zwischen dem SNP C39134A mit Gesamt-IgE, spezifischem IgE und Atopie (allelisches Modell)
- Tab. 3.17 Haplotypen, ihre Frequenz in der Dresden-Population und p-Werte für die Merkmale „Asthma“ und „Atopie“ (allelisches Modell)
- Tab. 3.18 Strukturanalyse der im Promotorbereich und in den Introns lokalisierten SNPs (selektionierte SNPs)

10. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Interaktion von IL-15, IL-15R und den STATs
- Abb. 1.2a In die Membran von Mastzellen integriertes IL-15 bindet an IL-2R β und IL-2R γ (= γ c)
- Abb. 1.2b In die Membran von Mastzellen integriertes IL-15 bindet an IL-15R α , IL-2R β und IL-2R γ (= γ c)
- Abb. 1.3a Freies IL-15 bindet an zwei IL-15R α
- Abb. 1.3b Freies IL-15 bindet an IL-15R α , IL-2R β und IL-2R γ (= γ c)
- Abb. 1.4a Die längere Isoform des IL-15-Gens
- Abb. 1.4b Die längere Isoform des IL-15-Gens – Spleißalternative
- Abb. 1.4c Die kürzere Isoform des IL-15-Gens
- Abb. 1.5a Die Isoform 1 des IL-15R α -Gens
- Abb. 1.5b Die Isoform 2 des IL-15R α -Gens
- Abb. 1.6a Die längere Isoform des STAT-1-Gens (STAT-1 α)
- Abb. 1.6b Die kürzere Isoform des STAT-1-Gens (STAT-1 β)
- Abb. 2.1 a-c SNP in Form eines Basenaustausches
- Wildtyp
 - heterozygoter Mutationstyp
 - homozygoter Mutationstyp
- Abb. 2.2 a-c SNP in Form einer Deletion
- Wildtyp
 - heterozygoter Mutationstyp
 - homozygoter Mutationstyp
- Abb. 2.3 iPLEX™ Assay
- Abb. 2.4 Anordnungsmuster auf den 96er Platten
- Abb. 2.5 Verteilungsmuster der vier 96er Platten auf der 384er Platte
- Abb. 2.6 a-d TaqMan® PCR
- Anlagerung des Primers und der Sonde mit dem *Reporter* (R) und dem *Quencher* (Q)
 - Elongation des PCR-Produkts und beginnende Hydrolyse der Sonde
 - vollständige Hydrolyse der Sonde
 - Fluoreszenz des *Reporters*
- Abb. 3.1 SNPs des IL-15-Gens
- Abb. 3.2 SNPs des IL-15R α -Gens
- Abb. 3.3 SNPs des STAT-1-Gens

- Abb. 3.4 Phylogenetischer Vergleich des IL-15-Gens (*Homo sapiens* – *Mus musculus* und *Homo sapiens* – *Canis familiaris*)
- Abb. 3.5 Phylogenetischer Vergleich des IL-15R α -Gens (*Homo sapiens* – *Mus musculus* und *Homo sapiens* – *Canis familiaris*)
- Abb. 3.6 Phylogenetischer Vergleich des STAT-1-Gens (*Homo sapiens* – *Mus musculus* und *Homo sapiens* – *Canis familiaris*)
- Abb. 3.7a Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der Isoform 1 des Proteins IL-15R α
- Abb. 3.7b Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der Isoform 2 des Proteins IL-15R α
- Abb. 3.8a Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der längeren Isoform des Proteins STAT-1
- Abb. 3.8b Aminosäuresequenz und daraus berechnete Sekundärstruktur der kürzeren Isoform des Proteins STAT-1

11. Danksagung

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. Michael Kabesch für die Bereitstellung des Themas und die exzellente Betreuung sowohl während der praktischen Durchführung als auch während der schriftlichen Verfassung dieser Arbeit.

Mein großer Dank gilt weiterhin der AG Allergogenetik im Kubus-Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals in München für die wunderbare Arbeitsatmosphäre sowie für die Motivation und die Anregungen zum wissenschaftlichen Arbeiten. Hierbei danke ich besonders Herrn Leonardo A. Pinto für seine großartige Hilfe bei allen einzelnen Schritten, die die Fertigstellung dieser Arbeit erforderte. Mein außerordentlich großer Dank gilt Frau Dr. Michaela Schedel und Frau Kathrin Suttner für ihr allzeit offenes Ohr und die ständige Bereitschaft, helfend zur Seite zu stehen. Für die umfangreiche Unterstützung vor allem bei computertechnischen Problemen danke ich Herrn Dr. Michael Kormann. Frau Anja Pleiß und Frau Sonja Zeilinger danke ich besonders für die Durchführung der Sequenzierung und der Genotypisierung sowie für die großartige Unterstützung bei der schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit. Frau Ilona Dahmen danke ich für die Hilfestellungen bei der technischen Durchführung dieser Arbeit. Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Martin Depner. Desweiteren gilt mein großer Dank Dr. Philipp Pagel für die Möglichkeit der Strukturanalyse exonischer SNPs.

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit dem SFB TR 22 durchgeführt und durch das SFB TR 22 und Mittel des NGFN II finanziert. Ich danke den Kooperationspartnern für Ihre Unterstützung; dieses sind insbesondere das Institut für Epidemiologie am Helmholtz Zentrum München (Genotypisierung mit Hilfe des *iPLEX™ Assays*) und das Institut für Klinische Molekularbiologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel (Genotypisierung mit Hilfe des *TaqMan® Pre-Developed Assays*).

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für die vielseitige Hilfe bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit. Besonders danke ich meiner Mutter Christiane Steudemann für das fleißige Korrekturlesen und die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen. Für die schönen Abende und die kulinarische Versorgung nach den Arbeitstagen im Labor sowie für ihre Freundschaft und ihre Liebe danke ich Markus Wäckerle, Carola Steudemann und Mirjam Thaler.

12. Lebenslauf

Name: Lena Steudemann

Geburtsdatum: 02. April 1982

Geburtsort: München

Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulbildung:

1988 - 1992: Grundschule an der Lerchenauer Str. 386, München

1992 - 2001: Wittelsbacher - Gymnasium München

Studium:

2001-2008: Medizinstudium an der LMU München

Mai 2008: Approbation als Ärztin

Famulaturen:

Februar - März 2004: Neugeborenen-Intensivstation, Dr. von Haunersches Kinderspital, München

September - Oktober 2004: Station Intern 4, Dr. von Haunersches Kinderspital, München

September 2005: Famulatur in der Gynäkologischen Praxis Dr. Deininger, München

April - Mai 2006: Famulatur in der Gynäkologischen Abteilung des Victoria Hospitals, Victoria, Seychellen

Praktisches Jahr:

Februar - Juni 2007: Innere Medizin, Klinikum Starnberg

Juni - August 2007: Chirurgie, Nepean Hospital, University of Sydney, Penrith, Australien

August - Oktober 2007: Allgemein- und Kinder-Chirurgie, Klinikum Dritter Orden, München

Oktober 2007 - Januar 2008: Pädiatrie, Klinikum Starnberg

Berufserfahrung:

seit März 2009: Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Deggendorf

13. Publikationen

Pinto LA, Steudemann L, Depner M, Klopp N, Illig T, Weiland SK, von Mutius E, Kabesch M (2007). STAT1 gene variations, IgE regulation and atopy. Allergy 62(12):1456-61.

Pinto LA, Depner M, Steudemann L, Klopp N, Illig T, von Mutius E, Kabesch M (2009). IL-15 gene variants are not associated with asthma and atopy. Allergy 64(4):643-6.

Pinto LA, Steudemann L, Depner M, Klopp N, Illig T, Vogelberg C, von Mutius E, Bulfone-Paus S, Kabesch M (2008). IL-15 R alpha coding polymorphism N182T influences protein expression, asthma and lung function. In press.