

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital**

**Klinik der Universität München**

**Vorstand: Prof. Dr. Markus M. Lerch**

**Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein**

**Titel:**

**Datengetriebene Identifikation von immunologischen und ernährungs-  
bezogenen Expositionsmustern für atopische Erkrankungen im Kindesalter  
mittels latenter Klassenanalysen.**

**Data-driven identification of immunological and nutritional exposure  
patterns for childhood onset atopic diseases by latent class analyses.**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von**

**Alexander Josef Hose, MA, MPH**

**aus**

**München**

**2023**

---

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Ege

\_\_\_\_\_

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Maximilian Bielohuby

Prof. Dr. Katja Radon

Mitbetreuung durch  
den promovierten Mitarbeiter: \_\_\_\_\_

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2023

# Affidavit



## Eidesstattliche Versicherung

**Hose, Alexander Josef**

---

Name, Vornamen

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Datengetriebene Identifikation von immunologischen und ernährungsbezogenen Expositionsmustern für atopische Erkrankungen im Kindesalter mittels latenter Klassenanalysen.“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, den 29.03.2023**

**Alexander Hose**

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

# Inhaltsverzeichnis

## Inhalt

Affidavit .....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis .....	7
Publikationsliste (Auswahl) .....	8
1 Die latente Klassenanalyse als alternativer Ansatz zur hypothesengetriebenen Subgruppenanalyse .....	10
2 Datengetriebene Identifikation des immunologischen Expositionsmusters „Atopie im Vorschulalter“ .....	14
2.1 Klinisch relevante Phänotypen als Ausdruck latenter Phänomene bei komplexen Krankheitsbildern.....	14
2.2 Atopie und ihre Relevanz für pädiatrisches Asthma unter phänotypischer Perspektive .....	15
2.3 Gemeinsamer inhaltlicher Hintergrund der Studien zu den Phänotypen von Atopie (PASTURE/MAS- und DIABIMMUNE-Publikation).....	17
2.3.1 Ansätze der Kategorisierung von Mustern atopischer Sensibilisierung	17
2.4 Ziele der PASTURE/MAS-Studie .....	18
2.5 Ziele der DIABIMMUNE-Studie .....	18
2.6 Methoden .....	18
2.6.1 Beschreibung der Studienpopulationen .....	18
2.6.2 Analysen.....	19
2.7 Zusammenfassung der generalisierbaren Ergebnisse aus der PASTURE/MAS- und DIABIMMUNE-Studie.....	20
2.7.1 Quantitativ und qualitativ vergleichbare Einteilung der latenten Klassen .....	20
2.7.2 „Severe atopy“ als echtes latentes Phänomen mit originär assoziierten Eigenschaften .....	20

2.8	Spezifische Erkenntnisse aus der PASTURE/MAS-Publikation.....	21
2.8.1	LCA-basierte, disjunkte versus klassische, überlappende Klasseneinteilung und ihre Assoziationen mit allergischen Erkrankungen.....	21
2.8.2	Obstruktive Lungenfunktionseinschränkung als Charakteristikum des atopischen Sensibilisierungsphänomens „severe atopy“ .....	22
2.8.3	“Severe atopy” als Klasse mit Anzeichen einer dysbalancierten Immunantwort.....	22
2.8.4	Zusammenführung der Charakteristika von „severe atopy“ mittels des statistischen Verfahrens der Pfadanalyse.....	23
2.8.5	Überführung der latenten Klassen in Phänotypen.....	24
2.9	Spezifische Erkenntnisse aus der DIABIMMUNE-Publikation.....	24
2.9.1	Bezug der Atopie-Phänotypen aus beiden Populationen zu verschiedenen Umweltbedingungen, Genetik, sowie Diabetes .....	25
2.10	Zusammenfassendes Zwischenfazit.....	26
3	Datengetriebene Identifikation des ernährungsbezogenen Expositionsmusters “Stile der Nahrungsmiteleinführung im ersten Lebensjahr“ .....	28
3.1.1	Methoden.....	29
3.1.2	Ergebnisse .....	29
3.1.3	Inhaltliche Zusammenfassung und Diskussion.....	32
3.1.4	Bewertung des LCA-basierten Analyseansatzes der frühkindlichen Ernährung.....	33
4	Zusammenfassung.....	34
5	Abstract (Englisch) .....	36

6	Publikation 1 mit Eigenanteil am Manuskript: .....	38
	„Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts”	38
7	Publikation 2 mit Eigenanteil am Manuskript: .....	39
	„Development of atopic sensitization in Finnish and Estonian children: A latent class analysis in a multicenter cohort” .....	39
8	Publikation 3 mit Eigenanteil am Manuskript: .....	40
	„Excessive Unbalanced Meat Consumption in the First Year of Life Increases Asthma Risk in the PASTURE and LUKAS2 Birth Cohorts” .....	40
9	Literaturverzeichnis .....	41
	Danksagung .....	44

# Abkürzungsverzeichnis

LCA	Latent Class Analysis
LC(s)	Latent Class(es)
SEM	Structural Equation Modeling
z. B.	zum Beispiel
bzw.	beziehungsweise
(C)AIC	(Consistent) Akaike Information Criterion
(a)BIC	(adjusted) Bayesian Information Criterion
(s)IgE	(specific) Immunoglobulin E
CAP	Carrier Polymer System
PASTURE	Protection against allergy: Study in Rural Environments
MAS	Multizentrische Allergiestudie
kU/L	kilo Unit pro Liter
FIG	Figure
p	p-Wert
(a)OR	(adjusted) Odds Ratio
KI	Konfidenzintervall
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 second
IL-5	Interleukin-5
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
T <sub>H</sub> 2	TH2-(Helfer)-Zellen
T <sub>H</sub> 1	TH1-(Helfer)-Zellen
T1D	Type 1 diabetes mellitus
n / N	number
UMC	Unbalanced meat consumption
a $\beta$	adjusted Beta

## **Publikationsliste (Auswahl)**

**Hose, A. J.**, Pagani, G., Karvonen, A. M., Kirjavainen, P. V., Roduit, C., Genuneit, J., Schmaußer-Hechfellner, E., Depner, M., Frei, R., Lauener, R., Riedler, J., Schaub, B., Fuchs, O., von Mutius, E., Divaret-Chauveau, A., Pekkanen, J., and Ege, M. J. on behalf of PASTURE Study Group. (2021). *Excessive Unbalanced Meat Consumption in the First Year of Life Increases Asthma Risk in the PASTURE and LUKAS2 Birth Cohorts.* **Frontiers in Immunology** 2021 April; 12:651709.

Brick, T., **Hose, A.**, Wawretzka, K., von Mutius, E., Roduit, C., Lauener, R., Riedler, J., Karvonen, A., Pekkanen, J., Divaret-Chauveau, A., Dalphin, J.-C., Ege, M. J.; PASTURE study group. (2019). *Parents know it best: Prediction of asthma and lung function by parental perception of early wheezing episodes.* **Pediatric Allergy and Immunology** 2019 Dec; 30(8):795-802.

Schmidt, F., **Hose, A. J.**, Müller-Rompa, S., Brick, T., Hämäläinen, A. M., Peet, A., Tillmann, V., Niemelä, O., Siljander, H., Knip, M., Weber, J., von Mutius, E., Ege, M. J.; DIABIMMUNE Study Group. (2019). *Development of atopic sensitization in Finnish and Estonian children: A latent class analysis in a multicenter cohort.* **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 2019 May; 143(5):1904-1913.

Müller-Rompa, S., Markevych, I., **Hose, A. J.**, Loss, G., Wouters, I., Genuneit, J., Braun-Fahrländer, C., Horak, E., Boznanski, A., Heederik, D., von Mutius, E., Heinrich, J., Ege, M. J.; GABRIELA Study Group. (2018). *An approach to the asthma-protective farm effect by geocoding: Good farms and better farms.* **Pediatric Allergy and Immunology** 2018 May; 29(3):275-282.

**Hose, A. J.**, Depner, M., Illi, S., Lau, S., Keil, T., Wahn, U., Fuchs, O., Pfefferle, P. I., Schmaußer-Hechfellner, E., Genuneit, J., Lauener, R., Karvonen, A. M., Roduit, C., Dalphin, J.-C., Riedler, J., Pekkanen, J., von Mutius, E., Ege, M. J., MAS; PASTURE study groups. (2017). *Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts.* **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 2017 Jun; 139(6):1935-1945.



Loss, G., Depner, M., **Hose, A. J.**, Genuneit, J., Karvonen, A. M., Hyvärinen, A., Roduit, C., Kabesch, M., Lauener, R., Pfefferle, P. I., Pekkanen, J., Dalphin, J.-C., Riedler, J., Braun-Fahrländer, C., von Mutius, E., Ege, M. J. (2015). *The Early Development of Wheeze: Environmental Determinants and Genetic Susceptibility at 17q21*. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 2016 Apr 15; 193(8):889-897.

Loss, G., Depner, M., Ulfman, L. H., van Neerven, R. J., **Hose, A. J.**, Genuneit, J., Karvonen, A. M., Hyvärinen, A., Kaulek, V., Roduit, C., Weber, J., Lauener, R., Pfefferle, P. I., Pekkanen, J., Vaarala, O., Dalphin, J.-C., Riedler, J., Braun-Fahrländer, C., von Mutius, E., Ege, M. J. (2015). *Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 2015 Jan;135(1):56-62.

Bayer, O., von Kries, R., Strauss, A., Mitschek, C., Toschke, A. M., **Hose, A.**, Koletzko, B. (2009). *Short- and mid-term effects of a setting based prevention program to reduce obesity risk factors in children: a cluster-randomized trial*. **Clinical Nutrition** 2009 Apr;28(2):122-8.

# 1 Die latente Klassenanalyse als alternativer Ansatz zur hypothesengetriebenen Subgruppenanalyse

In der Präzisionsmedizin tritt häufig die wissenschaftliche Fragestellung auf, ob und wie Individuen bzw. (potentielle) Patienten aufgrund ihres ähnlichen Krankheitsrisikos bzw. vergleichbarer krankheitsbezogener Risikofaktoren, oder etwa spezifischer Krankheitsmerkmale klassifiziert werden können. Dabei besteht die besondere Herausforderung darin, dass es oft aufgrund der Komplexität des kausalen wie zeitlichen Zusammenspiels dieser Faktoren und ihrer Interdependenzen meist nicht einfach ist, aussagekräftige Cluster von Personen mit den beobachtbaren Daten zu identifizieren (1). Hierfür bietet die latente Klassenanalyse (Latent Class Analysis (LCA)) eine Möglichkeit, einen komprimierten Satz grundlegender, durch die jeweiligen Ausprägungen mehrerer Dimensionen gekennzeichnete Untergruppen zu identifizieren, die etwa als komplexe Risikoprofile verstanden und dann wiederum zur Prädiktion des Krankheitsverlaufs oder zur Untersuchung differentieller Behandlungseffekte verwendet werden können.

Sie postuliert dabei grundsätzlich, dass es eine zu Grunde liegende, nicht direkt beobachtbare, daher „latente“ kategorielle Variable gibt, die eine Population in sich gegenseitig ausschließende und erschöpfende, daher „disjunkte“ latente Klassen unterteilt. Die Klassenzugehörigkeit der Individuen ist unbekannt, kann aber aus den gemessenen Merkmalen abgeleitet werden (2). Solche Attribute können etwa (frühe) Expositionen, sozio-demographische Merkmale, klinische Charakteristika, Behandlungen, Komorbiditäten, sowie Wirkungen, auch im zeitlichen Verlauf und in den verschiedensten Ausprägungen (z. B. Stärke) dieser Charakteristika, umfassen. In einem statistisch-probabilistischen Rechenansatz schätzt und benennt die LCA die Wahrscheinlichkeit, in wie weit jedes Individuum zu der jeweiligen disjunkten, latenten Klassen zugehörig ist (1). Daraus ergeben sich Untergruppen von Individuen, die sich am ähnlichsten sind und sich am deutlichsten von denen in anderen Klassen unterscheiden (3).

Als annahmen- bzw. hypothesenfreies Clusterverfahren ist die LCA (4-6) dabei innerhalb der Statistik den Strukturgleichungsmodellen (SEM) zuzuordnen, die es Forschern ermöglichen, komplexe Beziehungen zwischen mehreren abhängigen und unabhängigen Variablen gleichzeitig zu modellieren und zu schätzen. Die betrachteten Strukturen sind in der Regel nicht beobachtbar und werden indirekt durch mehrere Indikatoren gemessen (7). Des Weiteren handelt es sich bei ihr auch um ein Mischmodell („mixture model“), welches in der Statistik ein Wahrscheinlichkeitsmodell zur Darstellung des Vorhandenseins von Subpopulationen innerhalb einer Gesamtpopulation bezeichnet (8). Grundsätzlich ist die LCA anwendbar für binäre, kategorielle, oder nominal-skalierte Daten, wobei die Implementierung stetiger Variablen in die Modellierung über

den Umweg der Kategorisierung dieser durchaus möglich ist, was sie zu einer weit einsetzbaren, integrativ-explorativen Modellierungstechnik macht.

Dieser Ansatz kann dazu beitragen, methodische Herausforderungen anzugehen, die bei der klassischen Subgruppenanalyse, also der Untersuchung einer Untergruppe von Teilnehmern mit bestimmten, a priori ausgewählten Eigenschaften, auftreten, einschließlich einer hohen Typ-I-Fehlerrate (erhöhte Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse durch die Untersuchung einer Vielzahl von Subgruppen-Merkmalen), einer geringen statistischen Aussagekraft (geringe Power), und Einschränkungen bei der Untersuchung von Interaktionen höherer Ordnung bzw. multidimensionalen Zusammenhängen (2). Redundante bzw. überlappende Phänomene werden dabei integriert anstatt (multipel) kontrastiert.

Die LCA hat viele Stärken gegenüber anderen Methoden, die Subjekte z. B. auf der Basis von Scores bzw. klinischen Cut-off-Punkten in Gruppen einteilen. Bei diesen kann die Heterogenität innerhalb der Untergruppen erheblich sein und zu künstlichen, undeutlichen Untergruppen führen, wodurch alle Assoziationen zwischen ihnen und anderen Faktoren abgeschwächt oder falsch sein können (9). Die LCA hingegen nutzt die Maximum-Likelihood-Schätzung, um Untergruppen zu bilden, die intern homogen und extern heterogen sind (3). Daher können diese Untergruppen besser genutzt werden, um Beziehungen zu anderen operationalisierten Risiko- oder Förderfaktoren zu untersuchen. Eine weitere Stärke der LCA ist, dass es sich um eine modellbasierte Technik handelt, deren wesentlicher Vorteil gegenüber heuristischen Clustertechniken (z. B. k-Means-Clustering) darin besteht, dass sie Anpassungs- („Fit-“) Statistiken für die Modellauswahl liefern. Diese kann bei der LCA sowohl die absolute Anpassung eines bestimmten Modells als auch die relative Anpassung von zwei oder mehr konkurrierenden Modellen umfassen. (Consistent) Akaike Information Criterion ((C)AIC) und (adjusted) Bayesian Information Criterion ((a)BIC) sind dabei Informationskriterien, die verwendet werden können, um die relative Übereinstimmung von Modellen mit unterschiedlicher Anzahl latenter Klassen (z. B. vier gegen fünf Klassen) zu vergleichen. Für all diese Kriterien deutet ein niedrigerer Wert auf eine optimalere Balance zwischen Modellanpassung („Model-Fit“) und Sparsamkeit hin (2). Zusätzlich spielen Kriterien wie die Entropie, die bewertet, inwieweit sich die Gruppen, die in einer latenten Klassenanalyse identifiziert werden, voneinander unterscheiden, sowie die inhaltliche Interpretierbarkeit eine wichtige Rolle für die Klassenauswahl. Die Modelle können auch um Kovariaten erweitert und diese Klassifizierungsinformationen im breiteren Modell beibehalten werden, so dass auch Messfehler berücksichtigt werden können (10, 11). So haben Forscher mehr Flexibilität und Genauigkeit bei der Untersuchung von Subtypen und assoziierten Faktoren (12).

Trotz dieser potenziellen Vorteile haben Kritiker auch Bedenken hinsichtlich der Anwendung von statistischen „latent variable mixture modeling“- Verfahren wie die LCA geäußert (13-15). Erstens wird sie in der Regel explorativ durchgeführt, wobei eine zunehmende Anzahl von Klassen an die Daten angepasst und das am besten geeignete Modell ausgewählt wird. Die endgültige Klassenlösung wird vom Forscher entschieden, der die verschiedenen beschriebenen Informationskriterien verwenden kann, um das endgültige Modell auszuwählen. Da diese Entscheidung in gewisser Weise auf dem Urteil der Forscher beruht, sind die Ergebnisse möglicherweise nicht replizierbar (16). Zweitens ist die LCA ein datengesteuerter Ansatz, was bedeutet, dass identifizierte Klassen möglicherweise statistische Artefakte sind, denen es an Validität und Zuverlässigkeit mangelt (17). Ohne dies festzustellen, ist es schwierig abzuleiten, ob die Klassen natürlich vorkommende Untergruppen in der Grundgesamtheit darstellen oder ob sie stichprobenspezifisch sind. Es gibt aber Möglichkeiten, einige der oben angesprochenen Probleme anzugehen. Zum Beispiel können Forscher Transparenz bezüglich der Methoden und getroffenen Entscheidungen herstellen, die verwendet wurden, um Klassen abzuleiten, so dass die Ergebnisse einer kritischen Bewertung unterziehbar sind (4, 16). Darüber hinaus können identifizierte Klassen validiert werden, indem untersucht wird, ob es erwartete Beziehungen zwischen diesen und anderen Variablen bzw. Konstrukten gibt (4, 14). Die Zuverlässigkeit von Klassen kann getestet werden, indem die gleiche Analyse in verschiedenen Populationen oder mit einer Teilmenge derselben Population durchgeführt wird, um zu sehen, ob sie konsistent gefunden werden (Replikation) (14, 17). Studien wenden möglicherweise nicht immer dieses Maß an Strenge auf ihre Analysen an. Trotz dieser Bedenken wird die LCA in immer größerem Umfang eingesetzt (18). Die LCA hat also als statistisches Instrument für Forscher und Praktiker einen großen angewandten Nutzen im Bereich der Gesundheitsforschung (12).



## **2 Datengetriebene Identifikation des immunologischen Expositionsmusters „Atopie im Vorschulalter“**

Im Folgenden soll anhand der beiden Publikationen „Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts“ (19) und „Development of atopic sensitization in Finnish and Estonian children: A latent class analysis in a multicenter cohort“ (20) über die Ergebnisse zweier LCA-basierter Ansätze der hypothesenfreien Modellierung atopischer Muster im Kindesalter unter der Annahme, dass es sich dabei um latente Phänomene handelt, berichtet werden. Die ersterwähnte Publikation wird im Folgenden der Einfachheit halber aufgrund ihrer zu Grunde liegenden Populationen als PASTURE/MAS-Studie bzw. -Publikation, die zweite als DIABIMMUNE-Studie/Publikation bezeichnet.

### **2.1 Klinisch relevante Phänotypen als Ausdruck latenter Phänomene bei komplexen Krankheitsbildern**

Eine moderne Definition besagt, dass der Phänotyp "die beobachtbaren, strukturellen und funktionellen Eigenschaften eines Organismus sind, die durch seinen Genotyp bestimmt und durch seine Umgebung moduliert werden" (6). In einem nosologischen Sinne kann der Begriff Phänotyp in der klinischen Medizin verwendet werden, um über eine spezifische Präsentation einer Krankheit zu sprechen. Das komplementäre Konzept in dieser Hinsicht ist der Endotyp, der sich auf die Pathogenese der Krankheit bezieht, die ihre Präsentation ignoriert. Betrachtenswerte Aspekte eines Phänotyps wären jedes beobachtbare Merkmal einer Krankheit, wie Morphologie, Entwicklung, biochemische oder physiologische Eigenschaften oder Verhalten, ohne dass ein Mechanismus impliziert wird. Ein klinischer Phänotyp ist die Präsentation einer Krankheit bei einem bestimmten Individuum (21), der je nach Komplexitätsgrad bzw. Diversität der Entitäten dieser Erkrankung über eher evidente oder latente Muster verstanden werden kann. Sind diese Muster erkenntnisreich bezüglich eines tieferen Verständnisses der Erkrankung, kommt ihnen auch eine Bedeutung als echte Phänomene zu. Asthma und Atopie gehören sicher zu den komplexeren Krankheitsbildern, unter die verschiedenste Entitäten bzw. Phänotypen subsummiert werden. Diese lassen sich neben den den Klinikern bekannten Erscheinungsformen über die epidemiologische Bestimmung latenter Phänomene erfassen, ausdifferenzieren, und in ihrer klinischen Relevanz bestimmen.

## 2.2 Atopie und ihre Relevanz für pädiatrisches Asthma unter phänotypischer Perspektive

Asthma bronchiale ist eine inflammatorische, obstruktive Lungenerkrankung mit variabler bronchialer Hyperreagibilität (22). Bei betroffenen Personen treten wiederkehrende Episoden von Atemnot, Husten oder pfeifenden Atemgeräuschen auf (23). Es ist im Kindesalter die häufigste chronische Erkrankung und zeigt sich sehr heterogen, mit verschiedenen Phänotypen und Schweregraden (22, 24, 25). Phänotypen von Asthma im Kindesalter sind dabei durch unterschiedliche Verläufe und funktionelle Merkmale gekennzeichnet. Epidemiologisch hat sich für deren Modellierung auch schon eine LCA-basierte Herangehensweise etabliert, wobei hierfür das Auftreten eines der Leitsymptome, nämlich das pfeifende Atemgeräusch („wheeze“), über die Zeit statistisch modelliert wurde und Phänomene wie „persistent wheeze“, „late onset wheeze“, oder „transient wheeze“ entdeckt wurden (26, 27).

Atopie kann als die genetische Tendenz definiert werden, für häufige Allergene sensibilisiert zu werden, auf die die meisten Menschen aufgrund einer gewöhnlichen Exposition nicht reagieren. Dabei ist sie typischerweise mit erhöhten Immunantworten in Form von Produktion von Immunoglobulin E (IgE) auf Allergene verbunden, insbesondere auf inhalative Allergene und Lebensmittelallergene (28). Als typische und häufige Allergenspezifitäten ersterer Kategorie sind beispielsweise Lieschgras, Birke, Hausstaubmilbe, Hundeschuppen, und Katzenepithelien zu nennen, zur zweiten gehörig können etwa Weizenmehl, Nüsse, und Hühner- sowie Milcheiweiß angesehen werden (29). Damit assoziierte atopische Erkrankungen umfassen eine heterogene Gruppe von Symptomen und Störungen, die von Keuchen, Husten, Atemnot, Heuschnupfen und Rhinitis bis hin zu Hauterkrankungen wie atopischer Dermatitis (Ekzem oder atopisches Ekzem) reichen, die jeweils durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden können. Diverse Manifestationen einer atopischen Erkrankung können bei demselben Patienten koexistieren oder sich zu unterschiedlichen Zeiten entwickeln (30).

Asthma und Atopie sind für sich genommen schon komplexe Einheiten, die verschiedene Untergruppen umfassen, und sich oft gleichzeitig vor dem Schulalter manifestieren. Aber die Wechselbeziehung beider Phänomene bleibt unklar, möglicherweise, weil beide Zustände aus einer Vielzahl von individuellen Pathologien mit komplexen Interferenzen resultieren können, die das gesamte Bild verwischen.

Atopisches Asthma stellt dabei die häufigste Form von Asthma im Kindesalter dar und ist gekennzeichnet durch eine eosinophile Atemwegsentszündung, die mit einer Sensibilisierung von spezifischen Immunglobulin E (IgE) -Antikörpern gegen verschiedene Allergene einhergeht (31). Auf Bevölkerungsebene zeigen Studien, dass das Auftreten

von Asthma vor dem 13. Lebensjahr stärker mit Atopie und größerer Luftstromobstruktion assoziiert war als später einsetzendes Asthma (32, 33).

Das Fehlen von Goldstandards für diagnostische Marker für Atopie und Asthma trägt weiter zur bestehenden Komplexität der diagnostischen Genauigkeit und Definitionen bei. Obwohl neuere statistische Phänotypisierungsstudien wesentlich zu unserem Verständnis dieser heterogenen Störungen beigetragen haben, erfordert die Umsetzung dieser Ergebnisse in aussagekräftige Informationen und wirksame Therapien weitere Forschungsarbeiten zum Verständnis der zugrunde liegenden biologischen Mechanismen (34). In diesem Kontext kann die latente Klassenanalyse mit ihrem eingangs beschriebenen Potential als hervorragende Methode angesehen werden, dieser komplexen Herausforderung gerecht zu werden, die Entwicklung atopischer Sensibilisierungen im Kindesalter zu phänotypisieren und mögliche sinnvolle und klinische relevante Beziehungen zur Asthmagenese bzw. verschiedenen phänotypischen Ausprägungen dieser Erkrankung herzustellen.



## **2.3 Gemeinsamer inhaltlicher Hintergrund der Studien zu den Phänotypen von Atopie (PASTURE/MAS- und DIABIMMUNE-Publikation)**

Für Atopie ist die Definition von Phänotypen in der Kindheit im Gegensatz zur vorher erwähnten für Asthma weniger klar und methodisch komplexer, weil zusätzlich zum zeitlichen Verlauf verschiedene Allergenspezifitäten oder Arten der Sensibilisierung (Nahrungsmittelallergene, sowie saisonale oder ganzjährige (perreniale) inhalative Allergene) integriert werden müssen (35). Aufgrund der möglichen gleichzeitigen Manifestation dieser Erscheinungen (Ko-Sensibilisierungen) ist diese klassische Kategorisierung mehrdeutig, führt zu überlappenden Gruppen, und ist möglicherweise unzureichend, um echte Phänotypen mit eigener Pathogenese und den entsprechenden klinischen Implikationen zu erfassen.

### **2.3.1 Ansätze der Kategorisierung von Mustern atopischer Sensibilisierung**

Das Risikopotential bzw. spezifische Risikoprofil einzelner Allergene bei der Manifestation atopischer Erkrankungen wird seit langem kontrovers diskutiert. 1989 schlug Burrows eine lineare Beziehung zwischen den Gesamt-IgE-Spiegeln und dem Asthmarisiko vor (36). In einem der nächsten Erkenntnisschritte stellten WissenschaftlerInnen die Hypothese auf, dass „eine zugrunde liegende Erkrankung sowohl ein bestimmtes Sensibilisierungsmuster als auch die Entwicklung von Asthma im Kindesalter antreibt“ (37).

Andere Ansätze, die a priori definierte, hypothesenbasierte und disjunkte Kategorien für ihre Klasseneinteilungen anwendeten, stützten sich hauptsächlich auf zeitliche Muster und konzentrierten sich dabei etwa auf das Alter der ersten Manifestierung, Längsschnittrrends, sowie die Persistenz der IgE-Sensibilisierung. Allerdings sind solche Einteilungen nie frei von getroffenen Annahmen bzw. der Voreingenommenheit der Forschenden („investigator bias“) (21, 23).

Später wurde das Konzept der Multiplizität von Sensibilisierungen (monovalente versus polyvalente Sensibilisierung) als eigentlicher prädizierender Faktor für atopisches Asthma eingeführt (38). Diese Studie war dahin inspirierend, dass sie atopische Phänotypen mittels latenter Klassenanalysen datengetrieben identifizierte, um ihren individuellen Funktionsweisen möglichst gerecht zu werden. Der mögliche Effekt von „Interaktionen höherer Ordnung“, für deren Analyse Lanza (2) die LCA als prädestiniert sieht, wurde durch die Integration der Dimensionen „Allergenspezifität“ und „zeitlicher Verlauf“ in dieser Publikation mitbedacht. Nicht in Betrachtung gezogen wurde von der Autorenschaft allerdings die Dimension „Stärke der Sensibilisierung“, ausgedrückt durch die Höhe des spezifischen IgEs (sIgE), obwohl wie erwähnt seit Burrows (36) die Bedeutung dieser erkannt worden war.

Vor diesem Hintergrund widersprüchlicher Hypothesen suchten wir nach einem umfassenden, integrativen und hypothesenfreien Konzept, das sowohl diese drei Dimensionen in Beziehung setzen und der höheren Komplexität gerecht werden, als auch die eingangs beschriebenen Einschränkungen hypothesengetriebener Subgruppenanalysen überwinden könnte, wofür die LCA die Methode der Wahl schien.

## **2.4 Ziele der PASTURE/MAS-Studie**

Ziel dieser Analyse war es, die von der LCA abgeleitete dreidimensionale Klassifikation bzw. Phänotypeneinteilung in den ersten 6 (bzw. 5) Lebensjahren mit klassischen Definitionen der Atopie, basierend auf Carrier Polymer System- (CAP-) Klassen, zu vergleichen und beide Systeme mit der Manifestation von Asthma, allergischen Erkrankungen, Zytokin-Expression und Lungenfunktion in Beziehung zu setzen. Schließlich versuchten wir, die verschiedenen Aspekte der Atopie in ein Pfadmodell für Asthma und Lungenfunktion zu integrieren.

## **2.5 Ziele der DIABIMMUNE-Studie**

Hier stellten wir die Hypothese auf, dass wir mit dieser Klassifizierung verstehen könnten, welche Atopietypen am anfälligsten für Umwelteinflüsse oder familiäre Hintergründe von Allergien und Autoimmunität sind. Ziel dieser Studie war es daher, die bisherigen LCA-Ergebnisse aus den zwei Geburtskohorten der PASTURE/MAS-Studie in der Kleinkinderkohorte der DIABIMMUNE-Studie zu replizieren und das einzigartige Setting der Möglichkeit eines direkten Vergleichs von Finnland und Estland, zwei durch die Ostsee getrennte Länder mit auffallenden Unterschieden in den Atopieraten, bezüglich der Ausprägung der Atopie-Phänotypen zu nutzen. Diese sollten in Bezug gesetzt werden zu Faktoren wie einem unterschiedlichen erblichen Hintergrund, wie auch zu divergierenden sozioökonomischen und umweltbezogenen Entwicklungen in diesen Ländern.

## **2.6 Methoden**

### **2.6.1 Beschreibung der Studienpopulationen**

In der PASTURE/MAS-Publikation (19) wurden hierzu als Studienpopulationen zwei große und bekannte Geburtskohorten herangezogen: die europäische multizentrische „Protection against allergy: Study in Rural Environments (PASTURE)“ Kohorte (39), und die „Multizentrische Allergiestudie (MAS)“ (40), was neben der Möglichkeit der

Validierung der Ergebnisse in einer Replikationskohorte die Chance bot, potentielle Unterschiede in den Phänotypen bzw. deren Ausprägung in einer städtischen (MAS) gegenüber einer ländlichen (PASTURE) Kohorte zu eruieren.

Die PASTURE-Kohorte wurde konzipiert, um frühe Risiko- und Schutzfaktoren für Asthma und allergische Erkrankungen im Kindesalter epidemiologisch zu erhellen, und darauf aufbauend klinisch relevante Ansätze für die Kausalitäts- und Präventionsforschung abzuleiten (39). Insbesondere ging es darum, den als „Bauernhofeffekt“ bekannten Zusammenhang zwischen (früh-)kindlicher Bauernhof-Exposition und Allergieschutz zu untersuchen (41). Hierfür rekrutierte PASTURE in den Jahren 2002-2005 insgesamt 1133 Kinder aus ländlichen Gebieten in 5 europäischen Ländern: Österreich, Finnland, Frankreich, Deutschland und der Schweiz. Kinder von Müttern, die auf traditionellen Viehzuchtbetrieben lebten, wurden der Bauernhofgruppe zugeteilt; Kinder aus denselben ländlichen Gebieten, die jedoch nicht auf einem Bauernhof aufwuchsen, der Vergleichsgruppe, in einem etwa paritätischen Verhältnis.

Die Deutsche Multizentrische Atopiestudie (MAS-90) wurde als Kohorte initiiert, um den prädiktiven Wert verschiedener klinischer und immunologischer Parameter sowie die Bedeutung früher Umweltexpositionen in Bezug auf Allergene und Triggerfaktoren für die Entstehung von atopischen Erkrankungen in der frühen Kindheit zu bewerten (40).

Das DIABIMMUNE-Projekt, das die Datengrundlage für die zweite Publikation aus diesem Themenbereich bildete (20), zielt darauf ab, die Hygienehypothese (42-44) zu testen und ihre Rolle bei der Entwicklung von Typ-1-Diabetes und anderen Autoimmunerkrankungen zu untersuchen, basierend auf Populationen finnischer und estnischer Kinder. Die ProjektforscherInnen versuchen, diese Hypothese zu validieren und dabei die biologischen Mechanismen aufzudecken, durch die Hygiene das Immunsystem beeinflusst und möglicherweise die Immunantworten behindert (vgl. <https://diabimmune.broadinstitute.org/diabimmune/>).

## 2.6.2 Analysen

Die Analyse der DIABIMMUNE-Studie umfasste dabei 1603 finnische und 1657 estnische Kinder. Blut wurde im Alter von 3 und 5 Jahren entnommen und das IgE gemessen; bei Kindern mit hohem Diabetesrisiko und hohen IgE-Werten bei der Rekrutierung (Hochrisiko-Subpopulation) fand mit 4 Jahren eine zusätzliche IgE-Bestimmung statt. Aus PASTURE gingen 766 Kinder (IgE-Messungen zu Geburt und mit 1, 4 und 6 Jahren), und aus MAS 680 Kinder (IgE-Messungen mit 1,2,3,5 und 6 Jahren) in die Analyse ein. Die Zytokinpiegel wurden nur in der PASTURE-Kohorte gemessen.

Die Stärke der Sensibilisierung wurde durch Variablen für die sIgE-Werte mit den folgenden Kategorien:  $< 0,35$  kU/L;  $\geq 0,35$  kU/L;  $\geq 0,7$  kU/L;  $\geq 3,5$  kU/L, entsprechend den CAP-Klassen, operationalisiert. Aus PASTURE/MAS gingen 9, aus DIABIMMUNE 8 Allergenspezifitäten in die Analysen ein.

## **2.7 Zusammenfassung der generalisierbaren Ergebnisse aus der PASTURE/MAS- und DIABIMMUNE-Studie**

### **2.7.1 Quantitativ und qualitativ vergleichbare Einteilung der latenten Klassen**

Die latente Klassenanalyse (LCA) priorisierte basierend auf den für die Klassenauswahl entscheidenden, eingangs beschriebenen statistischen Modellparametern (45) und der vergleichbaren Interpretierbarkeit in beiden Publikationen für alle 4 Populationen (PASTURE/MAS (19) sowie für DIABIMMUNE Finnland und Estland (20)) eine 5-Klassenlösung. Sie klassifizierte dabei vorrangig für Spezifitäten und Kombinationen von Allergenen (Nahrungsmittelallergene gegenüber inhalativen Allergene) und spezifische IgE-Serumkonzentrationen. Trotz der Unterschiede in den Zeiten und physischen Räumen der Rekrutierung der Kohorten fanden sich viele Ähnlichkeiten, wie auch erklär- bare Unterschiede, so dass wir eine valide und generalisierbare Replikation der Klassen- bzw. Phänotypeneinteilung mit vergleichbaren Proportionen verzeichneten. Dies wurde auch in der Hochrisiko-Subpopulation in DIABIMMUNE bestätigt.

Die größte, je nach Kohorte von 54% bis 76% der Populationen betreffende Klasse umfasste die nicht-sensibilisierten Kinder. Zudem erkannten wir jeweils eine mit auf verschiedene Nahrungsmittelallergene sensibilisierten Kindern (6%-15% der Populationen), und zwei, die in MAS, sowie in beiden Populationen von DIABIMMUNE zwischen perennialen und saisonalen inhalativen Allergenen unterschieden (3%-10% der Populationen). In der ländlichen PASTURE-Kohorte trat zusätzlich eine eigene Klasse von nur auf Kuhmilch sensibilisierten Kindern auf (19% der Population), dafür wurden die Kinder mit inhalativer Sensibilisierung unabhängig von der spezifischen Art in nur einer Klasse vereinigt (16% der Population) (**siehe** „FIG 4. Atopy phenotypes in relation to the distribution of LCs in both populations.“ (19) und „FIG 4. Distribution of LCs by country.“ (20)).

### **2.7.2 „Severe atopy“ als echtes latentes Phänomen mit originär assoziierten Eigenschaften**

Zudem kristallisierte sich überall ein kleine, 4% bzw. 5% der Populationen umfassende, aber in vielerlei Hinsicht hervorstechende und daher genauer zu erläuternde Klasse (jeweils LC5) heraus, die wir „schwere Atopie“- bzw. „severe atopy“-Klasse benannten.

In PASTURE/MAS (19) konnten wir zeigen, dass diese sich durch einen frühen, schon im ersten Lebensjahr manifestierenden und über alle Altersstufen persistierenden inkrementellen Anstieg des spezifischen IgEs sowohl auf Nahrungsmittel-, als auch auf inhalative Allergene gekennzeichnet war (**siehe** “TABLE I. Increment in sIgE production comparing severe atopy with the other atopy phenotypes” (19)). Im Alter von 6 Jahren konnten in Folge dieses Potenzierungseffektes für diese Klasse eine hohe Prävalenz stark auf saisonale Allergene sensibilisierter Kinder (ca. 80%  $\geq$  CAP-Klasse 3 in PASTURE/MAS) aufgedeckt, sowie die bei Weitem höchsten absoluten Werte für inhalative, insbesondere spezifische saisonale IgE-Serumkonzentrationen ( $p < .0001$ ), im Vergleich zu allen anderen LCs, verzeichnet werden (**siehe** FIG 5(A). und FIG E8. (19)).

Die schwere Atopieklasse „LC5“ beherbergte auch in der DIABIMMUNE-Studie in beiden Ländern die Kinder mit sehr hohen spezifischen IgE-Werten und den höchsten Konzentrationen von Gesamt-IgE (**siehe** “FIG 5. tIgE levels across LCA at 5 years.” (20)). Dieses diskriminative Merkmal dieser Klasse konnte nur durch die Einbeziehung der Dimension „Stärke der Sensibilisierung“ in die LCA eruiert werden. In allen 4 Populationen aus beiden Studien wies diese Klasse als hervorstechende Eigenschaft die mit Abstand stärksten Assoziationen mit fast allen Ausprägungen allergischer Erkrankungen auf. In der DIABIMMUNE-Studie, in der keine direkte Asthma-Diagnose erfasst wurde, waren dies beispielsweise im Alter von 5 Jahren Keuchen („wheeze“) (Odds Ratio [OR], 5,64 [95% KI, 3,07-10,52] und 4,56 [95% KI, 2,35-8,52]), allergische Rhinitis (OR, 22,4 [95% KI, 11,67-44,54] und 13,97 [95% KI, 7,33-26,4]), und atopisches Ekzem (OR, 9,39 [95% KI, 4,9-19,3] und 9,5 [95% KI, 5,2-17,5]), jeweils für Finnland bzw. Estland) (20). (Für PASTURE/MAS **siehe** FIG 3. und FIG E3.).

## **2.8 Spezifische Erkenntnisse aus der PASTURE/MAS-Publikation**

### **2.8.1 LCA-basierte, disjunkte versus klassische, überlappende Klasseneinteilung und ihre Assoziationen mit allergischen Erkrankungen**

Die Bedeutsamkeit und die klinische Relevanz der LCA-basierten Klasseneinteilung gegenüber klassischen Definitionen von atopischer Sensibilisierung traten in der PASTURE/MAS-Publikation nicht zuletzt bei der Betrachtung der Assoziationen der Klassen mit „lifetime asthma“ und „current wheeze“ (**siehe** “FIG 3. Associations of asthma-related conditions with LCs and classical definitions of atopic sensitization at age 6 years.” (19)) und weiteren klinischen Erscheinungsbildern wie dem Asthma-Phänotyp „late onset wheeze“, aber auch „lifetime hayfever“ und „lifetime atopic dermatitis“ (**siehe** “FIG E3. Associations of health conditions with LCs and classical definitions of atopic sensitization at age 6 years.” (19)) zu Tage. Die klassischen Definitionen identifizierten dabei durch die möglichen Überlappungen der Sensibilisierungsmuster aus

Nahrungsmittel- und inhalativen Allergenen, anders als bei disjunkter Betrachtungsweise, unspezifische, insbesondere Nahrungsmittelallergene überschätzende falsch positive Assoziationen. Diese waren damit zu erklären, dass z. B. die „severe atopy“-Klasse durch ein hohes Maß und frühes Auftreten von Ko-Sensibilisierungen (und damit einer generellen Poly-Sensibilisierung, v. a. in MAS beobachtbar) mit Nahrungsmittelallergenen gekennzeichnet war, so dass die sehr starken Assoziationen dieser Klasse mit Asthma und anderen allergischen Erkrankungen auf den ersten Blick diesen zugeschrieben werden konnten. Die reinen Nahrungsmittelallergen- und Kuhmilch-Klassen zeigten allerdings keinerlei solcher signifikanten Beziehungen, so dass dieses Sensibilisierungsmuster bzw. diese Ko-Sensibilisierungen nur als Epiphänomen oder bestenfalls frühes Signal des „severe atopy“-Phänotyps und nicht mit einem eigenen Asthmarisiko attribuiert verstanden werden sollten (vgl. auch FIG 6. (19)). Zudem zeigte die klassische Einteilung der Stärke der Sensibilisierung (CAP 1 versus CAP 3) auch für die inhalative Sensibilisierung im Vergleich zur LCA-basierten Klassen-Einteilung im Alter von 6 Jahren eine weniger ausgeprägte bzw. unspezifische Asthmarisiko-Stratifikation.

### **2.8.2 Obstruktive Lungenfunktionseinschränkung als Charakteristikum des atopischen Sensibilisierungsphänomens „severe atopy“**

Von besonderem und klinisch bedeutsamem Erkenntniswert entpuppte sich die Beobachtung, dass der Zusammenhang zwischen Mustern atopischer Sensibilisierung und eingeschränkter Lungenfunktion (hier: FEV1 z-score) sich bei der LCA-basierten Klassifizierung in beiden Populationen exakt auf die kleine, aber mit dem deutlich höchsten Asthmarisiko behaftete Klasse „severe atopy/LC5“ beschränkte. Klassisch definiert war hier in PASTURE keinerlei signifikante Assoziation zu finden, in MAS waren unspezifisch sowohl die Definition „sensibilisiert auf irgendein inhalatives Allergen  $\geq$  CAP-Klasse 3“ als auch „sensibilisiert auf irgendein Nahrungsmittelallergen  $\geq$  CAP-Klasse 3“ signifikant mit einem niedrigen FEV1 assoziiert.

### **2.8.3 “Severe atopy” als Klasse mit Anzeichen einer dysbalancierten Immunantwort**

Als weiteres Alleinstellungsmerkmal unterschied sich „severe atopy“ gegenüber den anderen LCs in Bezug auf das Verhältnis der IL-5 zur IFN- $\gamma$  Expression im Alter von 6 Jahren ( $p < .01$ ), wodurch die Aktivierung von T<sub>H</sub>2 anstelle von T<sub>H</sub>1-Subsets reflektiert wurde und was als Anzeichen einer aus dem Gleichgewicht geratenen Immunantwort gewertet werden kann (siehe “FIG 5. (19)).

#### 2.8.4 Zusammenführung der Charakteristika von „severe atopy“ mittels des statistischen Verfahrens der Pfadanalyse

Für PASTURE und MAS konnten wir diese Einzelbefunde mittels des statistischen Verfahrens der Pfadanalyse zusammenführen sowie in ihren Zusammenhängen quantifizieren. Dabei zeigten wir, dass der starke Effekt von „severe atopy“ auf Asthma in beiden Populationen durch die exzessive Produktion und die daraus resultierenden hohen Werte von spezifischem, insbesondere saisonalem IgE vermittelt war, wohingegen der Einfluss auf die reduzierte Lungenfunktion (niedriger FEV1) direkt, bzw. nicht-mediiert war.

Aufschlussreich war es festzustellen, dass die vermeintlich starke Assoziation von Asthma im Alter von 6 Jahren und einem niedrigen FEV1 in der Pfadanalyse aufgelöst („change in estimate“: 38%) und durch die Beziehung von „severe atopy“ und dem FEV1 ersetzt wurde. Klinisch sollte eine obstruktive Lungenfunktionseinschränkung im Schuleintrittsalter demzufolge weniger als Ausdruck von Asthma, sondern vielmehr des Sensibilisierungsmusters „frühe, schwere Atopie“ mit einem unter Umständen gemeinsamen ätiologischen Hintergrund verstanden werden. Diese gemeinsame Pathogenese könnte auf einen lokalen Prozess der unkontrollierten Produktion von sIgE in der Bronchialschleimhaut hinweisen, was wiederum das Ziel zukünftiger Interventionen, wie etwa zielgerichteter Anti-IgE Behandlungen sein könnte.

Des Weiteren klinisch bedeutsam ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass das Phänomen der „schweren Atopie“ auch einen erheblichen Anteil von Kindern ohne aktuelles Keuchen („wheeze“) oder eine etablierte Asthmadiagnose, aber mit FEV1-Werten innerhalb des untersten Dezils der Population umfasste (siehe „FIG 7. Proportion of nonasthmatic children with reduced lung function by LCs.“ (19)).

Im Konzept des „atopic march“, das mögliche kaskadenhafte Entwicklungsverläufe des Fortschreitens der Erkrankung bei Patienten mit anfänglicher atopischer Dermatitis in Richtung Asthma und atopischer Rhinitis beschreibt (46), werde bestimmte Phänomene als krankheitsdeterminierend angenommen. Daraus bekannte Muster wie eine frühe Sensibilisierung auf Nahrungsmittelallergene, aber auch die IL-5/IFN- $\gamma$ -Ratio, wie die frühe Poly-Sensibilisierung, wurden in unseren Analysen als nicht-kausal bzw. als Epiphänomene identifiziert (siehe „FIG 6. Path diagram comparing severe atopy with the other atopy phenotypes, including its features, lung function, and asthma in both populations.“ (19)). Dies stellt nicht zuletzt dahingehend eine Erweiterung des bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisstandes dar, als dass in früheren, aber weniger Dimensionen der Atopie einbeziehenden LCA-basierten Studien (38) die frühe Poly-Sensibilisierung noch als asthma-determinierend identifiziert wurde.

Insgesamt gibt die Zusammenführung der Charakteristika von „severe atopy“ einen starken und klinisch relevanten, aber weiterer Forschung bedürftigen Hinweis darauf,

dass es sich, wie von der LCA-basierten Herangehensweise impliziert, bei „severe atopy“ um ein authentisches latentes Phänomen handelt. Dies manifestiert sich vielschichtig, sowohl in seinen immanenten, genuinen Eigenschaften, als auch in seinen Beziehungen zu assoziierten Erscheinungen wie allergische Erkrankungen.

### 2.8.5 Überführung der latenten Klassen in Phänotypen

Diese Beobachtungen veranlassten uns, die LC-basierten Klassen als spezifische Krankheitspräsentationen zu begreifen und Kohorten übergreifend in PASTURE und MAS in die **Phänotypen**

- Nahrungsmittelallergen-Klassen = „**benign atopy**“, ohne mit allergischen Erkrankungen assoziiertem Risiko,
- inhalative Allergen-Klassen = „**symptomatic atopy**“, mit signifikantem, moderat erhöhtem Risiko für allergische Erkrankungen ohne eingeschränkte Lungenfunktion, sowie in
- die Klasse mit starker Sensibilisierung auf saisonale Allergene („LC5“) = „**severe atopy**“, mit sehr hohem Risiko für allergische Erkrankungen mit eingeschränkter Lungenfunktion und Anzeichen einer dysbalancierten Immunantwort überzuführen.

Diese Einteilung wurde in ihrer Klarheit und klinischen Bedeutsamkeit in einem Review als Publikation von besonderem Interesse für dieses Themengebiet gekennzeichnet (34).

### 2.9 Spezifische Erkenntnisse aus der DIABIMMUNE-Publikation

Die Prävalenz von Atopie ist mit einem westlichen Lebensstil verbunden, wie Studien zeigen, die benachbarte Regionen mit unterschiedlichen sozioökonomischen Hintergründen vergleichen (47). Atopie kann verschiedene Bedingungen widerspiegeln, die sich in ihrer Anfälligkeit für Umweltfaktoren unterscheiden. Für die Untersuchung spezifischer Umweltbedingungen wie auch eines möglichen erblichen Hintergrundes im Zusammenhang mit den identifizierten Atopie-Phänotypen bildet das DIABIMMUNE-Studiendesign eine hervorragende Datengrundlage.

Generelle, noch nicht auf die replizierten Atopie-Phänotypen bezogenen Ergebnisse dieser Studie waren, dass sich beide Populationen in Bezug auf den sozioökonomischen Status, der in Finnland höher einzuschätzen war, und die Umweltdeterminanten, die beim Haustierbesitz und den bauernhof-typischen Expositionen in Estland höhere Prävalenzen aufwiesen, unterschieden (**vgl. FIG 1. (20)**). Die Prävalenz allergischer Erkrankungen, insbesondere Keuchen („wheeze“) und allergische Rhinitis, und die Sensibilisierung gegenüber den wichtigsten Allergenen wie Hühnerei, Kuhmilch und Birke war



in Finnland bemerkenswert erhöht, während in Estland nur die Hausstaubmilbenwerte wesentlich höher waren (alle  $p < .001$ ) (vgl. FIG 2. (20)).

### **2.9.1 Bezug der Atopie-Phänotypen aus beiden Populationen zu verschiedenen Umweltbedingungen, Genetik, sowie Diabetes**

Die Umweltunterschiede spiegeln sich in der Klasse der auf saisonale inhalative Allergene sensibilisierten Kinder (LC3) wider, die in Finnland mit 10% doppelt so groß war wie in Estland, und dort auch den höheren Anteil allergischer Erkrankungen erklärte, obwohl wie schon erwähnt die Zusammensetzung der Klassen zwischen den Ländern generell vergleichbar war (**siehe** „FIG 4. Distribution of LCs by country.“ (20)). Bezogen auf die Untersuchung des erblichen Hintergrunds zeigte sich eine Assoziation von schwerer Atopie (LC5) mit der Familiengeschichte von Atopie.

Der T1D-Risiko-Genotyp, repräsentiert durch HLA-DQ Risiko-Allele, war in Estland und tendenziell auch in Finnland für saisonale Atopie (LC3), und in Estland auch für perenniale Atopie (LC4), aber nicht für schwere Atopie (LC5) prädisponierend (**siehe** „FIG 6. Associations of LCs with diseases and hereditary background.“ und “TABLE E5. ORs to Fig 6 in the main body.” (20)). In Sensitivitätsanalysen wurden im 4-Klassen-Modell die saisonalen und perennialen Atopieklassen zusammengruppiert, und diese neue Klasse war signifikant mit dem T1D-Risiko-Genotyp assoziiert. Interessanterweise fanden wir also heraus, dass die erbliche Veranlagung für T1D mit den inhalativen LCs, bzw. in der Phänotypen-Klassifikation nur mit symptomatischer, aber nicht mit schwerer Atopie assoziiert war. Das gleichzeitige Auftreten von  $T_H1$ - und  $T_H2$ -anfälligen Erkrankungen wie Atopie und Diabetes deutet auf gemeinsame genetische Merkmale hin, was jedoch etwas das  $T_H1/T_H2$ -Paradigma in Frage stellt, welches ursprünglich einen Antagonismus von  $T_H1$ - und  $T_H2$ -dominierten Immunitätszuständen und -erkrankungen nahelegte. Im Gegensatz zum erblichen Hintergrund von T1D war aber die Familienanamnese von Atopie am stärksten mit „severe atopy“ assoziiert.

Die beschriebenen Ergebnisse unterstützen das Konzept, dass Atopie aus verschiedenen Entitäten besteht, von denen einige mit Autoimmunität und Anfälligkeit für Umweltexpositionen assoziiert sind und andere genetisch bedingte Formen widerspiegeln, die für  $T_H2$ -Erkrankungen prädisponieren.

Zusammenfassend fanden wir in DIABIMMUNE sehr ähnliche Muster von latenten Klassen in beiden Ländern, trotz erheblicher Unterschiede in sozioökonomischen und umweltbezogenen Faktoren und der Verteilung einzelner Allergenspezifitäten. Die saisonale Klasse scheint am anfälligsten für Umwelteinflüsse zu sein, was sich in der unterschiedlichen Größe dieser Klasse und dem damit assoziierten, divergierenden bevölkerungsbezogenen Anteil allergischer Erkrankungen zwischen den zwei verschiedenen

Ländern widerspiegelte. Letztendlich folgten die Formen der atopischen Sensibilisierung jedoch unabhängig von Umweltdiskrepanzen dem gleichen Muster.

## **2.10 Zusammenfassendes Zwischenfazit**

Die latente Klassenanalyse (LCA) als datengetriebenes, exploratives Clusterverfahren für die Eruierung latenter und komplex-multidimensionaler Phänomene entdeckte bei der Integration der drei Dimensionen Stärke, Spezifität, und Verlauf atopischer Sensibilisierung in vier Populationen von Kindern bis zum Schuleintrittsalter quantitativ und qualitativ vergleichbare, genuine Klassen, die sich auch als Phänotypen verstehen bzw. in diese überführen ließen. In Bezug auf das Risiko damit assoziierter allergischer Erkrankungen waren dies gutartige, symptomatische und schwere Atopie-Phänotypen.

Die disjunkte Klassen- bzw. Phänotypeneinteilung zeigte dabei eine im Vergleich zur aus der klinischen Praxis bekannten, überlappenden Einteilung in inhalative und Nahrungsmittel-Sensibilisierung deutlich spezifischere Risiko-Stratifikation.

Der schwere Phänotyp („severe atopy“) trat als latenter Zustand mit Anzeichen einer dysbalancierten Immunantwort hervor. Das sehr hohe Risiko für Asthma und weitere atopische Erkrankungen wurde vermittelt durch übermäßige sIgE-Produktion und sehr hohe Gesamt- und spezifische IgE-Werte im Alter von 5 bzw. 6 Jahren, insbesondere auf saisonale Allergene. Zudem erklärte dieser Phänotyp direkt und nicht das mit diesem stark assoziierte Asthma die eingeschränkte Lungenfunktion betroffener Kinder in diesem Alter.

Merkmale des „atopic march“, aber auch frühe multiple Sensibilisierung wurden als Epiphänomene von „severe atopy“ identifiziert und sprechen zusätzlich für eine echte, gemeinsame, aber in vollem Umfang nur latent zur erfassende phänotypische Präsentation eines eigenen Krankheitsbildes, zu dem es aber noch weiterer Studien bedarf.

Von klinischer Relevanz in diesem Zusammenhang ist auch die Erkenntnis, dass dieses Krankheitsbild einen beträchtlichen Anteil von Kindern mit schlechter Lungenfunktion, aber ohne etablierte Asthmadiagnose umfasst.

Mögliche Ansätze in Richtung Früherkennung und Therapie könnten dabei etwa ein Screening des inkrementellen IgE-Anstieges schon vor bzw. bis zum vierten Lebensjahr umfassen. Auch der frühe gezielte und spezifische Einsatz von Anti-IgE-Therapien wäre denkbar, aber auch hierzu bedarf es eines noch tieferen ätiologischen Verständnisses wie auch weiterer Forschung.

Atopie kann aber auch verschiedene Bedingungen widerspiegeln, die sich in ihrer Anfälligkeit für Umweltfaktoren unterscheiden, wie am Beispiel des inhalativen bzw. symptomatischen Phänotyps gezeigt werden konnte, dessen Größe mitbestimmend für

unterschiedliche Prävalenzen atopischer Erkrankungen in ungleich entwickelten Ländern war.

Die differentiellen Assoziationen der latenten Klassen mit atopischen Erkrankungen und genetischer T1D-Anfälligkeit könnten auf unterschiedliche immunologische Mechanismen hinweisen, die die verschiedenen Formen der Atopie mit Allergie und Autoimmunität verbinden, die durch die Wechselwirkung von Umwelt und genetischem Hintergrund angetrieben werden könnten.

### **3 Datengetriebene Identifikation des ernährungsbezogenen Expositionsmusters “Stile der Nahrungsmiteinführung im ersten Lebensjahr“**

Im Folgenden soll anhand der Publikation „Excessive Unbalanced Meat Consumption in the First Year of Life Increases Asthma Risk in the PASTURE and LUKAS2 Birth Cohorts“ (48) über das Ergebnis eines LCA-basierten Ansatzes der hypothesenfreien Modellierung des ernährungsbezogenen (Expositions-)musters “Stile der Nahrungsmiteinführung” im ersten Lebensjahr unter der Annahme, dass es sich auch hierbei um komplexe, latente Phänomene handelt, deren Implikationen annahmenbasiert nur schwer zu erfassen sind, berichtet werden. Die Publikation wird im Folgenden der Einfachheit halber aufgrund der ihr zu Grunde liegenden Populationen als PASTURE/LUKAS2-Studie bzw. -Publikation bezeichnet.

Wie vorhergehend erwähnt wurde die PASTURE-Geburtskohorte konzipiert, um frühe Risiko- und Schutzfaktoren für das Auftreten von Asthma und allergischen Erkrankungen ab dem Schulalter aufzuklären; dafür kommen auch bestimmte Ernährungsmuster in Frage. Bekannt und wissenschaftlich gut gesichert, nicht zuletzt durch die PASTURE-Studie, ist dabei der förderliche Effekt des Milchkonsums auf Asthma, Allergien und Infektionen (49); mögliche Zusammenhänge von Ernährung und solchen Erkrankungen werden beispielsweise über Wirkmechanismen wie Omega-3-Fettsäuren (50) oder das Darm-Mikrobiom (51) diskutiert.

Auch über die Untersuchung einzelner Nahrungsmittel(gruppen) hinausgehende Versuche, vielschichtige Ernährungsmuster zu definieren und den interdependenten Zusammenhang zwischen diesen und allergischen Erkrankungen statistisch-epidemiologisch zu modellieren, wurden in dieser Kohorte schon unternommen. Dies geschah allerdings mittels klassischer hypothesengetriebener Subgruppenanalysen, konkreter gesagt durch die Berechnung eines „food diversity scores“ für die Anzahl der im ersten Lebensjahr eingeführten festen Nahrungsmittel. Hierfür wurde ein inverser Zusammenhang aus Diversität und des Risikos der Entwicklung allergischer Erkrankungen gefunden (52).

Die PASTURE-Geburtskohorte bietet einen einzigartigen, großen Datensatz zur Einführung und Intensität der Fütterung von 19 Nahrungsmitteln im ersten Lebensjahr, um mittels einer LCA als hypothesenfreie Clustermethode, mit den eingangs diskutierten Unterschieden zu score-basierten Ansätzen, in der vorgestellten Arbeit (48) darüber hinaus zu gehen, und um die volle Komplexität dieser Informationen zu bewältigen und zu Grunde liegende Muster abzuschätzen.

Wir stellten dabei die Hypothese auf, dass spezifische, latente Fütterungsmuster existieren, die von unterscheidbaren, aber unbekanntem, verschiedenen kulturellen Hintergründen einbeziehenden Phänomenen abhängen. Um diesen möglichen Mustern eine für die Asthma- und Allergieforschung klinisch relevante Bedeutung zu geben, haben wir sie mit Asthma sowie dem Darmmikrobiom im zwölften Lebensmonat in Verbindung gebracht.

### 3.1.1 Methoden

Auf die Ziele, wie das Studiendesign der PASTURE-Kohorte wurde vorhergehend schon genauer eingegangen; die unabhängige bevölkerungsbasierte LUKAS2-Kohorte wurde in Analogie zum finnischen Zweig von PASTURE ins Leben gerufen und diente uns als Replikationskohorte für die Analysen.

In beiden Kohorten wurden die gleichen Fragebögen am Ende der Schwangerschaft und im Alter von 2, 12, 18, 24, 36, 48, 60 und 72 Monaten angewendet, um Informationen etwa über die Häufigkeit des Keuchens („wheeze“), und die Umweltexpositionen mit Schwerpunkt auf Landwirtschaft und Ernährung zu erhalten (5, 8). Die Eltern berichteten von ihrer Einführung fester Nahrung, die hauptsächlich ab dem 4. Monat stattfand, in monatlichen Tagebüchern. Der Verzehr der 19 typischsten Lebensmittel (u. a. Brot, Fleisch, Fisch, Ei, Milch, Joghurt, Obst und Gemüse) wurde alle vier Wochen in Kategorien von mindestens täglich, wöchentlich, monatlich oder weniger als monatlich abgefragt. Für die meisten Lebensmittel unterschied der Fragebogen zwischen hausgemachten und fertigen Produkten.

### 3.1.2 Ergebnisse

Die LCA zur Einführung von letztlich 17 ausgewählten Lebensmitteln in 4 Häufigkeitskategorien über 9 Monate ergab eine bezüglich der Entropie und den statistischen Modellparametern am besten zu bewertende 4-Klassen-Lösung (**siehe** TABLE 1 (48)).

Die graphische Darstellung der Prävalenz der Konsumhäufigkeit der einzelnen Lebensmittel pro Lebensmonat dieser ursprünglichen LCA-Lösungen (**siehe** FIGURE 2 (48)) brachte noch ein recht komplexes und schwer zu bewertendes Bild zu Tage, wobei schon eine Klasse (LC2) mit einer signifikant höheren Prävalenz (14.7%) von Asthma im Alter von 6 Jahren auffiel. Die Stratifizierung nach den primär enthaltenen Makronährstoffen (Kohlenhydrate, Fette, Proteine), sowie Früchte und Gemüse dieser Lebensmittel war leichter zu interpretieren (**siehe** FIGURE 3 (48)): Für Obst/Gemüse und Fette wurden keine relevanten Unterschiede festgestellt, während in der Asthma-Risikoklasse

LC2 gegenüber den gepoolten drei weiteren Klassen bei den Kohlenhydraten der Verzehr von Getreide früher und häufiger erschien, aber am auffälligsten der tägliche Verzehr von Fleisch mit gleichzeitig kaum einer anderen Proteinquelle war.

Mittels eines „Random Forest“-Modells, für das diese in Frage kommenden Kontraste als Variablen definiert und dann in ihrer Wichtigkeit für das Asthmarisiko in eine Rangreihenfolge gebracht wurden, konnten nur Unterschiede wie "tägliches Fleisch, aber keine tägliche Milchaufnahme im Monat 11" und "tägliches Fleisch, aber keine tägliche Joghurtaufnahme im Monat 11", gefolgt von Variablen, die sich hauptsächlich auf Fleisch und Milchprodukte zwischen Monat 7 und 11 bezogen, als bedeutsam eruiert und für den Fokus der weiteren Analyse bestimmt werden (**siehe** „FIGURE 4. Prediction of asthma by protein and carbohydrate sources.“ (48)).

Eine auf diesen Erkenntnissen beruhende, nur auf die Variablen zum Fleisch-, Milch- und Joghurtkonsum beschränkte LCA über denselben Zeitraum der Lebensmitteleinführung vom 4. bis 12. Lebensmonat erbrachte eine 7-Klassen-Lösung. Eine kleinere Asthma-Risikoklasse (LC7, n=120) ergab sich mit einem stärker ausgeprägten Asthmarisiko (20,2% Asthmafälle, aOR: 6,73,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zu allen anderen LCs mit 6,4% an Fällen. Bei jeder Konsumhäufigkeit von monatlich bis täglich war der Kontrast zwischen übermäßigem Fleisch- und niedrigem Milch-/Joghurtkonsum in der Asthma-Risikoklasse LC7 offensichtlich. Wir bezeichneten LC7 daher als "unausgewogenen Fleischkonsum" bzw. „unbalanced meat consumption“ (UMC). Die Zusammenfassung aller anderen latenten Klassen zeigte ein eher ausgewogenes bzw. für Milch/Joghurt überwiegendes Muster der Fleisch- im Verhältnis zur Milch/Joghurt-Aufnahme (**siehe** FIGURE 5 (48)).

In der rein finnischen, kleinen LUKAS2-Kohorte (N=204 mit analysierbaren Daten) konnte mit einem gleichen Ansatz bei einer 5-Klassenlösung eine Klasse (LC5) mit einem ähnlichen Muster von unausgewogenem Fleischkonsum und erhöhtem Asthmarisiko (aOR= 2,32,  $p = 0,035$ , **siehe** FIGURE 7 (48)) gefunden, und damit die Ergebnisse aus PASTURE repliziert werden.

In der PASTURE-Kohorte blieb die Wirkung von UMC auf Asthma im Alter von 6 Jahren (aOR=6,73,  $p < 0,001$ ) bis zum 10. Lebensjahr bestehen (aOR=4,35,  $p < 0,001$ , **siehe** “FIGURE 8. Effects of UMC on asthma and wheeze phenotypes in PASTURE.“ (48)). Die Wirkung auf atopisches Asthma war im Vergleich zu nicht-atopischem Asthma viel schwächer. Darüber hinaus war UMC mit Parametern assoziiert, die auf eine schlechte Lungenfunktion im Alter von 6 Jahren hinwiesen, wie einen niedrigen FEV1-Wert (adjusted Beta ( $\beta$ ) = -0,49, 95%,  $p = 0,004$ ). Bei Kindern mit kürzerer Stillzeit oder längerer Fütterung erhöhte UMC signifikant das Risiko für Asthma, einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion und für eine stärkere Gewichtszunahme bis zum

2. Jahr (**siehe** “TABLE 2. Effects of UMC stratified by duration of formula feeding and breastfeeding.“ (48)). Die Wirkung von UMC war kaum mit der industriellen Verarbeitung von Fleisch (Fertigprodukte versus hausgemachte Fleischgerichte) verbunden, während bei Bauernhof-Milch die Schutzwirkung im Vergleich zu industriell verarbeiteter Milch stärker war (**siehe** “FIGURE 11. Sensitivity analyses on intensity of meat and milk or yoghurt consumption and the role of industrial processing.“ (48)).

Da wir die direkten Auswirkungen von Ernährungsmustern auf die Darmphysiologie nicht messen konnten, verwendeten wir die verfügbaren Darmmikrobiomdaten als Proxy für die Auswirkungen der Fütterungsmuster. UMC beeinflusste die Zusammensetzung des Darmmikrobioms nach 12 Monaten und förderte Gattungen wie beispielsweise *Acinetobacter* (aOR=1,28, p = 0,048), welche auch mit einem Asthmarisiko assoziiert war (aOR=1,55, 95%, p = 0,001). Um mögliche Einflüsse von Ernährungsmustern auf funktionelle Eigenschaften der Mikrobiota zu eruieren, untersuchten wir Stoffwechselwege der Mikrobiota und ihre Beziehungen zu UMC. Die „Biosynthese von nonribosomalen Peptiden der Siderophorengruppe“ zeigte die stärkste Assoziation mit UMC (aOR=1,58, p = 0,007) (**siehe** “FIGURE 12. Microbial genera and microbial metabolic pathways associated with UMC.“ (48)).

### 3.1.3 Inhaltliche Zusammenfassung und Diskussion

Durch die systematische Beurteilung der Fütterungsmuster im ersten Lebensjahr entdeckten wir eine Konstellation von übermäßigem Fleischkonsum auf Kosten anderer Proteinquellen (UMC), die durch ein wesentlich erhöhtes Asthmarisiko im Schulalter gekennzeichnet war. Darüber hinaus legte der Einsatz der LCA spezifische Kombinationen von Lebensmitteln wie die ausgewogene Kombination von Fleisch- und Milch/Joghurt-Konsum mit seinem geringen Asthmarisiko offen. Dieses Ergebnis konnte in zwei unabhängigen Geburtskohorten (PASTURE und LUKAS2) bestätigt werden.

Die Wirkung von UMC im ersten Jahr war sogar nach 10 Jahren noch positiv mit einem Asthmarisiko assoziiert. Folglich gingen wir davon aus, dass dieses spezifische Fütterungsmuster zu grundlegenden, potenziell epigenetischen Veränderungen führt, die über mindestens 10 Jahre anhalten und sich auch auf objektive Lungenfunktionsparameter auswirken. Da die Wirkung bei nicht-atopischem Asthma stärker war, scheint eine allergische Komponente im Pathomechanismus weniger wahrscheinlich.

Mit Hilfe von Mikrobiomanalysen identifizierten wir den bakteriellen Eisenstoffwechsel als wahrscheinlichen Faktor für das gesundheitsschädliche Phänomen. Das Zusammenspiel zwischen aus der Nahrung zugeführtem Eisen und übermäßigem Wachstum potenziell nachteiliger Bakterien auf der einen Seite und Abwehrmechanismen, die möglicherweise durch aus dem Nahrungsmittel Milch gewonnene Proteine auf der anderen Seite unterstützt werden, könnte die nachgewiesene Wechselwirkung von Fleisch- und Milchaufnahme (UMC) für das Asthmarisiko erklären. Dies würde eine kohärente und einfache Begründung liefern, die mit dem Grundsatz der Einfachheit vereinbar ist, der von Natur aus attraktiver ist (53).

Wir haben zuvor eine Darm-Lungen-Achse beim Menschen postuliert, die durch Reifung des Darmmikrobioms unter Beteiligung kurzkettiger Fettsäuren mediiert wird (51). UMC war allerdings mit spezifischen Asthmarisikobakterien assoziiert, und wirkte sich unabhängig von der Darmreifung auf Asthma aus, wodurch über diesen Pfad eine zweite Komponente der „Darm-Lungen-Achse“ nahegelegt wird.

Obwohl die aktuelle Arbeit ohne direkte Messung des Eisens keinen endgültigen Beweis für diese Hypothese liefern kann, könnte der hier vorgestellte Befund über seine Bedeutung für die öffentliche Gesundheit hinaus für ein tieferes Verständnis der Asthma-Pathogenese wichtig sein und zu weiterer Forschung sowie der Entwicklung neuartiger präventiver Ansätze anregen. Die postulierte Wirkung eines mikrobiellen Ungleichgewichts auf eisenfressende Darmbakterien kann zu einer langfristigen Immundysfunktion und einer unterschweligen Entzündung führen, die an Asthma, Fettleibigkeit, entzündlichen Darmerkrankungen und weiteren nachteiligen metabolischen Zuständen beteiligt ist (54).



### 3.1.4 Bewertung des LCA-basierten Analyseansatzes der frühkindlichen Ernährung

Die latente Klassenanalyse (LCA) bietet einen datengesteuerten Ansatz, um nicht direkt beobachtbare Faktoren hinter messbaren Variablen aufzudecken (2). Daher haben wir diesen Ansatz verwendet, um eine unvoreingenommene Analyse des komplexen Phänomens der Einführung fester Nahrungsmittel im ersten Lebensjahr durchzuführen.

Obwohl die Tagebücher keine Informationen über die Portionsgröße oder das Gewicht der Lebensmittel enthielten, deckten sie Informationen über die Häufigkeit der Fütterung von monatlich über wöchentlich bis täglich ab. Diese Informationen waren besonders hilfreich, da sie auch eine Differenzierung der Fütterungsmuster nach Intensität ermöglichten. Dementsprechend konnte, ähnlich wie bei den Atopie-Phänotypen, mittels der LCA eine multidimensionale Integration und Analyse der drei Ebenen „Intensität“, „zeitlicher Verlauf“, und der einzelnen Lebensmittelgruppen als „Spezifität“, in das Konstrukt bzw. latente Phänomen „Nahrungsmittelführung im ersten Lebensjahr“ durchgeführt werden.

Besonders bemerkenswert ist, dass der hypothesenfreie, explorative Ansatz der latenten Klassenanalyse am Beispiel der Modellierung eines komplexen, verhaltensbezogenen Musters aus dem Bereich des Ernährungsverhaltens ein genuines, latentes Phänomen von hoher gesundheitswissenschaftlicher Relevanz zu Tage gebracht hat, das kaum zu erwarten war. Dementsprechend gibt es in der wissenschaftlichen Literatur noch kein Beispiel dafür, und es wäre hypothesenbasiert kaum zu finden bzw. schwer zu operationalisieren gewesen. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass das eigentliche entdeckte Phänomen UMC eine Wechselwirkung, bzw. „Interaktion höherer Ordnung“ darstellt, die die LCA durch ihren integrativen Ansatz implizit miteinbezieht, und die zur Komplexität des Phänomens und zu seiner Unvorhersehbarkeit ein weiteres beiträgt. Erfreulich war, dass es sich dann von Hand operationalisiert im Wechselspiel mit der „Random Forest“ – Modellierung in seiner Bedeutsamkeit für die Prädiktion des Asthmarisikos im frühen Schulalter validieren ließ, und somit neue Denk- und Forschungsansätze für die das menschliche Mikrobiom miteinbeziehende Ernährungswissenschaft liefert.

## 4 Zusammenfassung

Die latente Klassenanalyse (LCA) ist ein statistisches, datengetrieben-exploratives Clusterverfahren für die integrative Betrachtung komplexer, latenter Phänomene hinter messbaren Variablen und impliziert verschiedene Vorteile gegenüber hypothesengetriebenen Subgruppenanalysen. Somit ist sie auf dem Gebiet der Asthma- und Allergieforschung prädestiniert, um jenseits etablierter Taxonomien neue oder präzisere (Expositions-)muster oder klinisch relevante Phänotypen zu eruieren, die in der medizinischen Praxis und im Public Health-Kontext für ein tieferes ätiologisches Verständnis des Krankheitsbildes, und darauf aufbauend für die Entwicklung maßgeschneiderter Präventions- und Therapieansätze, Bedeutung gewinnen könnten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird auf zwei Studien eingegangen, die mittels einer LCA versuchten, Atopie im Vorschulalter zu phänotypisieren. Atopie ist eine übersteigerte IgE-vermittelte Immunantwort und atopisches Asthma im Kindesalter eine der häufigsten Erkrankungen mit hoher Krankheitslast, trotzdem bleibt die Wechselbeziehung beider Phänomene unklar, möglicherweise, weil beide Zustände aus einer Vielzahl von individuellen Pathologien mit komplexen Interferenzen resultieren können.

Die Integration der Dimensionen Stärke, Spezifität, und Verlauf atopischer Sensibilisierung erbrachte in vier unabhängigen Populationen quantitativ und qualitativ vergleichbare, genuine Klassen. In Bezug auf das Risiko damit assoziierter allergischer Erkrankungen waren dies gutartige, symptomatische und schwere Atopie-Phänotypen, die auch eine spezifischere Risiko-Stratifikation als klinisch etablierte Einteilungen zeigten.

Der schwere Phänotyp („severe atopy“) trat als latenter Zustand mit Anzeichen einer dysbalancierten Immunantwort hervor. Das sehr hohe Risiko für Asthma und weitere atopische Erkrankungen wurde vermittelt durch übermäßige sIgE-Produktion und sehr hohe Gesamt- und spezifische IgE-Werte im Alter von 5 bzw. 6 Jahren, insbesondere auf saisonale Allergene. Zudem erklärte dieser Phänotyp direkt, und nicht das mit diesem stark assoziierte Asthma, die eingeschränkte Lungenfunktion betroffener Kinder.

Als anfällig für Umweltfaktoren erwies sich der inhalativ-symptomatische Phänotyp, dessen Größe mitbestimmend für unterschiedliche Prävalenzen atopischer Erkrankungen in ungleich entwickelten Ländern war. Die differentiellen Assoziationen der latenten Klassen mit atopischen Erkrankungen und genetischer T1D-Anfälligkeit könnten auf unterschiedliche immunologische Mechanismen hinweisen, die die verschiedenen Formen der Atopie mit Allergie und Autoimmunität verbinden.

Mögliche Ansätze in Richtung Früherkennung und Therapie könnten dabei etwa ein frühes Screening des inkrementellen IgE-Anstieges, als auch den frühen gezielten und spezifischen Einsatz von Anti-IgE-Therapien umfassen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird eine Studie vorgestellt, in der wir durch die systematische Beurteilung der Fütterungsmuster im ersten Lebensjahr mittels einer LCA eine Konstellation von übermäßigem Fleischkonsum auf Kosten anderer Proteinquellen („unbalanced meat consumption“/UMC) in zwei unabhängigen Geburtskohorten entdeckten, die durch ein wesentlich erhöhtes Asthmarisiko im Schulalter gekennzeichnet war und sich auch auf objektive Lungenfunktionsparameter auswirkte.

Mit Hilfe von Mikrobiomanalysen identifizierten wir den bakteriellen Eisenstoffwechsel als wahrscheinlichen Faktor für das gesundheitsschädliche Phänomen. Das Zusammenspiel zwischen aus der Nahrung zugeführtem Eisen und übermäßigem Wachstum potenziell nachteiliger Bakterien auf der einen Seite und Abwehrmechanismen, die möglicherweise durch aus dem Nahrungsmittel Milch gewonnene Proteine auf der anderen Seite unterstützt werden, könnte die nachgewiesene Wechselwirkung von Fleisch- und Milchaufnahme (UMC) für das Asthmarisiko erklären. Somit liefert diese Studie neue Denk- und Forschungsansätze für die das menschliche Mikrobiom miteinbeziehende Ernährungswissenschaft.

Zusammengenommen haben wir in zwei Studien den Ansatz der latenten Klassenanalyse verwendet, um unvoreingenommen die komplexen, latenten Phänomene „Atopie im Vorschulalter“ und „Stile der Nahrungsmiteinführung im ersten Lebensjahr“ zu analysieren. Die so mögliche Integration verschiedener Dimensionen dieser Konstrukte unter Einbeziehung möglicher Interaktionen höherer Ordnung erbrachte jeweils genuine Muster bzw. Phänotypen aus dem immunologischen und ernährungswissenschaftlichen Gebiet, die von hoher klinischer und gesundheitswissenschaftlicher Bedeutsamkeit für Asthma und andere atopische Erkrankungen sind.

## 5 Abstract (English)

Latent class analysis (LCA) is a statistical, data-driven exploratory cluster method for the integrative examination of complex, latent phenomena behind measurable variables and implies various advantages over hypothesis-driven subgroup analyses. Thus, in the field of asthma and allergy research, it is predestined to determine new or more precise (exposure) patterns or clinically relevant phenotypes beyond established taxonomies. These could gain importance in medical practice and in the public health context for a deeper etiological understanding of the clinical picture, and based on this for the development of tailor-made prevention and therapeutic approaches.

The first part of this thesis deals with two studies that tried to constitute atopy phenotypes in preschool age by means of an LCA. Atopy is an exaggerated IgE-mediated immune response and atopic childhood asthma is one of the most common diseases with a high disease burden. Nonetheless, the interrelationship of the two phenomena remains unclear, possibly because both conditions can result from a variety of individual pathologies with complex interference.

The integration of the dimensions strength, specificity, and course of atopic sensitization yielded quantitatively and qualitatively comparable, genuine classes in four independent populations. In terms of the risk of associated allergic diseases, these were benign, symptomatic and severe atopy phenotypes, which also showed a more specific risk stratification than clinically established classifications.

The severe phenotype ("severe atopy") emerged as a latent condition with signs of a dysbalanced immune response. The very high risk of asthma and other atopic diseases was mediated by excessive sIgE production and very high total and specific IgE levels at preschool age, especially for seasonal allergens. In addition, this phenotype directly, and not the asthma strongly associated with it, explained the impaired lung function of affected children.

The size of the symptomatic phenotype including inhalant allergens proved to be susceptible to environmental factors and determined different prevalences of atopic diseases in unequally developed countries. The distinctive relations of the latent classes with atopic conditions and genetic predisposition to T1D may imply different immunological mechanisms that link the different expressions of atopy to allergic and autoimmune entities (19, 20).

Possible approaches in the direction of early detection and therapy could include, for example, an early screening of the incremental IgE increase, as well as the early targeted and specific use of anti-IgE therapies.

In the second part of this scientific work we present a study in which, by systematically evaluating solid food introduction styles in the first year of life by means of a LCA, we unraveled the hitherto unknown phenomenon of "unbalanced meat consumption/UMC" in two independent birth cohorts. Children fed this way obtained their dietary iron by daily meat intake, but not by other protein sources like milk and yogurt. They developed respiratory limitations like asthma and restricted lung function at school age with a much higher probability as compared to children with an even consumption of these foods.

Immersing into the microbiome, we found an accretion of conceivably unfavourable bacteria prodding to iron metabolism being involved in this health disorder. Dietary milk-derived proteins might prevent that in the sense of an interactive counterplay, get together explaining biologically "UMC". Thus, this study provides new intellectual and scientific approaches for nutritional research involving the human microbiome (48).

Taken together, in two studies, we used the latent class analysis approach to analyze the complex, latent phenomena of "atopy in preschool age" and "styles of solid food introduction in the first year of life" in an unbiased way. The possibility to integrate different dimensions of these constructs, including potential interactions of higher order, yielded genuine patterns or phenotypes from the fields of immunological and nutritional science, which are of high clinical and public health importance for a deeper understanding of asthma and other atopic diseases.

## **6 Publikation 1 mit Eigenanteil am Manuskript:**

### **„Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts”**

(Originalarbeit)

Dieses Paper wurde publiziert von:

**Hose, A. J.**, Depner, M., Illi, S., Lau, S., Keil, T., Wahn, U., Fuchs, O., Pfefferle, P. I., Schmaußer-Hechfellner, E., Genuneit, J., Lauener, R., Karvonen, A. M., Roduit, C., Dalphin, J.-C., Riedler, J., Pekkanen, J., von Mutius, E., Ege, M. J., MAS; PASTURE study groups.

In: **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 2017 Jun; 139(6):1935-1945.

DOI: 10.1016/j.jaci.2016.08.046.

### **Eigenanteil an diesem Manuskript:**

- Statistische Analysen
- Interpretation und kritische Diskussion der Ergebnisse
- Mitverfassen des Manuskriptes /Verfassen der ersten Manuskriptversion

## **7 Publikation 2 mit Eigenanteil am Manuskript:**

### **„Development of atopic sensitization in Finnish and Estonian children: A latent class analysis in a multicenter cohort”**

(Originalarbeit)

Dieses Paper wurde publiziert von:

Schmidt, F., **Hose, A. J.**, Müller-Rompa, S., Brick, T., Hämäläinen, A. M., Peet, A., Tillmann, V., Niemelä, O., Siljander, H., Knip, M., Weber, J., von Mutius, E., Ege, M. J.; DIABIMMUNE Study Group.

In: **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 2019 May; 143(5):1904-1913.

DOI: 10.1016/j.jaci.2018.12.1014.

### **Eigenanteil an diesem Manuskript:**

- Statistische Analysen
- Interpretation und kritische Diskussion der Ergebnisse
- Mitverfassen des Manuskriptes /Verfassen der ersten Manuskriptversion

## **8 Publikation 3 mit Eigenanteil am Manuskript:**

### **„Excessive Unbalanced Meat Consumption in the First Year of Life Increases Asthma Risk in the PASTURE and LUKAS2 Birth Cohorts”**

(Originalarbeit)

Dieses Paper wurde publiziert von:

**Hose, A. J.**, Pagani, G., Karvonen, A. M., Kirjavainen, P. V., Roduit, C., Genuneit, J., Schmaußer-Hechfellner, E., Depner, M., Frei, R., Lauener, R., Riedler, J., Schaub, B., Fuchs, O., von Mutius, E., Divaret-Chauveau, A., Pekkanen, J., and Ege, M. J. on behalf of PASTURE Study Group.

In: **Frontiers in Immunology** 2021 April; 12:651709.

DOI: 10.3389/fimmu.2021.651709.

#### **Eigenanteil an diesem Manuskript:**

- Statistische Analysen
- Interpretation und kritische Diskussion der Ergebnisse
- Mitverfassen des Manuskriptes /Verfassen der ersten Manuskriptversion



## 9 Literaturverzeichnis

1. Mori M, Krumholz HM, Allore HG. Using Latent Class Analysis to Identify Hidden Clinical Phenotypes. *Jama*. 2020;324(7):700-1.
2. Lanza ST, Rhoades BL. Latent class analysis: an alternative perspective on subgroup analysis in prevention and treatment. *Prev Sci*. 2013;14(2):157-68.
3. Berlin KS, Williams NA, Parra GR. An introduction to latent variable mixture modeling (part 1): overview and cross-sectional latent class and latent profile analyses. *J Pediatr Psychol*. 2014;39(2):174-87.
4. Collins LM, Lanza ST. Latent class and latent transition analysis: With applications in the social, behavioral, and health sciences. New York: Wiley; 2010.
5. Goodman LA. Exploratory latent structure analysis using both identifiable and unidentifiable models. *Biometrika*. 1974;61:215–31.
6. Lazarsfeld PF, Henry NW. Latent structure analysis. Boston, MA: Houghton Mifflin; 1968.
7. Cole DA, Preacher KJ. Manifest variable path analysis: potentially serious and misleading consequences due to uncorrected measurement error. *Psychol Methods*. 2014;19(2):300-15.
8. McLachlan GJ, Peel D. Finite Mixture Models. New York: Wiley; 2000a.
9. MacCallum RC, Zhang S, Preacher KJ, Rucker DD. On the practice of dichotomization of quantitative variables. *Psychol Methods*. 2002;7(1):19-40.
10. DiStefano C, Kamphaus RW. Investigating Subtypes of Child Development: A Comparison of Cluster Analysis and Latent Class Cluster Analysis in Typology Creation. *Educational and Psychological Measurement*. 2006;66(5):778-94.
11. Muthén L, Muthén B. Mplus User's Guide, 8th Edn. Los Angeles, CA 1998-2017.
12. Petersen KJ, Qualter P, Humphrey N. The Application of Latent Class Analysis for Investigating Population Child Mental Health: A Systematic Review. *Front Psychol*. 2019;10:1214.
13. Bauer DJ, Curran PJ. Distributional assumptions of growth mixture models: implications for overextraction of latent trajectory classes. *Psychol Methods*. 2003;8(3):338-63.
14. Lenzenweger MF. Consideration of the challenges, complications, and pitfalls of taxometric analysis. *J Abnorm Psychol*. 2004;113(1):10-23.
15. Sterba SK, Bauer DJ. Matching method with theory in person-oriented developmental psychopathology research. *Dev Psychopathol*. 2010;22(2):239-54.
16. van de Schoot R, Sijbrandij M, D. WS, Depaoli S, Vermunt JK. The GRoLTS-Checklist: Guidelines for Reporting on Latent Trajectory Studies. *Structural Equation Modeling: A Multidisciplinary Journal*. 2017;24(3):451-67.
17. Bauer DJ, Curran PJ. The integration of continuous and discrete latent variable models: potential problems and promising opportunities. *Psychol Methods*. 2004;9(1):3-29.
18. Miettunen J, Nordstrom T, Kaakinen M, Ahmed AO. Latent variable mixture modeling in psychiatric research--a review and application. *Psychol Med*. 2016;46(3):457-67.
19. Hose AJ, Depner M, Illi S, Lau S, Keil T, Wahn U, et al. Latent class analysis reveals clinically relevant atopy phenotypes in 2 birth cohorts. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;139(6):1935-45 e12.

20. Schmidt F, Hose AJ, Mueller-Rompa S, Brick T, Hamalainen AM, Peet A, et al. Development of atopic sensitization in Finnish and Estonian children: A latent class analysis in a multicenter cohort. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2019;143(5):1904-13 e9.
21. Scheuermann RH, Ceusters W, Smith B. Toward an ontological treatment of disease and diagnosis. *Summit Transl Bioinform*. 2009;2009:116-20.
22. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *The New England journal of medicine*. 2006;355(21):2226-35.
23. Lemanske RF, Jr., Busse WW. 6. Asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(2 Suppl):S502-19.
24. Müller-Rompa SEK. Assoziation von Asthma bronchiale im Kindesalter mit Umweltexpositionen: von mikrobieller Exposition bis zu Wohnortfaktoren Dissertation (Humanbiologie). 2019;LMU München.
25. Cookson WO. Asthma genetics. *Chest*. 2002;121(3 Suppl):7S-13S.
26. Henderson J, Granell R, Heron J, Sherriff A, Simpson A, Woodcock A, et al. Associations of wheezing phenotypes in the first 6 years of life with atopy, lung function and airway responsiveness in mid-childhood. *Thorax*. 2008;63(11):974-80.
27. Depner M, Fuchs O, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvarinen A, Kaulek V, et al. Clinical and epidemiologic phenotypes of childhood asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(2):129-38.
28. Verschoor D, von Gunten S. Allergy and Atopic Diseases: An Update on Experimental Evidence. *International archives of allergy and immunology*. 2019;180(4):235-43.
29. Haftenberger M, Laussmann D, Ellert U, Kalcklosch M, Langen U, Schlaud M, et al. [Prevalence of sensitisation to aeroallergens and food allergens: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):687-97.
30. Belgrave DC, Granell R, Simpson A, Guiver J, Bishop C, Buchan I, et al. Developmental profiles of eczema, wheeze, and rhinitis: two population-based birth cohort studies. *PLoS medicine*. 2014;11(10):e1001748.
31. Froidure A, Mouthuy J, Durham SR, Chanez P, Sibille Y, Pilette C. Asthma phenotypes and IgE responses. *The European respiratory journal*. 2016;47(1):304-19.
32. Tan DJ, Walters EH, Perret JL, Burgess JA, Johns DP, Lowe AJ, et al. Clinical and functional differences between early-onset and late-onset adult asthma: a population-based Tasmanian Longitudinal Health Study. *Thorax*. 2016;71(11):981-7.
33. Comberiati P, Di Cicco ME, D'Elisio S, Peroni DG. How Much Asthma Is Atopic in Children? *Front Pediatr*. 2017;5:122.
34. Oksel C, Custovic A. Development of allergic sensitization and its relevance to paediatric asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2018;18(2):109-16.
35. Depner M, Ege MJ, Genuneit J, Pekkanen J, Roponen M, Hirvonen MR, et al. Atopic sensitization in the first year of life. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(3):781-8.
36. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *The New England journal of medicine*. 1989;320(5):271-7.
37. Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Niggemann B, Sommerfeld C, et al. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(5):709-14.
38. Simpson A, Tan VY, Winn J, Svendsen M, Bishop CM, Heckerman DE, et al. Beyond atopy: multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(11):1200-6.

39. von Mutius E, Schmid S, Group PS. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. 2006;61(4):407-13.
40. Bergmann RL, Bergmann KE, Lau-Schadendorf S, Luck W, Dannemann A, Bauer CP, et al. Atopic diseases in infancy. The German multicenter atopy study (MAS-90). *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 1994;5(6 Suppl):19-25.
41. Wlasiuk G, Vercelli D. The farm effect, or: when, what and how a farming environment protects from asthma and allergic disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2012;12(5):461-6.
42. Garn H, Potaczek DP, Pfefferle PI. The Hygiene Hypothesis and New Perspectives-Current Challenges Meeting an Old Postulate. *Frontiers in immunology*. 2021;12:637087.
43. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax*. 2000;55 Suppl 1:S2-10.
44. Pfefferle PI, Keber CU, Cohen RM, Garn H. The Hygiene Hypothesis - Learning From but Not Living in the Past. *Frontiers in immunology*. 2021;12:635935.
45. Dziak JJ, Coffman DL, Lanza ST, Li R, Jermini LS. Sensitivity and specificity of information criteria. *Brief Bioinform*. 2020;21(2):553-65.
46. Paller AS, Spergel JM, Mina-Osorio P, Irvine AD. The atopic march and atopic multimorbidity: Many trajectories, many pathways. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2019;143(1):46-55.
47. von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;149(2 Pt 1):358-64.
48. Hose AJ, Pagani G, Karvonen AM, Kirjavainen PV, Roduit C, Genuneit J, et al. Excessive Unbalanced Meat Consumption in the First Year of Life Increases Asthma Risk in the PASTURE and LUKAS2 Birth Cohorts. *Frontiers in immunology*. 2021;12:651709.
49. Brick T, Hettinga K, Kirchner B, Pfaffl MW, Ege MJ. The Beneficial Effect of Farm Milk Consumption on Asthma, Allergies, and Infections: From Meta-Analysis of Evidence to Clinical Trial. *The journal of allergy and clinical immunology In practice*. 2020;8(3):878-89 e3.
50. Brick T, Schober Y, Bocking C, Pekkanen J, Genuneit J, Loss G, et al. omega-3 fatty acids contribute to the asthma-protective effect of unprocessed cow's milk. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016;137(6):1699-706 e13.
51. Depner M, Taft DH, Kirjavainen PV, Kalanetra KM, Karvonen AM, Peschel S, et al. Maturation of the gut microbiome during the first year of life contributes to the protective farm effect on childhood asthma. *Nature medicine*. 2020;26(11):1766-75.
52. Roduit C, Frei R, Depner M, Schaub B, Loss G, Genuneit J, et al. Increased food diversity in the first year of life is inversely associated with allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(4):1056-64.
53. Feldman J. The simplicity principle in perception and cognition. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*. 2016;7(5):330-40.
54. Haahtela T, von Hertzen L, Anto JM, Bai C, Baigenzhin A, Bateman ED, et al. Helsinki by nature: The Nature Step to Respiratory Health. *Clinical and translational allergy*. 2019;9:57.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. von Mutius für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die generelle Gelegenheit zur Promotion, als auch bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Markus J. Ege bedanken. Dieser stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für statistisch wie inhaltlich kreativ-inspirativen Austausch. Dies geschah auch gerne in einem ernährungswissenschaftlich relevanten Kontext beim „Business-Brunch“, wie auch ab und an zu abseitigen wie originellen, und somit auch im philosophischen Sinne „atopischen“ Themen.

Darüber hinaus gilt mein Dank auch jenen weiteren Menschen in meinem Arbeitsumfeld, die mich fachlich wie menschlich inspiriert und weitergebracht haben, ich hoffe ich habe das jedem gegenüber, den ich hiermit meine, schon auch einmal persönlich zum Ausdruck gebracht.

Mein allergrößter Dank gilt nicht zuletzt jedem Mitglied meiner Familie, meiner Frau für ihre Unterstützung in Form ihres bewundernswerten Da-Seins, wie meinen Töchtern, die meine Arbeit mit Neugierde begleiten und immer eine Quelle zusätzlicher Kraft sind. Die beiden Kater haben mich gelehrt Grenzen zu setzen, indem sie sich beizeiten gerne schnurrend auf die Tastatur plazierten, und mich somit manchmal zur selbstschützenden Aufgabe des Tagwerks zwangen. Einen liebenden, besonderen Dank möchte ich auch Mutter widmen, die uns in dieser Zeit nur physisch verlassen hat, und die mich gelehrt hat, schwere Momente zu überwinden, indem man sie nimmt, wie sie sind, und positiv nach vorne schaut.