

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

**Die Rolle von SOCS3-Polymorphismen bei Asthma bronchiale
im Kindesalter**

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

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Stephanie Harabacz
aus
München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. Michael Kabesch
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. B. Przybilla Priv. Doz. Dr. A. Faußner
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	24.05.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	1
<hr/>	
1.1	1
1.2	3
1.2.1	8
1.2.2	13
2	17
<hr/>	
2.1	17
2.1.1	17
2.1.1.1	17
2.1.2	18
2.1.2.1	18
2.1.2.2	19
2.1.2.3	19
2.1.2.4	19
2.1.3	20
2.2	21
2.2.1	25
2.3	27
2.4	28
2.5	28
2.6	30
2.7	31
2.8	31
2.9	32
2.10	33
2.10.1	33
2.10.2	34
2.10.3	34
2.10.4	35
2.10.5	35
2.10.6	36
2.10.7	36

2.11	Statistische Auswertung	37
2.11.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	37
2.11.2	Assoziationsstudien.....	39
2.11.2.1	Auswertung von kategorischen Variablen	39
2.11.2.2	Auswertung von kontinuierlichen Variablen	40
3	<u>ERGEBNISSE</u>	41
3.1	Mutationscreening	41
3.1.1	Identifikation der Polymorphismen (MAF > 0.03)	42
3.1.2	Identifikation der Mutationen (MAF < 0.03).....	47
3.1.3	Linkage Disequilibrium der SOCS3-Polymorphismen	48
3.2	Assoziationsstudie.....	49
3.2.1	Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP G1051A.....	52
3.2.2	Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP G1267A.....	54
3.2.3	Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP C1384T	55
3.2.4	Haplotypanalyse	59
3.3	Phylogenetische Untersuchung.....	61
3.3.1	Phylogenetischer Vergleich Mensch – Maus – Hund.....	61
3.3.2	Vergleichende Sequenzanalyse der Primatenspezies	62
3.4	Insilico-Analyse (Mat-Inspector- bzw. FastSNP-Untersuchung).....	66
3.4.1	MatInspector-Ergebnisse für SNP C-920A	67
3.4.2	MatInspector/FastSNP-Ergebnisse für SNP G1051A	67
3.4.3	MatInspector/FastSNP-Ergebnisse für SNP G1267A	68
3.4.4	MatInspector/FastSNP-Ergebnisse für SNP C1384T	68
4	<u>DISKUSSION</u>	71
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	83
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	85
7	<u>ANHANG</u>	95
7.1	Geräte.....	95
7.2	Computerprogramme.....	96
7.2.1	Pipettierroboter	96
7.2.2	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	96
7.2.3	Sequenzierung	96
7.2.4	Primer und PCR-Bedingungen	96
7.2.5	Analyse genomischer DNA-Sequenzen	96
7.2.6	Datenbanken aus dem Internet.....	97
7.2.7	Statistische Programme	97

7.3	Puffer, Lösungen, Reagenzien	97
7.3.1	Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Extraktion.....	97
7.3.2	Puffer, Lösungen, Reagenzien für die PCR.....	97
7.3.3	Puffer, Lösungen, Reagenzien für die Sequenzierung.....	98
7.3.4	Puffer, Lösungen, Reagenzien für die MALDI-TOF	98
7.3.5	Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Gelelektrophorese	98
7.4	Reaktionskits	99
7.4.1	PCR-Aufreinigung	99
7.4.2	Sequenzierkits.....	99
7.4.3	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	99
7.5	Enzyme.....	99
7.5.1	Polymerasen	99
7.5.2	sonstige Enzyme	99
7.6	Primer	100
7.6.1	PCR-Primer	100
7.6.2	PEP-Primer	100
7.6.3	Sequenzier-Primer.....	100
7.6.4	MALDI-TOF-Primer.....	100
7.7	Sonstige Materialien	100

DANKSAGUNG **101**

LEBENS LAUF **103**

1 EINLEITUNG

1.1 Asthma im Kindesalter

Asthma bronchiale ist charakterisiert durch anfallsweises Auftreten von Atemnot infolge bronchialer Hyperreagibilität und reversibler Atemwegsobstruktion, begleitet von chronischer Entzündung der Atemwege. Die Krankheit, von der in Westeuropa und den USA ca. fünf Prozent der erwachsenen Bevölkerung und ca. zehn Prozent der Kinder betroffen sind, kann sich in jedem Lebensalter manifestieren, vor allem aber beginnt sie im Kindesalter: Mehr als die Hälfte aller Patienten erkrankt vor dem 10. Lebensjahr. Bei 80 Prozent der kindlichen Asthmatiker manifestiert sich die Erkrankung bis zum 1. Schuljahr, bei 45 Prozent bereits im 1. Lebensjahr.

Eine kausale Ursache für die Entstehung von Asthma konnte bislang nicht eindeutig gefunden werden. Vielmehr handelt es sich um eine komplexe Erkrankung, deren Entstehung multifaktoriell erklärt wird. Zwar sind Auslöser für einen Asthma-Anfall eindeutig beschrieben (es handelt sich hierbei um allergische, pharmakologische, umweltbedingte, infektiöse und emotionale Auslöser), doch die Ursachen sind vielfältig. Die Tatsache, dass die individuelle genetische Prädisposition und unterschiedliche Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen, lässt auf eine Vielzahl kausaler Faktoren schließen und erklärt die große Variabilität in der Expression der Erkrankung.

Das typische klinische Bild wird durch die unterschiedlich stark ausgeprägte expiratorische Dyspnoe bestimmt. Oft ist eine obstruktive Bronchitis die erste Asthma-manifestation bei Kleinkindern, die allerdings nur bei 15 bis 30 Prozent aller Patienten später tatsächlich in Asthma bronchiale übergeht. In vielen Fällen verliert sich die Neigung zur Entwicklung einer obstruktiven Bronchitis mit dem Älterwerden, da sich das Bronchialsystem des Kindes, das in den ersten drei Lebensjahren noch prädisponiert ist für die Entwicklung infektassoziierter Atemwegsobstruktionen, im Laufe der Zeit anatomisch und funktionell weiterentwickelt. Die Auswirkungen der Erkrankung auf das betroffene Kindes variieren von wenig belastenden Symptomen wie leichtem

Giemen bis hin zum Bild eines schwerkranken Kindes. Auch ein anfallsweiser Reizhusten, der vor allem in bestimmten Umweltsituationen wie Temperaturwechsel, körperlicher Belastung oder bei Luftverschmutzung auftritt, kann eine klinische Erscheinungsform des Asthma bronchiale darstellen.

Ein angehender Asthmaanfall macht sich meist durch unproduktiven Husten und ein Engegefühl in der Brust bemerkbar, begleitet von einer sich oft bis zur bedrohlichen Atemnot steigenden expiratorischen Dyspnoe. Der Thorax ist überbläht und durch die heftigen Atemanstrengungen kann es zu Einziehungen bei der Einatmung kommen. Auskultatorisch können pfeifende, giemende und brummende Geräusche zu hören sein, mitunter auch klingende Rasselgeräusche. Am Ende des Anfalls kommt es häufig zu Husten mit zähem, glasigem Schleim, der expektoriert wird. Mitunter treten im Rahmen eines Asthmaanfalls auch Atelektasen und in der Folge Mukostasen auf.

Pathophysiologisch entsteht die Atemnot des Patienten durch Obstruktion der Atemwege. Diese wird ausgelöst durch Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur mit Hyperämie, Ödem und entzündlicher Infiltration der Schleimhaut mit Verstopfung der Atemwege durch Schleim und abgelöste Bronchialepithelzellen. Grundlage der Obstruktion ist eine bronchiale Hyperreaktivität, die durch verschiedene Faktoren hervorgerufen wird. Für den kindlichen Asthmatiker sind in diesem Zusammenhang vor allem Allergenkontakte (zum Beispiel mit Hausstaub, Tierhaaren, Pollen), Atemwegsinfekte und körperliche Belastung von Bedeutung. Diese Faktoren führen innerhalb weniger Minuten zur akuten Bronchialobstruktion, die beim allergischen Asthma durch eine Allergie vom Soforttyp ausgelöst wird. Diese Sofortreaktion wird durch die Bindung des jeweiligen Antigens an ein spezifisches IgE auf der Zelloberfläche von Mastzellen oder Basophilen ausgelöst. Daraufhin kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Histamin oder Prostaglandinen. Diese führen zum Bronchospasmus, also einer Verringerung des Bronchiallumens aufgrund Kontraktion der glatten Muskulatur, und zu erhöhter Durchlässigkeit der Kapillaren mit nachfolgender Schleimhautschwellung. Diese unmittelbare Reaktion kann auch durch IgE unabhängige Mastzelldegranulierung ausgelöst werden, etwa durch kalte Luft oder chemische Stoffe.

Sechs bis acht Stunden nach Allergenkontakt schließt sich die Spätreaktion an. Diese ist dadurch charakterisiert, dass die bei der Mastzelldegeneration freigesetzten

Entzündungsmediatoren die Rekrutierung von Entzündungszellen (Leukozyten, Makrophagen, etc.) einleiten; diese setzen wiederum eigene Mediatoren frei und erhalten dadurch den Entzündungsprozess aufrecht. Es kommt also zur massiven Schleimhautinfiltration mit entzündlichen Reaktionen wie Hyperämie, Ödemen der Bronchialwände und Stau von zähem Sekret mit der Folge einer obstruktiven Ventilationsstörung. Diese zeigt sich in erhöhtem Atemwegswiderstand, vermindertem forcierten Expirationsvolumen und reduzierten expiratorischen Flussraten (39).

1.2 Immunologische und genetische Grundlagen der Asthmaerkrankung

IgE-Antikörper spielen bei vielen Formen des Asthma bronchiale eine zentrale Rolle. Die allergische, IgE vermittelte Reaktion gegen ubiquitäre Allergene verursacht jedoch nicht nur die Entstehung von Asthma, sondern auch die von anderen atopischen Erkrankungen wie Heuschnupfen und Neurodermitis, die häufig mit Asthma vergesellschaftet sind.

Auch im Falle von Neurodermitis lösen Allergene (zum Beispiel Nahrungsmittel, Hitze, Bakterien, etc.) eine lokale IgE-Produktion in der Haut aus. Anschließend kommt es zu einer komplexen zellulären Entzündungsreaktion. Daran beteiligt sind vor allem die antigenpräsentierenden Zellen der Haut (Langerhans-Zellen), die über ihre IgE-Rezeptoren IgE-Allergen-Komplexe binden und T-Zellen präsentieren. Dadurch wird eine T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion ausgelöst, an der verschiedene Zelltypen, wie zum Beispiel Eosinophile und Mastzellen, beteiligt sind.

Das Vorhandensein einer atopischen Veranlagung, also die erhöhte Wahrscheinlichkeit atopische Erkrankungen wie allergisches Asthma oder Neurodermitis zu entwickeln, lässt sich durch das positive Ergebnis eines Hauttests belegen (zur Durchführung des Haut-Prick-Tests siehe 2.1.2.2.).

Eine zentrale Rolle bei der IgE-Regulation und anderen atopietypischen Immunreaktionen spielt das T-Helferzellsystem, dessen Entwicklung und Differenzierung schon in sehr früher Kindheit, vor allem innerhalb des ersten Lebensjahres, abläuft (3). Im Rahmen der T-Zelldifferenzierung werden naive T-Zellen, so genannte TH0-Zellen, über bestimmte Antigene, die von antigenpräsentierenden Zellen an die T-Zellen

herangebracht werden, zur Differenzierung angeregt. Dabei fungiert die Anwesenheit von Allergenen als Stimulus für die Differenzierung zu TH2-Zellen (T-Helfer-2-Zellen); Viren und Bakterien hingegen führen zur Differenzierung zu TH1-Zellen.

Im Verlauf der Entwicklung allergischer Erkrankungen aktivieren TH2-Zellen die allergenspezifische Produktion von IgE-Antikörpern durch B-Zellen, die ihrerseits Mastzellen zur Sekretion von proinflammatorischen Molekülen anregen (Histamine, Prostaglandine, etc.). Diese Substanzen leisten wichtige Beiträge zur bronchialen Sofortreaktion im Rahmen der Asthmaerkrankung.

Zusätzlich haben die TH2-Zellen das Potential, Mastzellen direkt zu aktivieren und darüber hinaus über Cytokine eosinophile Granulozyten zu stimulieren. Diese spielen bei der Spätreaktion, also der Aufrechterhaltung der Entzündung, eine entscheidende Rolle. Als Gegenspieler zur TH2-Reaktion wirken T-Helferzellen, die sich zu TH1-Zellen differenziert haben und die Produktion von IgE unterdrücken.

Ein Ungleichgewicht zu Gunsten der TH2-Zellen wird, wie in zahlreichen Untersuchungen dokumentiert, für die Entstehung, das Fortschreiten und die Aufrechterhaltung von Asthma bronchiale mitverantwortlich gemacht. Die TH2-Reaktion ist aber ebenso an der Entwicklung anderer atopischer Erkrankungen wie Heuschnupfen oder Neurodermitis beteiligt (40).

Um Einfluss auf die Regulation von Immunprozessen zu nehmen, schütten TH2-Zellen spezifische Cytokine (zum Beispiel IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) aus, die auch bei der Asthmaerkrankung hoch reguliert sind.

Dabei sind IL-4 und IL-13 nach heutigem Stand der Wissenschaft besonders wichtig für die Entstehung von Asthma bronchiale. Diese Cytokine sind sich in Struktur und Funktion sehr ähnlich. Sie stellen beide zentrale Faktoren der allergischen Immunreaktion dar und sind an vielen immunregulatorischen Funktionen beteiligt. Zum Beispiel sind sie für die Aktivierung von Mastzellen und Eosinophilen zuständig und üben damit einen entscheidenden Einfluss auf Entzündungsprozesse aus. Weiterhin führen sie zu einer vermehrten Expression von HLA-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen und fördern somit die Erkennung zahlreicher Allergene.

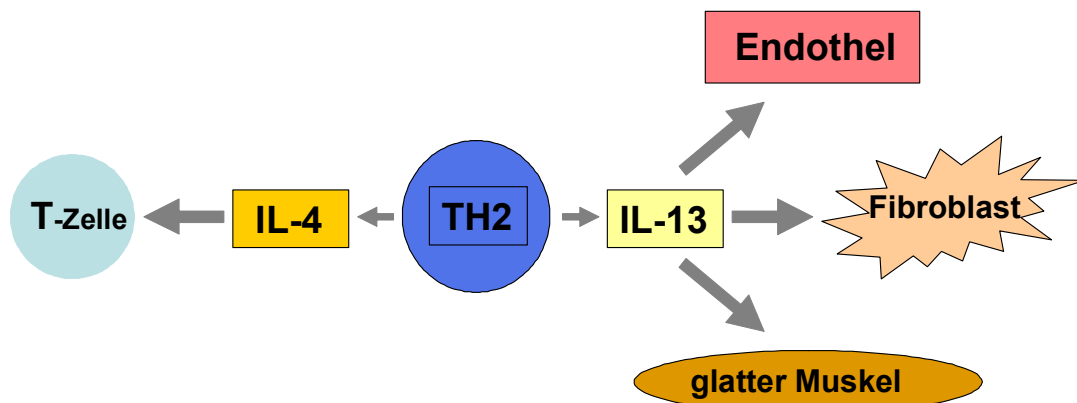
Allerdings bestehen auch deutliche Unterschiede bezüglich Herkunft und Wirkung von IL-4 und IL-13. So wird IL-4 sowohl von T-Zellen als auch von Mastzellen und Basophilen produziert, der IL-4-Rezeptor wird auf B- und T-Zellen exprimiert.

Die IL-13-Produktion findet ausschließlich in TH2-Zellen statt, der IL-13-Rezeptor fehlt auf T-Zellen, ist aber beispielsweise auf B-Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen ausgebildet.

Der Schwerpunkt der IL-4-Wirkung liegt in der Stimulation von T-Zellen zur Differenzierung zu TH2-Zellen. IL-4 spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der TH-2-gewichteten allergischen Immunantwort und der Produktion von IgE (46). Es ist dabei mitverantwortlich für den Klassenwechsel von IgM auf IgE, der durch Bindung an Oberflächenrezeptoren von TH2-Zellen ausgelöst wird.

Aufgrund des Fehlens des IL-13-Rezeptors auf den T-Zellen hat IL-13 keine Wirkung auf den T-Zell-Differenzierungsprozess (6). Stattdessen hemmt IL-13 die proinflammatorische Cytokinproduktion von Makrophagen und wirkt organ- und zelltypspezifisch besonders auf glatte Muskulatur, Endothelzellen und Fibroblasten der Atemwege (siehe Abb. 1.1). Es stimuliert unter anderem die Chemokinexpression von Endothelzellen und trägt zur Hypertrophie glatter Muskulatur bei. Im Bereich der Atemwege ist IL-13 damit mitverantwortlich für die Entstehung bronchialer Hyperreaktivität (17, 53, 54).

Abb. 1.1: Wirkungsschwerpunkte von IL-4 und IL-13



IL-4 und IL-13 wirken über dieselbe Signalkaskade, deren Rezeptor aus verschiedenen Elementen, den Rezeptorketten, aufgebaut ist. Die Rezeptoren der beiden Cytokine unterscheiden sich nur im Aufbau ihrer Ketten und deren unterschiedliche Bindungsfähigkeit.

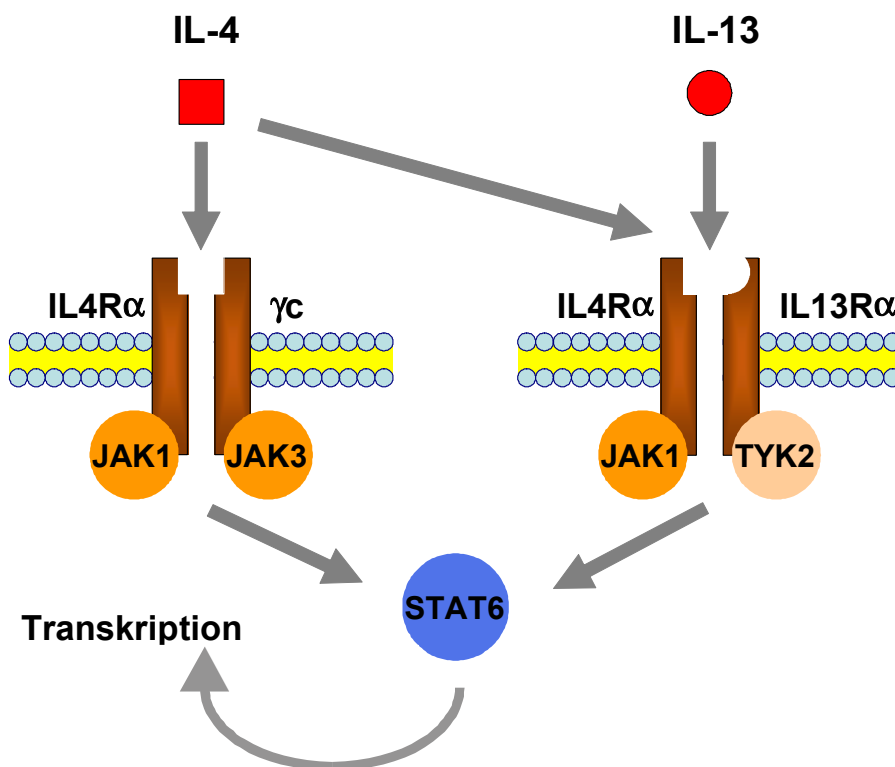
Der IL-4-Rezeptor (IL-4R) besteht aus einer γ -Kette und einer α -Kette (IL-4R α), der IL-13-Rezeptor stellt ein Heterodimer aus der gleichen IL-4R α -Kette und einer IL-13R α 1 Kette dar.

IL-4 bindet über die IL-4R α -Kette an beide Rezeptoren, wogegen IL-13 nur an der IL-13R α 1-Kette wirksam werden kann (siehe Abb. 1.2; 51).

Binden die Cytokine an ihre Rezeptoren, werden intrazellulär Januskinasen (JAK1/JAK3) bzw. Tyrosinkinassen (TYK2) aktiviert, die mit den Rezeptorketten assoziiert sind. Die aktivierten Kinasen wiederum phosphorylieren das intrazelluläre Signaltransduktions- und -transaktivations-Molekül 6 (STAT6). In phosphoryliertem

Zustand verbinden sich jeweils zwei STAT6-Moleküle zu einem Homodimer, das in dieser Form in den Zellkern eintreten kann, um dort an Promotorregionen von Zielgenen zu binden, was wiederum zur Transkription dieser Gene führt. Im Falle von IL-4 führt dies etwa zur Umstellung der Produktion von IgM auf IgE („Class-Switch“).

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der IL-4 und IL-13 Signalwege



Ohne den Einfluss von IL-4 wäre der Klassenwechsel von IgM auf IgE nicht möglich. Dementsprechend spielt die IL-4-Signalkaskade eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Asthma bronchiale und assoziierten atopischen Erkrankungen. Da es sich hierbei um einen grundlegenden und nicht reversiblen immunologischen Mechanismus handelt, muss die IL-4/IL-13 Signalkaskade streng reguliert werden. Unerwünschte oder überschießende Aktivierung soll durch verschiedene Kontroll- und Feedback-Mechanismen verhindert werden.

Maßgeblich beteiligt an der Regulation dieser Signalkaskade ist das SOCS3-Gen, ein wichtiges Mitglied der SOCS-Genfamilie, die in engem Zusammenhang zum T-Helfersystem, der IgE-Produktion und damit der Entstehung atopischer Erkrankungen steht.

1.2.1 Struktur und Wirkungsweise der SOCS-Genfamilie

Die Abkürzung „SOCS“ steht für „suppressor of cytokine signaling“, also für die hemmende Wirkung von (SOCS-)Proteinen auf Signalwege, die durch Cytokine ausgelöst werden. Insgesamt wurden 20 Proteine entdeckt, die die charakteristische „SOCS-Box“ (homologe Abfolge von ca. 30 Aminosäuren; 29, 37, 47) enthalten und damit der SOCS-Familie zugerechnet werden.

Je nach Struktur ihrer zentralen Region wurden diese 20 Proteine in fünf Unterfamilien aufgeteilt. Das in dieser Arbeit beschriebene SOCS3-Gen bildet zusammen mit sieben weiteren Mitgliedern (SOCS1 – SOCS7 und CIS=„cytokine inducible SH2-containing protein“) eine solche Unterfamilie, deren gemeinsame Struktur aus einer zentralen SH2-Domäne, einem variablen N-Terminus (50-380 Aminosäuren) und der C-terminalen charakteristischen „SOCS-Box“ (29, 47) besteht. Die vier weiteren Unterfamilien unterscheiden sich durch eine andere zentrale Domäne und sind bislang, genau wie SOCS4–SOCS7, noch wenig erforscht. Im Gegensatz dazu sind SOCS1 bis SOCS3 und CIS mittlerweile gut charakterisiert.

Für die Aktivierung der SOCS-Gene ist die Bindung von Cytokinen nötig. Unter Cytokinen versteht man Glykoproteine, die an der Regulation essentieller biologischer Prozesse beteiligt sind, so zum Beispiel Hämatopoese, Wundheilung, Regulierung des Immunsystems, Entwicklung des Nervensystems und viele weitere mehr. Die Wirkungsweise dieser Cytokine läuft über die Bindung an entsprechende Oberflächenrezeptoren der Zielzelle. Es gibt zahlreiche Beispiele für Cytokine, die in Wechselwirkung mit SOCS1-3/CIS stehen, so z.B. IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, Interferon γ , Prolactin und Wachstumshormone, um nur einige Beispiele zu nennen (siehe auch folgende Tabelle 1.1; 29).

Tab. 1.1: Wechselwirkungen zwischen SOCS1-3/CIS und diversen Cytokinen

Name	hemmt Signalweg durch:	assoziiert mit:
CIS	IL-2; IL-3; Prolactin; Epo; IGF-1; GH	Epo-Rezeptor; IL-2-Rezeptor; IL-3-Rezeptor; GH-Rezeptor; PCK θ
SOCS1	IL-2; IL-3; IL-4; IL-6; GH; Prolactin; Epo; LIF; OSM; Tpo; IGF-1	JAK1; JAK2; JAK3; GH-Rezeptor; IGF-1-Rezeptor
SOCS2	GH; IL-6; IGF-1; Prolactin	IGF-1-Rezeptor; Prolactin-Rezeptor; GH-Rezeptor
SOCS3	IL-2; IL-3; IL-4; IL-6; GH; Prolactin; Epo; LIF; IFN- α ; IFN- γ ; Leptin; OSM; IGF-1; Insulin	GH-Rezeptor; Epo-Rezeptor; Leptin-Rezeptor; IGF-1-Rezeptor
SOCS4	unbekannt	unbekannt
SOCS5	IL-6	unbekannt
SOCS6	unbekannt	unbekannt
SOCS7	unbekannt	PLC γ

Abkürzungen: Epo = Erythropoetin; IGF = Insulin-like Growth Factor; GH = Growth Hormone; PCK = Proteinkinase C; LIF = Leukemia Inhibiting Factor; OSM = Onkostatine M; Tpo = Thrombopoetin; PLC = Phospholipase C

Als direkte Reaktion auf eine Zell-Stimulation mit Cytokinen findet man einen rapiden, sofortigen Anstieg von SOCS-m-RNA in Zellen, in denen vor Stimulation nur sehr niedrige oder nicht nachweisbare RNA-Mengen vorhanden waren (29).

Es gibt keine direkte Beziehung zwischen einer bestimmten Cytokin-Stimulation und einer entsprechenden Induktion von SOCS-m-RNA. Vielmehr ist diese abhängig von der beobachteten Zelllinie und dem untersuchten Gewebe. Allgemein ist festzustellen, dass eine Cytokin-Stimulation fast immer zur Induktion mehrerer SOCS-Gene führt. Eine Ausnahme stellt hierbei SOCS3 dar, das nur von spezifischen Cytokinen aktiviert wird. Als Beispiel hierfür wäre die Induktion von SOCS3-m-RNA in Monozyten und Makrophagen durch IL-10 und LPS zu nennen (22, 29, 49).

Die Expression von SOCS wird über einen Signalweg ausgelöst, dessen zentrale Elemente, die JAKS (Janus-Tyrosin-Kinasen) und STATS („signal transducers and activators of transcription“), denen der IL-4/IL-13- Signalkaskade entsprechen.

Am Beginn der Signaltransduktion steht die Bindung des Cytokins an spezielle Rezeptoren. Diese Cytokinrezeptoren sind mit JAK-Kinasen verbunden, die sich unterhalb der Plasmamembran am intrazellulären Teil des Rezeptors befinden und durch die Cytokinbindung aktiviert werden. Diese wiederum aktivieren die STATS, die im phosphorylierten Zustand vom Rezeptor dissoziieren und in Homo- und Heterodimere dimerisieren. Diese Dimere gelangen in den Zellkern und binden an spezifische DNA-Sequenzen in Promotorregionen bestimmter Gene, wie zum Beispiel Gene der SOCS-Familie, deren Transkription somit reguliert wird (Abb. 1.3, linker Teil).

Sowohl SOCS1 als auch SOCS3 und CIS besitzen Promotor-Bindungsstellen für STAT-Transkriptionsfaktoren, die bei Bindung die Expression von SOCS auslösen. Genauer betrachtet beinhaltet CIS in seiner Promotorregion vier potentielle STAT5-Bindungsstellen, SOCS1 stellt Bindungsstellen für STAT1, STAT3 und STAT6 bereit, SOCS3 für STAT1 und STAT3. Bei SOCS3 gibt es Hinweise auf einen zusätzlichen Regulationsmechanismus: STAT5b kann an das STAT1/STAT3-Element im SOCS3-Promotor binden und somit Einfluss auf die Expression von SOCS3 nehmen (13).

Einerseits regulieren Cytokine also die Expression von SOCS, andererseits besteht die Funktion von SOCS auch in der Regulation der von Cytokinen aktivierten Signalkaskade. Außerdem inhibiert SOCS gleichzeitig auch den Signalweg, der ursprünglich, im Sinne einer negativen Rückkopplung, zur eigenen Produktion geführt hat und wirkt somit einem möglicherweise zu starken hemmenden Effekt entgegen.

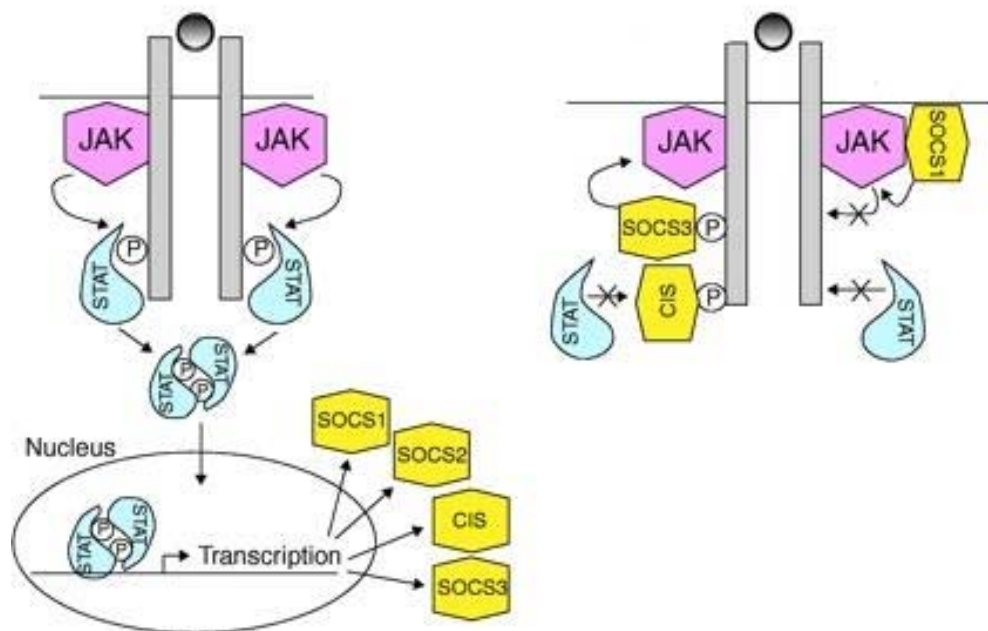
Seine inhibitorische Wirkung übt SOCS über die Bindung an verschiedene Elemente der beschriebenen Signalkaskade aus.

Die genaueren Mechanismen der verschiedenen SOCS-Vertreter im Rahmen dieser Signalwegshemmung lassen sich an folgender Abbildung (29) verdeutlichen (Abb. 1.3, rechter Teil):

Abb. 1.3: Mechanismen der SOCS- Signalwegregulation

SIGNAL-AKTIVIERUNG

SIGNAL-INHIBITION



JAK = Januskinase; STAT = STAT6-Transkriptionsfaktor; P = phosphoryliert

SOCS1 bindet (nach Anlagerung des jeweiligen Cytokins an den Rezeptor) direkt an JAK und stoppt somit seine katalytische Aktivität. Damit kommt es auch nicht zur Bereitstellung der Andockstelle für STAT.

CIS blockiert direkt die STAT-Bindungsstelle am Rezeptor, SOCS3 bindet an den Cytokinrezeptor in der Nähe der JAK-Bindungsstelle und stoppt so die JAK-Aktivität. Die Wirkungsweise von SOCS2 ist in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt. Auf molekularer Ebene wird die Inhibition von JAK durch eine so genannte KIR („kinase inhibiting region“) durchgeführt, die sich bei SOCS1 und SOCS3 im N-terminalen Bereich befindet (29, 56).

Abgesehen von den eben genannten Prozessen zur Signalunterdrückung gibt es Hinweise auf einen weiteren interessanten Mechanismus: SOCS-Box-Proteine fungieren als Adaptermoleküle, die einen Komplex bilden können aus ihrer SOCS-Box, einer Ubiquitin-Ligase und einem aktivierten Signalprotein, dessen weitere Wirkung unterdrückt werden soll. Da die Ubiquitinierung eines Proteins die allgemeine Voraussetzung zum Abbau eines Proteins im Proteasom einer Zelle darstellt, führen die SOCS-Elemente also in ihrer Funktion als Vermittler zur Ligase letztendlich zum Abbau des zu hemmenden Signalträgers (29, 37, 58).

Der beschriebene JAK-STAT-Weg ist wohl nicht der einzige Mechanismus, mit dem SOCS seine Regulationsfunktion ausübt, allerdings ist dieser der bislang am besten untersuchte. Es wurde auch schon *in vitro* gezeigt, dass die SOCS-Familienmitglieder eine Vielzahl anderer Signalproteine binden können. Dies gibt wiederum Hinweise darauf, dass für SOCS potentiell die Möglichkeit besteht, weitere Signalwege zu modulieren.

1.2.2 Der Einfluss von SOCS3 auf die Entstehung allergischer Erkrankungen

Bei der Untersuchung der Wirkung von SOCS3 auf das T-Zellsystem wurde herausgefunden, dass SOCS3 die frühe Entwicklung und Differenzierung der T-Zellen (in CD4- und CD8-Zellen) im Thymus und die Differenzierung in TH1- und TH2-Helferzellen beeinflusst (30). Dabei wird die Entwicklung hin zu TH1- bzw. TH2-Zellen von einer spezifischen Erhöhung der SOCS-m-RNA in der Zelle begleitet. Für SOCS3 ergab sich in TH2-Zellen eine im Vergleich zu TH1-Zellen 23-fach erhöhte Menge an m-RNA (11). Zusätzlich wurde in diesem Zusammenhang herausgefunden, dass das Ausmaß der SOCS3-Expression bei Patienten mit TH2-Erkrankungen, also Krankheiten mit erhöhtem TH2-Level wie zum Beispiel Asthma und Dermatitis, eng korreliert mit der Schwere der Krankheit, d.h. je ausgeprägter das Krankheitsbild ist, desto höher ist die SOCS3-Expression in T-Zellen (30, 45).

Einen zusätzlichen Hinweis auf den Zusammenhang zu atopischen Erkrankungen geben Untersuchungen, die zeigen, dass der IgE-Spiegel bei Menschen mit gesteigerter SOCS3-Expression erhöht ist (30).

SOCS3 beeinflusst Entzündungsprozesse über einen weiteren Mechanismus. IL-6, ein proinflammatorisches Cytokin, das eine wichtige Rolle bei lokalen Entzündungsvorgängen spielt, wird über SOCS3 inhibitorisch reguliert. Damit übt SOCS3 einen entzündungshemmenden Effekt aus (7).

Weiterhin bindet SOCS3 spezifisch an die cytoplasmatische Region eines IL-12-Rezeptors, dessen Funktion in der Differenzierung der T-Zellen hin zu TH1 besteht. Diese wird durch die Bindung von SOCS3 inhibiert (30).

Die zahlreichen Beobachtungen bezüglich des Zusammenhangs zwischen SOCS3 und immunregulatorischen Faktoren (wie zum Beispiel dem T-Helferzellsystem und den Cytokinen IL-4/IL-13), die an der Entwicklung atopischer Erkrankungen beteiligt sind, legt die Vermutung nahe, dass genetische Veränderungen im SOCS3-Gen zu Veränderungen in seiner Funktion führen könnten, die das TH1/TH2-Gleichgewicht und den Ablauf der IL-4/IL-13-Signalkaskade beeinflussen könnten.

Der potentielle Einfluss von SOCS3 auf die Regulation von IL-4/IL-13 wird auch dadurch deutlich, dass SOCS3 mit IL-4 und IL-13 denselben JAK-STAT-Signalweg teilt. Insbesondere sind in diesem Zusammenhang Forschungsergebnisse zu nennen, die

die Regulation des IL-4-Signalwegs durch SOCS3 eindrücklich belegen: SOCS3 führt über die Hemmung der cytokinrezeptor-assoziierten JAK1-Kinase zur Inhibition des IL-4-Signalwegs (18).

Diese Erkenntnisse nähren die Vermutung, dass genetische Veränderungen in SOCS3, das an der Regulation von IL-4 maßgeblich beteiligt ist, ebenfalls an der Entstehung von Asthma und asthmaassoziierten Erkrankungen mitwirken könnten.

Dass genetische Veränderungen in Form von Polymorphismen innerhalb der IL-4/IL-13-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen, wurde bereits gezeigt. Bei Polymorphismen handelt es sich um Basenaustausche (= Mutationen). Wenn bei mehr als drei Prozent der Bevölkerung eine solche Mutation auftritt, wird diese als Polymorphismus (SNP = single nucleotide polymorphism) definiert. Im Bereich des IL-4/IL-13-Signalwegs wurden bereits in verschiedenen Studien Polymorphismen auf unterschiedlichen Regulationsebenen entdeckt.

So wurde das komplette IL-4-Gen mitsamt flankierendem Bereich auf Polymorphismen und deren potentielle Assoziation zu atopischen Erkrankungen hin untersucht. Dabei ergaben sich signifikante Assoziationen zwischen einer Reihe gekoppelt vererbter Polymorphismen und der Entwicklung von Asthma bzw. der Regulation des Serum-IgE-Spiegels (24). Ebenso wurden für IL-13 bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Polymorphismen und der Prävalenz erhöhter IgE-Spiegel signifikante Ergebnisse gefunden (15). Auch STAT6, ein intrazelluläres Signaltransduktions- und -transaktivations-Molekül, das nach Aktivierung über Tyrosinkinase letztendlich für die Gentranskription verantwortlich ist, wurde im Rahmen der Untersuchungen betrachtet. Dabei ergab sich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Polymorphismen im Bereich des STAT6-Gens und einer Erhöhung des Serum-IgE-Spiegels (43).

Besonders aufgrund der engen Verbindung der beiden Gene IL-4 und IL-13 über die gemeinsame Nutzung ihres Rezeptorkomplexes liegt die Frage nahe, ob, abgesehen vom Einfluss der einzelnen Gene auf die Atopieentstehung, eventuell Kombinationseffekte von genetischen Varianten in ihrer Signalkaskade (IL-4, IL-13, IL-4R α , STAT6) bestehen.

Die gemeinsame Untersuchung der einzelnen Regulationsebenen ergibt ein komplexes Bild des Zusammenspiels der einzelnen genetischen Veränderungen. Dabei zeigen

neueste Studien, dass beispielsweise das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Genveränderungen in den vier Hauptkomponenten des IL-4/IL-13-Signalwegs zu drastischen Auswirkungen auf die Krankheitsentstehung führt (44). In einer weiteren Untersuchung, die sich mit den Gen-Gen-Interaktionen befasst, wurde entdeckt, dass das gleichzeitige Auftreten von Polymorphismen in der IL4R α -Rezeptorkette und dem IL-13-Gen zu einem, im Vergleich zur Wildtypform, fünffach erhöhten Risiko führt, an Asthma zu erkranken (21).

Andererseits erkranken Individuen, die auf keiner der Regulationsebenen Polymorphismen in den entsprechenden Genen aufweisen, signifikant seltener an Asthma und zeigen weniger oft erhöhte IgE-Serum-Spiegel. Dies legt den Verdacht auf einen protektiven Effekt der Gene in ihrer Wildtypform bezüglich der Entstehung allergischer Immunreaktionen nahe.

Die entscheidende Bedeutung des kombinierten Auftretens dieser genetischen Veränderungen mit dem damit verbundenen überproportional starken Effekt wird zusätzlich durch die Tatsache unterstrichen, dass in Studien, in denen nur einzelne Komponenten der Signalkaskade, zum Beispiel die IL-4-Rezeptorkette (IL4R α), untersucht wurden, zum Teil nur geringe Effekte auf die IgE-Regulation beobachtet wurden (55).

Bei SOCS3 handelt es sich also um ein viel versprechendes Kandidatengen im Zusammenhang mit der Entstehung von Asthma und asthmaassoziierten Erkrankungen. Um den Einfluss genetischer Veränderungen von SOCS3 auf die Krankheitsentstehung näher zu erforschen, wurde das Gen im Rahmen dieser Arbeit innerhalb einer Bevölkerungsstichprobe auf seine genaue Basenfolge hin untersucht, um eventuelle Polymorphismen und deren Zusammenhang zur Prävalenz atopischer Erkrankungen identifizieren zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Die Populationen

2.1.1 Zufallsstichprobe für das Mutationsscreening

Die Screeningpopulation bestand aus 45 freiwilligen Erwachsenen, die zufällig aus der Allgemeinbevölkerung ausgesucht wurden.

2.1.1.1 DNA-Extraktion für Blutproben der Kontrollpopulation

Aus den EDTA-Blutproben der Probanden wurde die DNA nach folgendem Schema isoliert: Zuerst wurden die Proben mit Ery-Lyse-Puffer (6.3.1) versetzt. Nach Ablauf von mindestens 10 Minuten zeigte das Klarwerden der vorher trüben Lösung den vollständig abgelaufenen Lyse-Vorgang an. Danach wurde die Lösung 10 Minuten bei 500 rcf zentrifugiert, wobei am Boden des entsprechenden Probengefäßes ein sichtbares Leukozytenpellet entstand. Dieses wurde, nach Abkippen des Überstandes, durch Schrapfen des Gefäßes an einem Metallgitter resuspendiert. Dieser eben beschriebene Vorgang (Lyse- mit darauf folgendem Zentrifugationsschritt) wurde anschließend noch zweimal wiederholt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 ml Proteinase K-Puffer (6.3.1), 25 µl Proteinase K (6.5.2) und 250 µl 20 % SDS (6.3.1). Anschließend wurden die Proben über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 1500 µl NaCl mit anschließendem, ca. 15 Sekunden langem Vortexen der Lösung. Danach wurden die Proben 30 Minuten bei 3200 rcf zentrifugiert, der sich ergebende Überstand (= DNA-haltige Lösung) in frische Reaktionsgefäße überführt und jeweils 20 ml 100 % Ethanol (6.3.1) zugegeben. Sofortiges Schwenken führte nach EtOH-Zugabe zum Ausfallen der DNA, die mit Hilfe einer Pipettenspitze aus der Flüssigkeit entnommen werden konnte. Nach der anschließenden Durchführung eines Waschschrittes mit 70 % Ethanol wurde die DNA

ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und danach in etwa 150 µl (je nach Menge der gefällten DNA variierend) TE-Puffer (6.3.1) gelöst und bei 4°C gelagert.

Die genomische DNA der Kontrollpopulation wurde in der vorliegenden Arbeit für alle Sequenzierreaktionen zur Polymorphismus-Detektion im SOCS3-Gen benutzt.

2.1.2 Die Studienpopulation für die Assoziationsanalyse

Im Rahmen der „International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase II“ (ISAAC II), einer internationalen Vergleichsstudie zur Erforschung von Asthma und Allergie, wurden in den Jahren 1995/96 unter anderem in den deutschen Städten München und Dresden Kinder der 4. Schulklasse (Altersstufe 9-11 Jahre) rekrutiert. Entsprechend dem ISAAC II-Studienprotokoll wurden sie mittels standardisiertem Elternfragebogen, Hautuntersuchung, Haut-Allergietest, Spirometrie und bronchialem Reiztest untersucht. Zusätzlich wurde eine venöse Blutentnahme durchgeführt (52).

Insgesamt 3.099 Kinder deutscher Abstammung aus den Städten München und Dresden bildeten die Gesamtpopulation für die vorliegende Assoziationsstudie, wobei sich die Verteilung folgendermaßen zusammensetzte: München n = 1.159, Dresden n = 1.940.

Es handelte sich hierbei um eine Querschnittspopulation, d.h. sämtliche rekrutierte Kinder mit verfügbarer DNA und IgE-Werten wurden unabhängig von möglichen asthmatischen oder atopischen Erkrankungen erfasst.

Die DNA dieser Population wurde später zur Genotypisierung in der MALDI-TOF (siehe 2.10) eingesetzt.

2.1.2.1 Fragebogen

Die standardisierten Fragebögen wurden durch die Schulen an die Eltern der Kinder ausgeteilt und beinhalteten detaillierte Fragen zum Auftreten und der Schwere von atopischen Symptomen.

In der späteren Analyse wurden die Phänotypen Asthma, keuchende oder pfeifende Atemgeräusche, die irgendwann einmal aufgetreten sind (im Folgenden als „Giemen jemals“ bezeichnet), keuchende Atmung, die im letzten Jahr aufgetreten ist (im

Folgenden als „Giemen im letzten Jahr“ bezeichnet), Heuschnupfen, Neurodermitis, Atopie und IgE-Spiegel ausgewertet.

Kinder wurden dann als Asthmapatienten eingestuft, wenn die Eltern folgende Fragen bejahten: „Hat ein Arzt mindestens einmal Asthma bei ihrem Kind diagnostiziert?“ bzw. „Hat ein Arzt öfter als einmal die Diagnose asthmatische, spastische oder obstruktive Bronchitis bei ihrem Kind gestellt“?

Ob ein Kind an Heuschnupfen oder Neurodermitis erkrankt war, wurde entsprechend über die Frage: „Hat ein Arzt jemals Heuschnupfen bzw. Neurodermitis bei ihrem Kind diagnostiziert?“, überprüft.

2.1.2.2 Atopiebestimmung mittels Haut-Allergietest

Sechs häufige Aeroallergene sowie eine Positiv- und Negativkontrolle (10 mg/ml Histamin bzw. NaCl) wurden für den Haut-Prick-Test verwendet. Dabei sah das ISAAC-Protokoll für die Kinder in München und Dresden die Testung auf Dermatophagoides pteronyssinus, D. farinae, Katzenhaar, Alternaria tenuis, Baum- und Gräserpollen unter Verwendung von Extrakten (6.7) vor.

Für die Auswertung des Prick-Tests war die Größe der jeweils entstandenen Quaddel an der Auftragsstelle verglichen mit der Negativkontrolle ausschlaggebend. Dabei entsprach ein positives Testergebnis einem Quaddeldurchmesser von mehr als 3 mm.

2.1.2.3 Bestimmung Gesamt-Serum-IgE

Für die Bestimmung des Immunglobulin E-Spiegels wurde eine venöse Blutabnahme durchgeführt und aus dem EDTA-Blut die DNA isoliert und aufgereinigt.

2.1.2.4 Qualitätskontrolle

Alle an der 1995/1996 durchgeführten Studie beteiligten Feldarbeiter durchliefen ein einwöchiges Trainingsprogramm. Im Verlauf der Datensammlung wurden die damit betrauten Teams in periodischen Abständen sowohl angekündigt als auch

unangekündigt von Inspektoren besucht. Die Qualität der gesammelten Daten wurde über den gesamten Zeitraum der Erfassung von einem zentralen Koordinationszentrum in Münster kontrolliert und die Studiendurchführung von der Ethikkommission der Universität Münster genehmigt.

2.1.3 Primaten-DNA

Abgesehen von der Untersuchung menschlicher DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit genetisches Material von verschiedenen Affen-Spezies miteinbezogen. Von jeder Affenspezies lag eine DNA-Probe vor, die über die ECACC (European collection of cell cultures, siehe 6.7) bezogen wurde. Es wurde ein so genanntes phylogenetisches Shadowing (4) durchgeführt, dessen Prinzip auf Sequenzvergleichen zwischen Homo sapiens und mit ihm mehr oder weniger eng verwandten Affenarten beruht. Durch diese Methode kann der Konservierungsgrad des untersuchten genetischen Materials bestimmt werden. Es wurde also, analog zu den untersuchten Probanden, bei den Tieren in der SOCS3-Region die genaue Basensequenz mittels Sequenzierung ermittelt. Bei den Affen handelt es sich hierbei um genetisches Material der folgenden fünf Arten, die in absteigender evolutionärer Reihenfolge (zur phylogenetischen Entfernung zum H.sapiens in Mio. Jahren siehe Angabe in Klammern) mit dem Menschen verwandt sind:

- **Schimpanse** (Überfamilie Menschenartige, Familie afrikanische Menschenaffen, *6 Mio. Jahre*)
- **Gorilla** (Überfamilie Menschenartige, Familie afrikanische Menschenaffen, *9 Mio. Jahre*)
- **Orang-Utan** (Überfamilie Menschenartige, Familie asiatische Menschenaffen, *15 Mio. Jahre*)
- **Gibbon** (Überfamilie Menschenartige, Familie kleine Menschenaffen, *25 Mio. Jahre*)
- **Grüne Meerkatze** (Altweltaffe, *25 Mio. Jahre*)

Die Ergebnisse bzw. die Interpretation dieser Untersuchungen sind in Abschnitt 3.3.2 bzw. im Diskussionsteil dargestellt.

2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“)

Um ausgewählte Fragmente des SOCS3-Gens zu vervielfältigen und diese somit einer späteren Sequenzierung zugänglich zu machen, wurde das Polymerase-Kettenreaktions-Verfahren (PCR) eingesetzt. Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur zyklischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Dabei werden beide komplementäre DNA-Stränge gleichzeitig vermehrt. Vorbedingung der Reaktion ist die Kenntnis der Sequenzen an beiden Enden des zu vervielfältigenden Bereichs, an den sich dann zwei kurze Starter-Oligonukleotide („primer“) an Strang bzw. Gegenstrang anlagern. Die anschließende Amplifikation wird möglich gemacht durch die Verwendung einer hitzestabilen Taq-Polymerase, die durch Temperaturerhöhung nicht denaturiert wird. Dies ist nötig, da eine Trennung der DNA in ihre Einzelstränge über Erhitzung erfolgt. Anschließend hybridisieren die Oligonukleotide an die jeweilige DNA-Sequenz und schließlich werden die komplementären Stränge synthetisiert. Dieser Vorgang der Denaturierung und folgenden Synthetisierung kann bis zu 40 Mal wiederholt werden, wobei die DNA-Menge exponentiell zunimmt. Ein Reaktionsansatz besteht aus den eben erwähnten zwei spezifischen Oligonukleotidprimern, hitzestabiler Taq-Polymerase, den vier Desoxynukleosidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP und dTTP, dem DNA-Template und geeigneten Pufferbedingungen. In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Ziffer in der Bezeichnung entspricht der Entfernung vom Beginn der codierenden Region) mit ihren optimalen PCR-Bedingungen aufgelistet, Tabelle 2.2 zeigt ihre genaue Sequenz. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms „Netprimer“ (6.2.4) entworfen und von der Firma Metabion (6.6.1) bezogen. Für Fragment 9 sind hier jeweils zwei Primerpaare aufgelistet, da der letzte, zweite Teil dieses Fragments unter Verwendung eines speziellen, so genannten „Touch-down“-PCR-Verfahrens amplifiziert wurde. Dieses PCR-Programm wird angewendet, wenn ein PCR-Produkt zwar eine Bande in der Gelelektrophorese zeigt, diese aber im Gel zu schwach bzw. zu unklar abgegrenzt erscheint. Um die Qualität eines solchen PCR-Produkts zu erhöhen, arbeitet die „Touch-down“-PCR in zwei Schritten: anstatt bei nur

einer Annealing-Temperatur zu laufen, erfolgt im ersten Zyklus eine stufenweise Erniedrigung der Annealing-Temperatur um jeweils 0,5°C (von 70°C auf letztendlich 60°C im Laufe von 20 Wiederholungen). Während dieses ersten Zyklus kann sich in dem vorgegebenen breiten Temperaturrahmen ein erstes Produkt bilden, das im zweiten Zyklus, der nach dem Standard-PCR-Programm abläuft (siehe Tab. 2.4), vermehrt wird. Das entsprechende Touch-Down-Programm ist in Tab. 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.1: Übersicht über alle verwendeten PCR-Primerpaare mit Fragmentlänge, Annealing-Temperatur, Zyklen-Zahl und Betain-Zusatz

Fragment	Name	Fragment-Länge	Annealing-Temperatur	Zyklenzahl	Betain
1	SOCS3/1_2104fwd	496 bp	61°C	35	3µl
	SOCS3/1_-1509rev				
2/3	SOCS3/2_-1602fwd	935 bp	58°C	40	3µl
	SOCS3/3_-668rev				
4	SOCS3/4_-787fwd	619 bp	67°C	40	1,5µl
	SOCS3/4_-169rev				
5	SOCS3/5_-249fwd	643 bp	65°C	40	3µl
	SOCS3/5_394rev				
6	SOCS3/6_160fwd	671 bp	65°C	40	3µl
	SOCS3/6_830rev				
7/8	SOCS3/7_704fwd	1030 bp	67°C	40	3µl
	SOCS3/8_1733rev				
9	SOCS3/9_1652fwd	554 bp	60°C	40	1,5µl
	SOCS3/9_2205rev				
	SOCS3/9_1765fwd	658 bp	70°C-60°C	20/40	0,3µl
	SOCS3/9_2422rev				

Tabelle 2.2: Verwendete PCR-Primer

<u>Fragment</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
1	SOCS3_-2104fwd	GGGTCACATTCCAGGGGG
	SOCS3_-1509rev	CGAAAGGGAAGTGGGGCTAC
2/3	SOCS3_-1602fwd	CCC GCAGGTGACTGTCTG
	SOCS3_-668rev	GAAGTCTCCGTCCTTGGGG
4	SOCS3_-787fwd	GGCTCCTTTGTGGACTTCACG
	SOCS3_-169rev	CCGAGCGACTGGGGCAC
5	SOCS3_-249fwd	GTGCGGGCTCCGTGAGG
	SOCS3_-394rev	CAGGGGGCGGCATGTAGTG
6	SOCS3_160fwd	GGCGAGGCGAACCTGCTG
	SOCS3_830rev	GGAGAGGGCAGAGGGAGGG
7/8	SOCS3_704fwd	GTCGGGAGAGGGGACGCAG
	SOCS3_1733rev	GGCTGACATTCCCAGTGCTC
9	SOCS3_1652fwd	CACCAAGCCAGCCCACAG
	SOCS3_2205rev	CAAGCATCTCCTAATAGCCTCAAG
	SOCS3_1765fwd	GTCAGAGCAGAGCCACCAG
	SOCS3_2422rev	TCTCTTCCTCCTCTCCGATG

Der Standard-PCR-Ansatz wurde nach dem in Tabelle 2.3 aufgeführten Schema pipettiert und unter den in Tabelle 2.4 beschriebenen Temperaturbedingungen durchgeführt.

Tabelle 2.3: Standard-Komponenten eines PCR-Ansatzes

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
DNA-Template	3,0 µl	20 ng/µl
dNTP-Mix	1,0 µl	10 mM
PCR-Puffer (Puffer Y)	5,0 µl	10 x
Fwd-primer	0,5 bzw. 1,0 µl	25 pmol/µl
Rev-primer	0,5 bzw. 1,0 µl	25 pmol/µl
Taq-DNA-Polymerase	0,16 µl	5 U/µl
Betain	1,5 bzw. 3µl	25 mM/ 5 M
H ₂ O	ad 50 µl	

Tabelle 2.4: Standard-Temperatur-Bedingungen einer PCR

Temperatur	Zeit
1) 96 °C	1 min
2) 96°C	10 sec
3) 53 °C – 66 °C	20 sec
4) 72 °C	10 sec
5) 72 °C	2 min
6) 4 °C	hold

Tabelle 2.5: Standard-Temperatur-Bedingungen der Touch-down-PCR

Temperatur	Zeit
1) 95 °C	2 min
2) 95°C	20 sec
3) T +10°C (= 70°C) - 0,5°C / Wiederholung	20 sec
4) 72 °C	20 sec
5) go to 2)	Repeat 19
6) 95 °C	20 sec
7) 60°C	20 sec
8) 72°C	20 sec
9) go to 6)	Repeat 39
10) 72°C	10 sec
11) 72°C	2 min
12) 4°C	hold

Bei jeder PCR wurde als Test auf Kontamination mit unspezifischen PCR-Produkten in den verwendeten Lösungen eine Negativkontrolle ohne DNA-Material mitgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler der Firma Eppendorf (6.1). Die hierbei verwendete Populationen-DNA ist unter 2.1.1 beschrieben.

2.2.1 Primer Extension Preamplification (PEP)

Das Ziel der PEP-PCR ist die Amplifikation des gesamten Genoms zur Steigerung der DNA-Quantität. Dies ist vor allem im Rahmen genetischer Forschung wichtig, um möglichst viele Genotypisierungen von einer individuellen DNA-Probe zu erhalten.

Bei der PEP-Reaktion handelt es sich prinzipiell um eine PCR (siehe oben), in die so genannte N15-Primer (6.6.2) für die Amplifikation des gesamten Genoms eingesetzt werden. N15-Primer stellen eine Mischung unterschiedlicher Primer mit jeweils einer

Länge von 15 Basen dar, deren Basenabfolge zufällig festgelegt wurde. Auf Grund der unspezifischen Sequenzen dieser Primer kommt es bei der PEP-Reaktion zur zufälligen Anlagerung am gesamten komplementären DNA-Strang der eingesetzten Probe. Die Amplifikation findet dann zwischen den benachbarten, an den DNA-Strang angelagerten Primern statt. Die Regionen zwischen den Primern variieren in ihrer Länge und können zum Teil auch überlappen. Da die Primer sich zufällig über den ganzen DNA-Strang verteilen, ist es mit dieser Methode möglich, das gesamte Genom zu amplifizieren. Dabei kann mit einer 40-fachen Steigerung der DNA-Menge gerechnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der „Primer Extension Preamplification“ eingesetzt, um den DNA-Gehalt aus den Blutproben der Studienpopulation (siehe 2.1.2) zu erhöhen. So konnte jede einzelne DNA-Probe möglichst vielen genetischen Untersuchungen zugänglich gemacht werden, zumal auf Grund des Populationsumfangs eine weitere Probenentnahme zu einem späteren Zeitpunkt schwer durchführbar erschien.

Der Standard-PEP-Ansatz wurde für einen 50 µl-Ansatz pipettiert (Schema in Tabelle 2.6 aufgeführt) und unter den in Tabelle 2.7 beschriebenen Temperatur-Bedingungen in einem Thermocycler (6.1) durchgeführt.

Tabelle 2.6: Standard-PEP-Ansatz

Komponenten	Volumen	Konzentration der Stammlösung
DNA-Template	1,0 µl	5 ng/µl
dNTP-Mix	5,0 µl	je 2mM
Puffer Y	5,0 µl	10 x
N15-Primer	10,0 µl	200 µM
Taq-DNA-Polymerase	1,0 µl	mind. 1 U/µl
MgCl ₂	5,0 µl	25 mM
H ₂ O	23 µl	

Tabelle 2.7: Temperatur-Bedingungen für die Standard-PEP-Reaktion

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

Zur Überprüfung der Qualität der PEP-Reaktion wurden einige Proben auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetragen (siehe 2.4) und zusätzlich eine Kontroll-PCR durchgeführt.

2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Anschließend an die PCR-Reaktion erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte unter Verwendung von Millipore-Filterplatten (6.4.1). Es handelt sich hierbei um ein membrangebundenes Aufreinigungsverfahren, bei dem zunächst das PCR-Produkt unter Druckeinwirkung an eine Membran gebunden und später in gereinigter Form wieder in Wasser gelöst wird.

Dabei wird folgendermaßen vorgegangen: Nach Überführen des gesamten PCR-Produktes und Zugabe von je 250 µl Wasser wurde die Platte bei 3200g für 7 Minuten zentrifugiert (6.1). Das PCR-Produkt konnte anschließend durch Vortexen in 30 µl Wasser eluiert und der Überstand abpipettiert werden.

2.4 Gel-Elektrophorese von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

Zur Identifizierung und Kontrolle der im vorhergehenden Schritt aufgereinigten PCR-Produkte wurde eine elektrophoretische Auftrennung in 1,5 %-igen Agarose-Gelen durchgeführt (6.3.5). Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren unter neutralen pH-Bedingungen negative Ladungen besitzen und somit in einem elektrischen Feld wandern, wobei ihre Geschwindigkeit proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist.

Zur Herstellung der Gele wurde die in TBE-Puffer (6.3.5) aufgekochte Agarose vor dem Erhärten in horizontale Schlitten gegossen, in denen ein Kamm Vertiefungen für die aufzutragenden DNA-Lösungen bereitstellte. Proben der aufzutrennenden DNA-Lösung wurden mit Ladepuffer (6.3.5) versetzt und dem elektrischen Feld ausgesetzt. Durch Vergleich mit einem Längenstandard definierter Fragmentlängen (100bp ladder, 6.3.5), der zusätzlich zu den DNA-Proben mitlief, konnte dann die Länge der DNA-Moleküle abgeschätzt werden. Die vorherige Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (6.3.5) zur aufgekochten Agarose-Lösung ermöglichte nach Beendigung des Trennungsvorgangs eine Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht (302 nm). Zur Dokumentation wurden mit einer Kamera (6.1) Aufnahmen der Gele gemacht.

2.5 Sequenzierungs-PCR

Mit Hilfe der Sequenzierung kann die Abfolge einer Nukleotidsequenz, z.B. von PCR-Produkten, ermittelt werden. In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen wurde dieses Verfahren eingesetzt, um mögliche Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNPs), also einzelne Basenveränderungen, im SOCS3-Gen zu finden. Der Methode des „Cycle-Sequencings“ liegt eine PCR Reaktion mit nur einem Primer zu Grunde. Zur Sequenzierung von DNA wurde die Didesoxy-Nukleotid-Methode nach Sanger (42) angewandt. Dabei führt jeder neue Elongationsschritt zur Erzeugung eines neuen Abbruchfragmentes. Es findet dabei keine exponentielle Amplifikation statt, sondern die normale Synthese von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, ausgehend vom Primer. Zu einem geringen Prozentsatz werden dabei im Reaktionsansatz

Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs) den normalen dNTPs zugefügt. Durch den zufälligen Einbau dieser ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) erfolgt der Abbruch der Elongation. Jede Sorte ddNTP ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gemischt, wodurch die spätere automatische Analyse der verschieden langen Abbruchfragmente ermöglicht wird.

Als Primer für die Sequenzierreaktion wurden teilweise die schon in der PCR-Reaktion verwendeten Primer eingesetzt, teilweise auch, je nach Bedarf, neue Primer für die Sequenzierreaktion verwendet (siehe Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Zusätzlich verwendete Sequenzier-Primer

<u>Fragment</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
2/3	SOCS3_2revneu	CTACTCGCAGCAGAGAAAGGC
	SOCS3_2fwdneu	GACTGTCGCACGTCTCCAAC
4	SOCS3_4fwdneu	GTGACGAGGTAGGGGCAGAG
	SOCS_4revneuA1	GGAGGGAGAAACCCGAGGC
7/8	SOCS3_7fwdA2	GGAGAGGGGCCTGCGTCC
	SOCS3_7revneuA2,3,5	CCATTTTCCTTCGCCAGCC
	SOCS3_8fwdneu	GAGAAGGGCTTGGGGTGAC
9	SOCS3_9fwdneu	GGATGGGTGGAGAGGCTGAGG
	SOCS3_9revneuA1	GAATACTTTGTGTTTGTTTAGTTGCC

Die mit „A“ bezeichneten Primer wurden speziell zur Sequenzierung der Affen-DNA verwendet.

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert (Tab. 2.9) und im Cycler (6.1) nach in Tabelle 2.10 dargestelltem Programm mit 28 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 2.9: Pipettierschema der Sequenzierungs-PCR

Komponenten	Volumen
PCR-Produkt (25-50 ng/ μ l)	1-2 μ l
Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Big dye v3.1	1,0 μ l
5 x Sequenzierpuffer	1,0 μ l
ad H ₂ O	Gesamtvol. 5,0 μ l

Tabelle 2.10: Temperaturbedingungen der Sequenzierungs-PCR

	Temperatur	Zeit
1)	95 °C	30 sec
2)	50°C	15 sec
3)	60 °C	4 min
4)	4 °C	hold

Nach erfolgter Sequenzierungs-PCR wurden die Proben mit nachfolgend dargestelltem Fällungs-Verfahren aufgereinigt, um störende Faktoren zu entfernen.

2.6 Fällung

Zu den Proben der Sequenzierungs-PCR wurden je 100 μ l EtOH (70 %) (6.3.1) hinzugefügt, gut gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 3000g und 4°C für 30 Minuten, um die gefällte DNA zu pelletieren. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen und die Platte umgedreht im Ständer auf der Kimwipe liegend kurz bei 500 - 600g anzentrifugiert. Zum Reinigen der DNA-Pellets wurde ein zweites Mal 150 μ l EtOH (70 %) zugegeben und die Probe erneut bei 3000g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der Flüssigkeit wurde die Platte nochmals wie oben beschrieben eine

Minute bei 600g zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet am Boden der Reaktionsgefäße wurde anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Unter Zugabe von 50 µl HPLC-H₂O (6.3.3) wurde das Plättchen unter vorsichtigem Mischen wieder gelöst und 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

2.7 Sequenzierung

Von dem aufgereinigten Sequenzierungsprodukt wurden 25 µl Eluat aufgenommen und in spezielle Mikrotiterplatten (6.7) überführt. Die Sequenzierung wurde auf einem Kapillarsequenziergerät (6.1) durchgeführt. PCR Produkte bis 500 bp wurden auf einem 36 cm Array sequenziert, größere auf 50 cm Arrays. Die zur Sequenzierung angewandte Methode beruht auf dem schon oben beschriebenen Sanger-Abbruchs-Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Die Auftrennung der verschiedenen langen Fragmente findet dabei in einer mit Acrylamid-Gel gefüllten Kapillare statt. An dieser liegt eine elektrische Spannung an, wodurch die Fragmente elektrophoretisch nach Größe getrennt werden. Die Analyse der je nach Abbruchbase fluoreszenzmarkierten, verschieden langen DNA-Fragmente erfolgt zum einen durch einen Laser, welcher die Farbstoffe anregt, zum anderen durch einen Detektor, welcher die Signale empfangen kann.

2.8 Mutationsscreening (Computerauswertung mit BioEdit)

Die Auswertung aller so gewonnenen Sequenzen erfolgte unter zu Hilfenahme des BioEdit Sequence Alignment Editors (6.2.5). Es wurden nur Sequenzier-Ergebnisse mit sauberem Hintergrund verwendet. Des weiteren wurde bei der Auswertung darauf geachtet, dass alle Fragmente einander eindeutig überlappten, so dass keine Lücken in der zu untersuchenden Sequenz des gesamten Gens entstanden. Als SNP wurde der Austausch einer spezifischen Base innerhalb einer Sequenz gewertet, der mindestens dreimal in der Grundpopulation der 45 untersuchten Probanden vorkommen muss. Die Polymorphismen konnten dabei sowohl in homozygoter als auch in heterozygoter Form vorliegen.

2.9 MatInspector

Die Kontrolle der Gentranskription stellt einen entscheidenden Mechanismus dar, über den reguliert wird, wie viel Protein in der Zelle letztendlich produziert wird. Für diese Kontrolle sind so genannte Promotoren-Sequenzen zuständig, die Proteinbindungsstellen tragen, an die so genannte Transkriptionsfaktoren (TF) binden (5). Diese starten oder unterdrücken durch ihre Anlagerung die Transkription von Genen, das heißt die Umsetzung einer Basenfolge in mRNA und die darauf folgende Umwandlung in das entsprechende Protein.

Eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren ist bereits beschrieben, für das menschliche Genom wird eine Anzahl von bis zu 3.000 angenommen (31).

Um die funktionelle Relevanz von TF-Bindungsstellen (TFBS) bestimmen zu können, wird eine so genannte Promotoranalyse durchgeführt. Dazu wurde in dieser Arbeit das MatInspector- bzw. das FastSNP-Programm (6.2.6) verwendet.

Diese, im Internet frei zu benutzenden Programme, zeigen potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in Promotorregionen an. Zur Durchführung der Untersuchung wurde der betreffende Gen-Bereich, innerhalb dessen sich der aufgefundene Polymorphismus befand, in das Programm in Wildtypform eingegeben. Anschließend wurde dieser Vorgang mit veränderter Basenfolge, also unter Berücksichtigung des SNPs, wiederholt. Beim Vergleich der sich daraus ergebenden „Treffer“, also vorhandener Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, konnte man ersehen, ob der entsprechende Polymorphismus zum Wegfall bzw. Hinzukommen einer solchen Stelle führt (Darstellung und Interpretation entsprechender Ergebnisse für die in dieser Arbeit aufgefundenen SNPs siehe Ergebnis- bzw. Diskussionsteil).

Dazu ist anzumerken, dass TFBS überall im Genom auftreten können und nicht auf regulatorische Bereiche beschränkt sind. Auch ist die Auswirkung einer Bindung abhängig von unterschiedlichen Parametern wie Zell- bzw. Gewebetyp, Entwicklungsstadium, etc. Definitive Aussagen zur potentiellen Funktionalität einer Bindung können also erst nach weiterführenden Experimenten unter definierten Bedingungen getroffen werden (5).

2.10 Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS

2.10.1 Theoretische Grundlagen

Um kleine DNA-Fragmente zu bestimmen, kommt das so genannte MALDI-TOF (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **T**ime-**O**f-**F**light)-Verfahren zum Einsatz. Dabei können mit Hilfe des MALDI-TOF-Massenspektrometers DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 3-30 Basen mit einer Genauigkeit von 0,1 % bis 0,01 % bestimmt werden, wodurch sich ein Massenbereich erschließt, in dem eine SNP-Analyse (SNP = **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) durchgeführt werden kann (14, 16, 32, 38, 50).

Diese Methode, die von Hillenkamp und Karas sowie Tanaka (24, 25) eingeführt wurde, hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von effektiven Hochdurchsatzmethoden („High-Throughput-Methods“) geführt, mit deren Hilfe DNA-Variationen im Erbgut schnell und präzise detektiert werden können (14, 16, 32, 38, 50). Dabei stellt die Primer-Extensions-Reaktion, die auf dem MALDI-TOF MS-Verfahren basiert, das am besten für die Genotypisierung von Einzelbasenaustauschen optimierte Verfahren dar (14). Hier entstehen durch eine Primer-Verlängerung („Primer-Extension“) SNP-spezifische Primer-Extensionsprodukte, die ein unterschiedliches Gewicht besitzen und sich somit massenspektrometrisch unterscheiden lassen (14, 16). Bevor ein SNP mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert werden kann, muss der den Basenaustausch flankierende Bereich mit Hilfe einer PCR vervielfältigt werden, wobei die Primer so gewählt werden, dass PCR-Amplifikate entstehen, die ca. 100 bp groß sind, damit eine möglichst hohe PCR-Effizienz erreicht wird (14). Hat man diese Amplifikate hergestellt, kann man sie anschließend für die Primer-Extensionsproduktion als Template verwenden (14). Die SNP-spezifische Extension nach der hME-Methode („Homogeneous-Mass-ExtentTM“) wird für die Bestimmung von Allelfrequenzen und für die Einzelgenotypisierung im 384-Well-Format angewendet (10, 20, 33-35).

2.10.2 Vorbereitung der Platten für die MALDI-TOF

Um die Quantität der DNA der Studienpopulation zu erhöhen, wurde die Methode der „Primer Extension Preamplification“ (PEP) angewendet (siehe 2.2.1). Damit konnte der DNA-Gehalt jeder Probe auf eine Konzentration von 20 ng/μl erhöht werden.

In einem anschließenden Verdünnungsschritt (1:20) wurden die einzelnen Proben mit einem DNA-Gehalt von 1 ng/μl auf 96-er Clusterplates (Mutterplatten) (6.7) überführt. Vier solcher Mutterplatten wurden zu einer 384-er Platte (Tochterplatte) nach einem vorgegebenem Schema zusammengefasst. Dabei wurden je 5 μl DNA (1 ng/μl) von der Mutterplatte auf die Tochterplatte mit Hilfe einer Pipettierstation (6.1) überführt und bei Raumluft über Nacht getrocknet. Nach der Trocknung betrug die Gesamtkonzentration je Probe 5 ng.

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

2.10.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der hME-Methode für die MALDI-TOF

Vor der Primer-Extensions-Reaktion wurde der genomische Bereich um den zu untersuchenden SNP mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt, wobei die für die Amplifikation verwendeten „Sense“- und „Antisense“-Primer neben dem sequenzspezifischen Bereich jeweils ein zusätzliches Motiv von zehn Basen aufweisen (14). Dieses zusätzliche Sequenzmotiv, der so genannte „Tag“, ist aus verschiedenen Gründen notwendig (14). Einerseits verläuft die Amplifikationsreaktion gleichmäßiger, wenn mehrere PCR-Reaktionen in einem Reaktionsgefäß stattfinden, andererseits muss die Masse dieser Primer mit Hilfe des „Tags“ erhöht werden, damit sie bei der anschließenden MALDI-TOF Analyse nicht im Massenbereich der Primer-Extensionsprodukte liegen und somit außerhalb des eingestellten Massenfensters sind, da bei der hME-Methode die überschüssigen, in der PCR unverbrauchten Primer nicht entfernt werden (14).

Die verwendeten Sense- und Antisense-Primer können folgender Tabelle entnommen werden:

Tabelle 2.11: Verwendete Sense- und Anti-Sense-Primer für die jeweiligen Polymorphismen

Polymorphismus	Sense-Primer	Antisense-Primer
SOCS3_G1051A	ACGTTGGATGCTGCCAGGG AATCTTCAAAC	ACGTTGGATGTCCACAACCAGC TCAGGTTT
SOCS3_G1267A	ACGTTGGATGGGTGACCTG AAGGGAACCAT	ACGTTGGATGGGTAGACTTTGG AACCTGTG
SOCS3_C1384T	ACGTTGGATGGGCCCTTCC TCCGTTTAAAG	ACGTTGGATGGAGTAGGAAAAG GAGACCAG

2.10.4 SAP-Reaktion

Mit Hilfe eines speziellen Enzyms, der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 6.5.2) wurden nach erfolgter PCR freie, nicht in das Amplifikat eingebaute Desoxynukleotide abgebaut (14). Dies ist notwendig, da durch die freien Nukleotide andere als die vorher bestimmten Primer-Extensionsprodukte entstehen würden, was problematisch für eine korrekte SNP-Detektion wäre (14).

2.10.5 Primer-Extensions-Reaktion

Die eingesetzten Primer werden so gewählt, dass das Ende des Primers direkt vor dem zu detektierenden SNP liegt. Die Verwendung von ddNTPs führt je nach Vorliegen des entsprechenden Allels zum Kettenabbruch und somit auch zu unterschiedlich großen Extensionsprodukten, die sich in der MALDI-TOF analysieren lassen (14). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten hME-Extensions-Primer sind in Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Verwendete Extensions-Primer

Polymorphismus	Extensions-Primer
SOCS3_G1051A	AATCAAAGAGCAAACAAGTTC (rev)
SOCS3_G1267A	GAGGAGAGGATGTGGGG (rev)
SOCS3_C1384T	CAGCTGACCAGCCCATCC (rev)

2.10.6 Aufreinigung der Extensionsprodukte

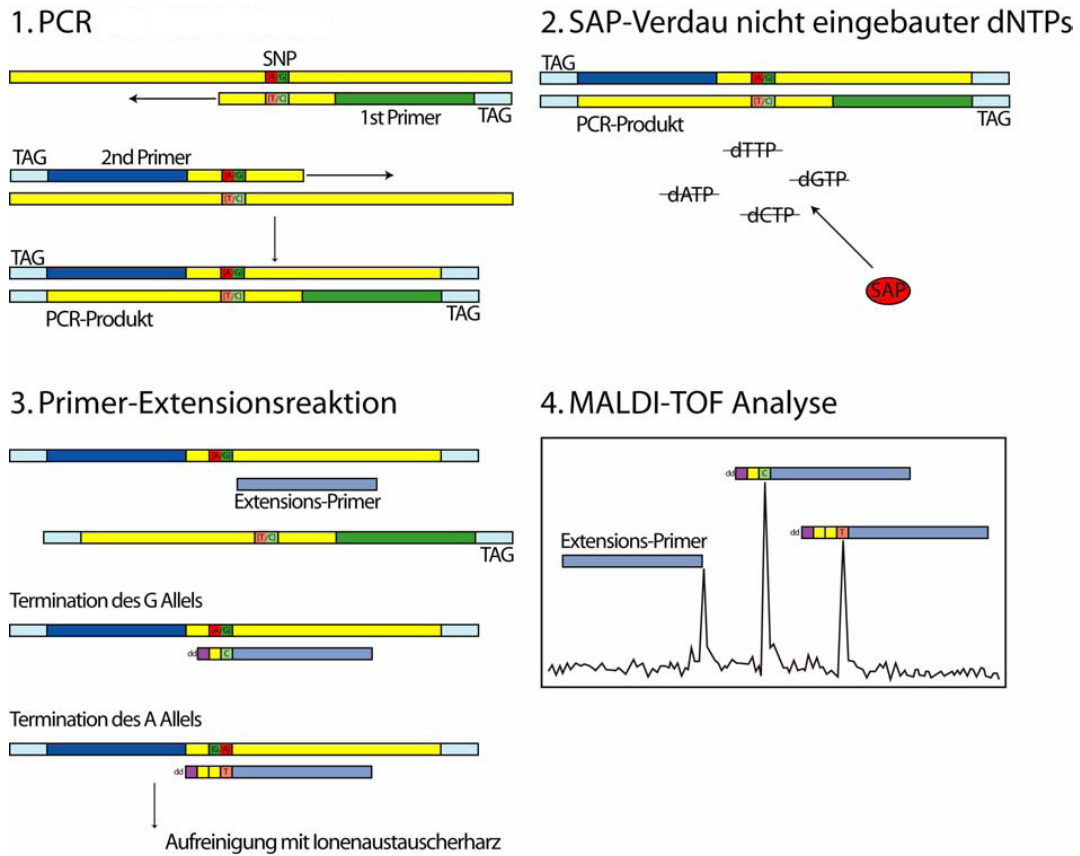
In einem letzten Schritt wurden die Extensionsprodukte mittels eines Kationenaustauschharzes (SpectroClean™, 6.3.4) aufgereinigt, bevor sie massenspektrometrisch analysiert werden konnten. Dieser Arbeitsschritt ist notwendig, um z.B. letzte Pufferbestandteile oder Mg^{2+} zu entfernen, die die anschließende Detektion negativ beeinflussen könnten. Nach einem Standardprotokoll wurden zusätzlich zu Spectroclean noch 16 μ l H_2O pro Well mit Hilfe des Multimek-Pipettierroboters (6.1) zupipettiert. Zentrifugation und Rotation schlossen sich abschließend an.

2.10.7 MALDI-TOF-Massenspektrometrie im Rahmen der hME-Methode

Nach erfolgter Probenaufbereitung wurden 1-2 nl des Analytengemisches mit Hilfe eines Nanoliter-Pipettiersystems (6.1) auf einen Siliziumchip transferiert. Nach Beladung des Chips wurde dieser auf einen metallischen Probenträger übertragen und in die Vakuumschleuse des MassARRAY™ Massenspektrometers (6.1) eingeführt. Die Vermessung der Proben und Analyse sowie Kalibrierung des Systems erfolgten automatisch nach Standardeinstellungen.

In der folgenden Abbildung (2.1) ist der Ablauf der hME-Methode zusammengefasst in schematischer Form dargestellt (14):

Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der hME-Methode



2.11 Statistische Auswertung

2.11.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Genotypfrequenzen sind zum Teil durch ein Vererbungsmuster bestimmt. Meist geht man von zufälliger Paarung aus. Um die Genotypfrequenzen unter Zufallspaarung abzuleiten, sind ein paar zusätzliche Annahmen zu treffen. Insgesamt fassen folgende Annahmen das Modell von Hardy-Weinberg zusammen (19):

- Der Organismus ist diploid
- Vermehrung ist geschlechtlich
- Generationen überlappen sich nicht
- Das Gen unter Betrachtung hat zwei Allele
- Allelfrequenzen bei Männern und Frauen sind gleich
- Paarung ist zufällig, es herrscht Panmixie, d.h. die Individuen können sich uneingeschränkt und mit gleicher Wahrscheinlichkeit paaren
- die Population ist sehr bzw. unendlich groß
- Mutationen kommen nicht vor oder können ignoriert werden
- es tritt kein Gendrift, keine Populationsabsplattung und keine Genmigration ein
- natürliche Selektion betrifft nicht die Allele, die unter Betrachtung sind.

Im Modell von Hardy-Weinberg gibt es eine mathematische Beziehung zwischen der Allelfrequenz und der Genotypfrequenz, die gegeben ist durch

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

wobei p und q die Allelfrequenzen von A und a, p^2 , $2pq$ und q^2 die Häufigkeit der jeweiligen Genotypen darstellen. Die Frequenzen der Gleichungen konstituieren das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (oder Hardy-Weinberg-Equilibrium = HWE). Ist das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht erfüllt, so deutet dies auf eine Verletzung der Modellannahmen hin (grobe Abweichungen vom HWE lassen in der Praxis meist auf ein Problem bei der Genotypisierung schliessen).

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

2.11.2 Assoziationsstudien

2.11.2.1 Auswertung von kategorischen Variablen

Ob ein Zusammenhang zwischen den Genotypen der SOCS3-SNPs mit bestimmten dichotomen Phänotypen besteht, wurde mit verschiedenen Chi-Quadrat-Tests sowie mittels Armitage-Trend-Tests geprüft. Dabei wurde einem Vorgehen von Sasieni gefolgt (Sasieni, 1997), der verschiedene Modelle aufführt:

- das lineare Modell, das eine Zu- oder Abnahme einer Krankheitsproblematik mit wachsender Anzahl eines Allels annimmt.
- das allelische Modell, bei welchem die Häufigkeiten der Allele zwischen Patienten und Gesunden verglichen werden.
- und das dominante Modell (dominant auf dem seltenen Allel), welches auch als „serological“ bezeichnet wird, bei welchem der heterozygote Genotyp mit dem Polymorphismus zusammengefasst wird, was dann zu einem Vierfelder-Chi-Quadrat-Test führt.
- Außerdem werden bei Sasieni zwei weitere Vierfelder-Chi-Quadrat-Tests angeführt, bei dem einmal nur die Häufigkeiten von Wildtyp und heterozygoten Genotyp, einmal die Häufigkeiten von Wildtyp und Polymorphismus berücksichtigt sind.

Lediglich das lineare Modell verlangt den Armitage-Trend-Test. Die anderen Modelle verwenden den Chi-Quadrat-Test, um eine potentielle Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp zu entdecken.

Als Effektmaß sämtlicher Tests wird die Odds Ratio (= OR) angegeben, welche das Chancenverhältnis zwischen zwei Gruppen darstellt, eine Krankheit zu bekommen. Bei einer OR für Asthma von 2:1 für die Gruppen mit Mutation/ohne Mutation bedeutet dies: Die Chance, an Asthma zu erkranken ist in der Gruppe mit Mutation doppelt so hoch wie in der Gruppe ohne Mutation.

Odds Ratios werden stets mit 95 %igem Konfidenzintervall angegeben. (d.h. in 95 % aller Ziehungen würde die wahre Odds Ratio innerhalb des Konfidenzintervalls liegen).

2.11.2.2 Auswertung von kontinuierlichen Variablen

Zur Bestimmung der potentiellen Auswirkung der Genotypen auf den IgE-Spiegel wurde getestet, ob sich die Mittelwerte zwischen den Genotypen signifikant unterscheiden.

Dazu wurden zuerst univariate Varianzanalysen gerechnet, welcher die Nullhypothese zugrunde liegt (keine Mittelwertsunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen, d.h. hier keine Mittelwertsunterschiede zwischen verschiedenen Genotypen).

Zusätzlich wurden die Mittelwertsunterschiede auf einem rezessiven Modell getestet, wobei der t-Test verwendet wurde. Das rezessive Modell fasst Polymorphismus und heterozygoten Genotyp zu einer Gruppe zusammen und vergleicht diese Gruppe mit dem Wildtyp.

Sämtliche Tests wurden zweiseitig durchgeführt und als Signifikanzniveau wurde ein α von 0,05 festgelegt. Die Assoziationsanalysen sowie die Tests auf Abweichungen vom HWE wurden mit SAS 9.1.3 oder SAS/Genetics durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Mutationsscreening

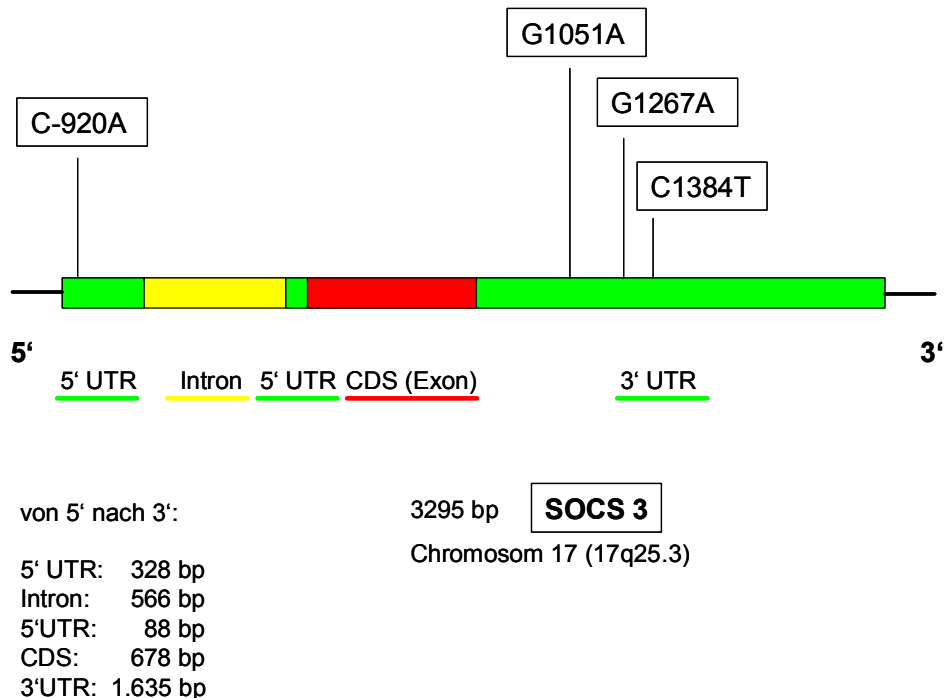
Das SOCS3-Gen wurde im Rahmen des Mutationsscreenings in neun aufeinander folgende Fragmente aufgeteilt und bei 45 Probanden (= 90 Chromosomen) sequenziert. Insgesamt wurden damit 405 Fragmente analysiert. Dabei kam es innerhalb der Screeningpopulation zu sechs Sequenzierausfällen in Fragment 2 und zu einem Ausfall in Fragment 9. Außerdem konnte Fragment 9 bei acht Probanden aufgrund von fehlendem DNA-Material nicht untersucht werden. Letztendlich konnten somit bei 31 Probanden alle neun Fragmente erfolgreich sequenziert werden.

Der zu analysierende Bereich im Bereich des SOCS3-Gens betrug insgesamt 4300 bp. Strukturell teilt sich das Gen, das sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q25.3) befindet, in folgende Abschnitte auf (siehe auch Abb. 3.1): 5`UTR-Region (328 bp) – Intron (566 bp) – 5`UTR-Region (88 bp) – CDS-Region (678 bp) – 3`UTR-Region (1635 bp).

Im Verlauf der Arbeit wurden vier Polymorphismen der untersuchten Testpopulation unter den vorgegebenen Bedingungen (siehe 2.8) identifiziert.

Definitionsgemäß wurden die Polymorphismen als solche beschrieben, wenn sie eine Häufigkeit von über drei Prozent innerhalb der Population erreichten. Das bedeutet, dass bei einer Anzahl von 45 Probanden mindestens dreimal das Allel in der Polymorphismus-Form vorliegen muss („Minor Allele Frequency“ > 0.03). Basenaustausche, die unter dieser Frequenz blieben, wurden als Mutation, nicht aber als Polymorphismus gewertet.

Abb. 3.1: Genkarte von SOCS3 mit eingezeichneten SNPs



3.1.1 Identifikation der Polymorphismen (MAF > 0.03)

Polymorphismus C-920A befindet sich in der ersten 5'UTR-Region, 920 Basenpaare vor Beginn der codierenden Region des Gens (= ATG-Sequenz). In der codierenden Sequenz ist kein Polymorphismus nachzuweisen, die anderen drei identifizierten SNPs sind nach dem codierenden Abschnitt des Gens in der 3'UTR-Region lokalisiert.

Die genaue Bezeichnung und Lokalisation der Polymorphismen kann Tabelle 3.1 entnommen werden. Dabei entsprechen die jeweiligen Ziffern der SNPs der Entfernung in Basenpaaren von der ATG-Sequenz der CDS-Region (= Beginn der codierenden Region).

SNP G1267A und SNP C1384T sind in der aktuellen Version der SNP-Datenbank bereits beschrieben (<http://snpper.chip.org/bio/>). Dabei wird jedem bekannten SNP eine Identifikationsnummer (rs-Nummer) zugewiesen (siehe Tab. 3.1).

SNP C-920A war zu Beginn dieser Arbeit im März 2004 noch nicht bekannt, wurde aber parallel von einer anderen Arbeitsgruppe identifiziert und in die SNP-Datenbank aufgenommen.

SNP G1051A wurde im Rahmen dieser Untersuchungen erstmals entdeckt und an die SNP-Datenbank gemeldet. Die vorläufige Referenznummer (ss-Nummer), die bis zur Vergabe der rs-Nummer dem SNP zugewiesen wurde, ist Tab. 3.1 zu entnehmen.

Tab. 3.1: Bezeichnung und Lokalisation der SNPs im SOCS3-Gen

SNP	Position in Relation zum ATG	Position im Gen	Minor allele frequencies (MAF)	rs-Nummer
1	C-920A	5'UTR	∅	rs12953258
2	G1051A	3'UTR	0.07	ss68074661
3	G1267A	3'UTR	0.09	rs4969169
4	C1384T	3'UTR	0.12	rs4969168

In den beiden Abbildungen 3.2 bzw. 3.3 ist der Bereich der 5'UTR- bzw. 3'UTR-Region, in dem sich die beschriebenen SNPs befinden, auf Basenabfolge-Ebene dargestellt. SNP C-920A befindet sich als einziger der vier Polymorphismen in der ersten 5'UTR-Region. Die drei weiteren identifizierten SNPs sind alle nach dem Exon, jedoch innerhalb der 5'UTR-Region lokalisiert. Dabei liegen alle drei Polymorphismen in einem relativ nahen Bereich von weniger als 340 Basenpaaren beieinander. Entsprechend ihren Bezeichnungen sind sie 1051 Basenpaare (SNP G1051A), 1267 Basenpaare (SNP G1267A) bzw. 1384 Basenpaare (SNP C1384T) vom Beginn der codierenden Region entfernt.

Abb. 3.2: Darstellung SNP im SOCS3-Gen innerhalb der ersten 5' UTR-Region

```
CGCTCAGCCT TTCTCTGCTG CGAGTAGTGA CTAAACATTA CAAGAAGGCC
GGCCGCGCAG TTCCAGGAAT CGGGGGGCGG GCGCGGCGG CCGCCTATAT
ACCCGCGAGC GCGGCCTCCG CGGCGGCTCC GACTTGGACT CCCTGCTCCG 5' UTR-Region
-884 CTGCTGCCGC TTCGGCCCCG CACGCAGCCA GCCGCC[C/A]GCC GCCCGCCCGG SNP C-920A
CCCAGCTCCC GCGCGGGCCC CTTGCCGCGG TCCCTCTCCT GGTCCCCTCC
CGGTTGGTCC GGGGGTGCGC AGGGGGCAGG GCGGGCGCCC AGGGGAAGCT
CGAGGGACGC GCGCGCGAAG GTCCTTTGT GGA CTTCACG GCCGCCAACA
TCTGGGCGCA GCGCGGGCCA CCGCTGGCCG TCTCGCCGCC GCGTCGCCTT
GGGACCCGA GGGGGCTCAG CCCCAAGGAC GGAGACTTCG ATTCGGGACC
AGGTAGGAAG GAGGAGCGG GCGTGGGGAG GGGTCTCGCT CAGTCCCGG Intron
```

Gelbe Markierung: SNP

Grüne Markierung: Basen vor dem Beginn der ersten 5' UTR-Region bzw. Basen des an das Ende der 5' UTR-Region anschließenden Introns

Abb. 3.3: Darstellung SNPs im SOCS3-Gen innerhalb der 3'UTR-Region

```

+619  GTCACCCAGC TGCCGGGGCC CATTCTGGGAG TTCCTGGACC AGTACGATGC  CDS-Region
      CCCGCTTTAA GGGGTAAAGG GCGCAAAGGG CATGGGTCGG GAGAGGGGAC  3'UTR-Region
      GCAGGCCCTT CTCTCCGTG GCACATGGCA CAAGCACAAG AAGCCAACCA
      GGAGAGAGTC CTGTAGCTCT GGGGGGAAAG AGGGCGGACA GGCCCCTCCC
      TCTGCCCTCT CCCTGCAGAA TGTGGCAGGC GGACCTGGAA TGTGTTGGAG
      GGAAGGGGGA GTACCACCTG AGTCTCCAGC TTCTCCGGAG GAGCCAGCTG
      TCCTGGTGGG ACGATAGCAA CCACAAGTGG ATTCTCCTTC AATTCCTCAG
      CTTCCCCTCT GCCTCCAAAC AGGGGACACT TCGGGAATGC TGAACCTAATG
+1.019 AGAACTGCCA GGAATCTTTC AAACCTTTCCA AC[G/A]GAACTTG TTTGCTCTTT SNP G1051A
      GATTTGGTTT AAACCTGAGC TGTTTGTGGA GCCTGGGAAA GGTGGAAGAG
      AGAGAGGTCC TGAGGGCCCC AGGGCTGCGG GCTGGCGAAG GAAATGGTCA
      CACCCCCCGC CCACCCAGG CGAGGATCCT GGTGACATGC TCCTCTCCCT
      GGCTCCGGGG AGAAGGGCTT GGGGTGACCT GAAGGGAACC ATCCTGGT[G/A]C SNP G1267A
      CCCACATCCT CTCTCCGGG ACAGTCACCG AAAACACAGG TTCCAAAGTC
      TACCTGGTGC CTGAGAGCCC AGGGCCCTTC CTCCGTTTTA AGGGGGAAGC
      AACATTTGGA GGGGA[C/T]GGAT GGGCTGGTCA GCTGGTCTCC TTTTCCTACT SNP C1384T
      CATACTATAC CTTCCTGTAC CTGGGTGGAT GGAGCGGGAG GATGGAGGAG
      ACGGGACATC TTTCACCTCA GGCTCCTGGT AGAGAAGACA GGGGATTCTA

```

Gelbe Markierung: SNP

Grüne Markierung: Basen der CDS-Region vor Beginn der 3'UTR-Region

Die Polymorphismen erscheinen bei den Probanden der Screeningpopulation jeweils entweder in der heterozygoten Form, weisen also auf beiden DNA-Strängen zwei unterschiedliche Basen auf, oder in der homozygoten Form, in der beide Basen gleichsinnig verändert und somit identisch sind (siehe Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Vorkommen der SNPs bei den Probanden der Screeningpopulation

Proband	C-920A	G1051A	G1267A	C1384T
1	1	1	1	3
2	1	1	1	2
3	1	1	1	2
4	1	1	1	1
5	1	1	1	2
6	1	1	1	2
7	1	1	1	1
8	1	2	1	1
9	1	1	1	1
10	1	1	1	1
11	1	1	1	1
12	1	1	1	1
13	2	1	2	1
14	2	1	1	3
15	1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	1	1	1	1
18	1	1	1	1
19	1	1	1	3
20	1	1	1	3
21	2	1	2	1
22	1	1	1	2
23	1	1	1	1
24	1	1	1	1
25	1	1	1	1
26	1	1	1	1
27	2	1	1	1
28	1	1	1	1
29	1	1	1	1
30	3	1	3	1
31	2	1	2	1
32	1	2	1	1
33	2	1	2	2
34	1	2	1	1
35	1	1	1	1
36	1	1	1	1
37	1	1	1	1
38	2	1	1	1
39	1	1	1	1
40	1	1	1	1
41	1	1	1	1
42	2	1	2	1
43	2	1	2	1
44	1	1	1	2
45	1	1	1	1

1 = Wildtyp; 2 = heterozygot SNP; 3 = homozygot SNP

3.1.2 Identifikation der Mutationen (MAF < 0.03)

Kommt ein Basenaustausch innerhalb der Screeningpopulation nicht ausreichend oft vor um der Definition eines Polymorphismus zu entsprechen (MAF < 0.03), wird dieser Austausch als Mutation gewertet. Insgesamt wurden sechs solche Basenaustausche identifiziert (Tab. 3.3). Alle beobachteten Mutationen treten bei nur einem Probanden der Screeningpopulation und hier in heterozygoter Form auf. Die ersten beiden Mutationen sind vor der codierenden Region in Fragment 1 und Fragment 3 1981 bzw. 1044 Basenpaare vor dem Beginn des Exons lokalisiert. Die übrigen Mutationen befinden sich nach der codierenden Region. Ein Austausch befindet sich in Fragment 6, 708 Basenpaare nach der ATG-Sequenz, die den Beginn des Exons markiert. Zwei weitere Mutationen sind in Fragment 7 (1189 bzw. 1196 Basenpaare vom Beginn der codierenden Sequenz entfernt) lokalisiert, eine letzte befindet sich im abschließenden Fragment 9, 1779 Basenpaare von der ATG-Sequenz entfernt.

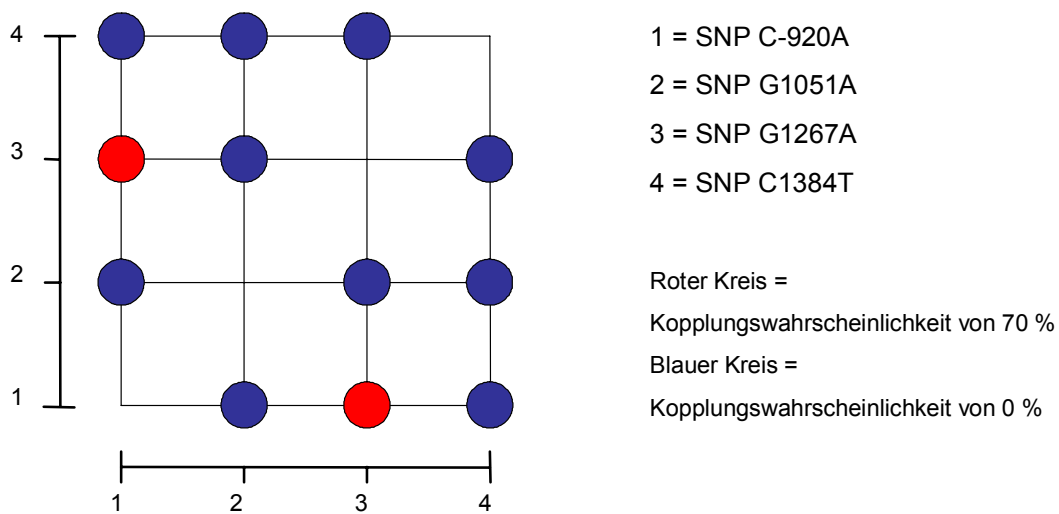
Tab. 3.3: Vorkommen von Mutationen bei den Probanden der Screeningpopulation

Proband	Lokalisation
31	T-1981C; heterozygote Mutation C/T
14	A-1044C; heterozygote Mutation C/A
28	A708G; heterozygote Mutation G/A
35	T1189C; heterozygote Mutation C/T
14	T1196C ; heterozygote Mutation C/T
29	G1779A; heterozygote Mutation A/G

3.1.3 Linkage Disequilibrium der SOCS3-Polymorphismen

Bei der Betrachtung der Verteilung der Polymorphismen innerhalb der Probandenpopulation lässt sich erkennen, ob bestimmte SNPs gekoppelt sind, also gemeinsam vererbt werden. Nach statistischer Überprüfung der Kopplungswahrscheinlichkeiten für die identifizierten vier Polymorphismen ergibt sich eine Kopplungsrate von 0.7 für SNP C-920A mit SNP G1267A. Das heißt, es besteht eine Wahrscheinlichkeit von 70 %, dass beide SNPs gemeinsam in der nachfolgenden Generation auftreten (siehe Abb. 3.4).

Abb. 3.4: Kopplungswahrscheinlichkeiten der vier Polymorphismen



3.2 Assoziationsstudie

Insgesamt wurden vier Polymorphismen identifiziert, von denen sich einer in der ersten 5'UTR-Region vor der CDS-Region befindet. Die anderen drei SNPs sind in der 3'UTR-Region, also nach dem codierenden Bereich lokalisiert. Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen ist, ist SNP C-920A mit einer Wahrscheinlichkeit von 70 Prozent mit SNP G1267A gekoppelt, so dass auf eine Genotypisierung von SNP C-920A verzichtet werden konnte.

Um die Auswirkung der identifizierten Polymorphismen auf die Entstehung von Asthma und asthmaassoziierten Erkrankungen zu untersuchen, wurden Assoziationsstudien durchgeführt.

Dabei wird das Auftreten der in der Screeningpopulation identifizierten SNPs innerhalb der Studienpopulation untersucht, wodurch potentielle Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen der Polymorphismen und dem gehäuften Auftreten atopischer Manifestationen erkannt werden können. Die dabei analysierten atopischen Hauptphänotypen sind Asthma, Heuschnupfen, atopische Dermatitis, atopische Sensibilisierung (= Atopie) und Gesamt-IgE. Außerdem wurden die Subphänotypen „Giemen jemals“ als Hauptsymptom des Asthmas und „Giemen in den letzten zwölf Monaten“ als Maß für die Aktivität der obstruktiven Lungenerkrankung untersucht. Deren Prävalenz im Zusammenhang mit dem Vorkommen der Polymorphismen wurde an insgesamt 3.099 Kindern aus München und Dresden (= Studienpopulation, siehe 2.1.2) getestet.

Dazu wurden die drei SNPs genotypisiert, wobei je nach Genotypisierungsverfahren in der Gesamtpopulation die Rate an erfolgreichen Genotypisierungen zwischen 95.6 und 98.4 % lag (= „call-rate“, siehe folgende Tabelle).

Tab. 3.4: Anteil erfolgreich durchgeführter Genotypisierungen („call-rate“)

SNP		Anzahl Probanden	Anzahl erfolgreicher Typisierungen	erfolgreiche Genotypisierung
G1051A	München+Dresden	3.099	3.048	98.4%
	München	1.159	1.123	96.9%
	Dresden	1.940	1.925	99.2%
G1267A	München+Dresden	3.099	2.963	95.6%
	München	1.159	1.059	91.4%
	Dresden	1.940	1.904	98.1%
C1384T	München+Dresden	3.099	2.998	96.7%
	München	1.159	1.088	93.9%
	Dresden	1.940	1.910	98.5%

Im Rahmen der statistischen Analyse durchliefen die Daten zunächst eine Qualitätskontrolle, den so genannten Hardy-Weinberg-Test. Dieser statistische Test, der den korrekten Ablauf des Genotypisierungsprozesses überprüft, vergleicht die tatsächlich beobachteten Frequenzen mit den erwarteten Werten aus dem entsprechenden mathematischen Gesetz (Hardy-Weinberg-Gesetz: $p^2+2pq+q^2 = 1$). Dieses besagt, dass die Häufigkeiten der beiden homozygoten Genotypen (p = homozygoter Genotyp für das dominante Allel, q = homozygoter Genotyp für das rezessive Allel) und die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps ($= pq$) von Generation zu Generation im Normalfall konstant bleiben (siehe 2.11.1).

Nach der Genotypisierung zeigte SNP G1051A in München eine leichte Abweichung vom HWE (Hardy-Weinberg-Equilibrium) (siehe Tab. 3.5). Zur Klärung der Ursache dieser Abweichung von den erwarteten Genotyp-Frequenzen im HWE bestehen unterschiedliche Ansätze. Häufige Ursachen sind methodische Fehler bei der Genotypisierung (zum Beispiel die Bevorzugung eines Allels durch die Test-Chemie und die daraus folgende fehlerhafte Identifikation). Um eine technische Fehlerquelle weitestgehend ausschließen zu können, wurde die Genotypisierung von SNP G1051A unter unterschiedlichen chemischen Bedingungen wiederholt. Dabei ergaben sich im

Vergleich zur ersten Untersuchung identische Ergebnisse, so dass eine technische Ursache für den abweichenden Wert nahezu ausgeschlossen werden konnte.

Alternative Erklärungsmöglichkeiten stellen biologische Effekte oder bestimmte Charakteristika von Populationen dar, die zu einer unerwarteten Allelverteilung führen können. Diese kann zum Beispiel auf starke Gründer-Effekte oder eindeutige Reproduktionsvorteile bestimmter Polymorphismen zurückzuführen sein (28).

Im Falle von SNP G1051A, bei dem eine technische Fehlerquelle beim Genotypisierungsprozess ausgeschlossen werden konnte, erreichte die geringe Abweichung vom HWE wohl aufgrund der Stichprobengröße Signifikanz, so dass im Folgenden die Ergebnisse der statistischen Analyse dieses SNPs in die Auswertungen miteinbezogen werden konnten.

Tab. 3.5: HWE-Ergebnisse der SNPs für München und Dresden

SNP		Genotyp-Frequenz			
		München	p-Wert HWE	Dresden	p-Wert HWE
G1051A	beobachtet	GG 0.88/GA 0.11/AA 0.01	0.0038	GG 0.86/GA 0.13/AA<0.01	0.3349
	erwartet	GG 0.86/GA 0.13/AA <0.01		GG 0.86/GA 0.13/AA<0.01	
G1267A	beobachtet	GG 0.87/GA 0.13/AA <0.01	0.3558	GG 0.82/GA 0.17/AA <0.01	0.6847
	erwartet	GG 0.86/GA 0.13/AA <0.01		GG 0.82/GA 0.17/AA <0.01	
C1384T	beobachtet	CC 0.76/CT 0.23/TT 0.01	0.3321	CC 0.79/CT 0.20/TT 0.01	0.8241
	erwartet	CC 0.77/CT 0.22/TT 0.02		CC 0.79/CT 0.20/TT 0.01	

vom HWE-Wert abweichendes Ergebnis = fett gedruckt

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

Um eine Aussage über einen etwaigen Einfluss von Umwelteffekten treffen zu können, wurden die statistischen Auswertungen sowohl für beide Städte getrennt als auch für München und Dresden gemeinsam durchgeführt.

Die Resultate sind mit Angabe der Risiko-Ratio-Werte („odds ratio“ = OR), dem dazugehörigen Konfidenzintervall (in Klammern) und dem p-Wert in den Tabellen 3.6 bis 3.11 dargestellt und werden im Folgenden erläutert.

3.2.1 Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP G1051A

SNP G1051A zeigte in der HWE-Analyse eine leichte, aber signifikante Abweichung. Aufgrund der darauf durchgeführten Qualitätsüberprüfung konnte jedoch kein technischer Genotypisierungsfehler ermittelt werden, so dass SNP G1051A in die Auswertung aufgenommen wurde.

Eine erfolgreiche Genotypisierung gelang in der Gesamtpopulation bei 98,4 %, bei 1.123 Kindern in München und 1.925 Kindern in Dresden (siehe Tab. 3.4). Die Frequenz des selteneren, polymorphen Allels lag bei 7 % (MAF). Dieses Ergebnis konnte nicht mit bisherig durchgeführten Genotypisierungen anderer Populationen verglichen werden, da dieser SNP im Rahmen dieser Arbeit neu identifiziert wurde.

In einem ersten Schritt wurde die Assoziation von G1051A mit den atopischen Hauptphänotypen geprüft, die vorab definiert wurden (Asthma, Atopie, atopische Dermatitis und allergische Rhinitis).

In der Gesamtanalyse, in die alle Kinder aus beiden Städten eingeschlossen waren, zeigte SNP G1051A einen protektiven Effekt auf die Ausprägung von Asthma. Dieser Effekt erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau von 0.05. Außerdem ergab sich in der Gesamtanalyse ein Trend für eine signifikante Assoziation zur erhöhten Prävalenz von Neurodermitis.

In einem zweiten Schritt wurde eine nach Städten stratifizierte Analyse durchgeführt. Dabei zeigte SNP G1051A in München einen leicht protektiven Effekt für Asthma, Heuschnupfen und Atopie. Allerdings erreichten die Daten bei keinem der drei Phänotypen ein signifikantes Niveau. Im Gegensatz dazu ergab sich in Dresden ein signifikantes Ergebnis für Neurodermitis, und zwar im Sinne eines erhöhten Vorkommens der Erkrankung im Zusammenhang mit dem Auftreten des Polymorphismus. Wie auch schon in der Gesamtanalyse und den Münchner Ergebnissen zeigte sich in Dresden zusätzlich ein leicht protektiver Effekt des SNPs für Asthma, der aber auch hier kein signifikantes Niveau annahm.

Da SNP G1051A Zusammenhänge zur Asthmaausprägung aufwies, wurde auch die Assoziation mit dem Auftreten von Giemen überprüft. Dieser Subphänotyp sollte ähnliche Ergebnisse zeigen wie der Phänotyp Asthma, da das Auftreten giemender Atemgeräusche eng mit der Asthmaerkrankung assoziiert ist. Bei den Analysen wurde zwischen zwei Formen des Giemens unterschieden. Zum einen wurde „Giemen in den letzten zwölf Monaten“ als Maß für die aktuelle Krankheitsaktivität untersucht, zum anderen „Giemen, das irgendwann schon einmal aufgetreten ist“ (in Tab. 3.9 als „Giemen jemals“ bezeichnet). Bei SNP G1051A zeigte sich sowohl in der Gesamtanalyse als auch bei den Dresdner Daten ein leicht protektiver Effekt für das Vorkommen von „Giemen im letzten Jahr“, der, wie die protektiven Resultate für Asthma, jedoch kein signifikantes Niveau erreichte.

Um zu analysieren, ob es sich bei den beobachteten Asthma-Assoziationen um atopische bzw. nicht-atopische Asthma-Formen handelte, wurde eine nach diesen beiden Erscheinungsformen stratifizierte Untersuchung angeschlossen. Dabei ergab sich wieder die Tendenz eines protektiven Effekts in Richtung atopischen Asthmas für München bzw. die gemeinsame Betrachtung beider Städte, die allerdings nicht signifikant war.

3.2.2 Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP G1267A

Die Genotypisierung wurde in der Gesamtpopulation bei SNP G1267A in 95.6 % der Fälle erfolgreich durchgeführt. Dabei gelang die Untersuchung bei 1.059 Kindern in München und bei 1.904 Kindern in Dresden (siehe Tab. 3.4). Das seltenere polymorphe Allel trat bei 9 % (MAF) der Probanden auf. Da in der Literatur bezüglich dieses SNPs keine Angaben zu schon durchgeführten Genotypisierungen anderer Populationen vorlag, konnte dieses Resultat nicht mit weiteren Forschungsergebnissen verglichen werden.

In der Gesamtanalyse der Hauptphänotypen zeigte SNP G1267A eine relativ starke Assoziation zum Phänotyp Asthma im Sinne einer erhöhten Prävalenz, erreichte dabei aber das Signifikanzniveau von 0.05 nicht. Eine ebenso gerichtete Assoziation, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, war für den Phänotyp Atopie zu beobachten.

In der nach Städten stratifizierten Analyse ergaben sich für SNP G1267A in Dresden keine relevanten Ergebnisse bzw. bemerkenswerte Trends. Im Gegensatz dazu zeigte München interessante Resultate: Die Daten für Asthma erreichten hier eindeutig das Signifikanzniveau und deuteten auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Polymorphismus und dem erhöhten Risiko einer Erkrankung hin (R-R = OR 1.69, 95 % KI 1.0-2.8, $p = 0.03$).

Auch bei der Betrachtung des Subphänotyps „Giemen jemals“ zeigte sich sowohl in München als auch bei der gemeinsamen Betrachtung beider Städte ein signifikantes Ergebnis (München: OR 1.56, 95 % KI: 1.1-2.3, $p = 0.03$; München+Dresden: OR 1.28, 95 % KI 1.0-1.6; $p = 0.04$). Auch hier beschreiben die Daten einen fördernden Effekt des SNPs auf die Entwicklung des Krankheitsbildes. Die Beobachtungen für den Phänotyp „Giemen jemals“ konnten somit als Bestätigung für die Ergebnisse, die für Asthma erzielt wurden, gewertet werden. Auch für die vermehrte Prävalenz von „Giemen im letzten Jahr“ zeigte sich bei SNP G1267A in München eine leichte, wenn auch nicht signifikante Assoziation.

Bei der stratifizierten Untersuchung nach Asthmatypen erkannte man eine eindeutige Assoziation des SNPs zu nicht-atopischem Asthma, und zwar sowohl bei der gemeinsamen Betrachtung beider Städte als auch bei der Münchner Population. Die Gesamtanalyse, die die beiden Städte gemeinsam betrachtete, zeigte einen Trend zum erhöhten Risiko der Ausbildung von nicht-atopischem Asthma. Bei der alleinigen

Untersuchung in der Münchner Population ergab sich sogar ein signifikantes Ergebnis (OR 2.25, 95 % KI 1.2-4.3, $p = 0.01$).

3.2.3 Ergebnisse der Assoziationsstudie für SNP C1384T

Der Genotypisierungsprozess verlief bei SNP C1384T in der Gesamtpopulation in 96.7 % der Fälle erfolgreich. Für die einzelnen Städte entsprach dies 1.088 Kindern in München und 1.910 Kindern in Dresden (siehe Tab. 3.4). Das polymorphe, seltenere Allel zeigte sich bei 12 % (MAF) der Probanden. Dies ist ein deutlich niedrigeres Ergebnis als das bisheriger Untersuchungen. So ergab sich in einer anderen Studie, die das Auftreten des SNPs innerhalb einer europäischen Population untersuchte, eine MAF von 17,5 % (Informationen zu dieser Population unter <http://www.hapmap.org/citinghapmap.html.en>).

Bei der Gesamtanalyse der Hauptphänotypen ergab sich für SNP C1384T eine deutliche Assoziation zum erhöhten Vorkommen des Phänotyps Asthma (OR 1.46, 95 % KI 1.1-1.9, $p = 0.01$). Für die weiteren Hauptphänotypen zeigten sich keine nennenswerten Assoziationen.

Bei der stratifizierten Analyse nach Städten ergab sich in der Münchner Population sowohl für Atopie als auch für Neurodermitis ein leichter atopiefördernder Effekt, der das Signifikanzniveau von 0.05 allerdings nicht erreichte. Klarer sind die Ergebnisse der Dresdner Population. Hier zeigte sich eine deutlich signifikante Assoziation mit dem vermehrten Auftreten von Asthma (OR 1.8, 95 % KI 1.2-2.6, $p = 0.002$).

Für „Giemen im letzten Jahr“ ergaben sich sowohl in der Gesamtanalyse als auch bei der Betrachtung Dresdens signifikante Resultate (München+Dresden: OR 1.45, 95 % KI 1.1-1.9; $p = 0.01$; Dresden: OR 1.54, 95 % KI: 1.1-2.2, $p = 0.02$). Diese zeigten, wie schon beim Phänotyp Asthma, einen risikosteigernden Effekt auf die Krankheitsentstehung. Auch für München ergab sich hier eine entsprechende Tendenz, wenn diese auch nicht das Signifikanzniveau von 0.05 erreichte. Auch für „Giemen jemals“ zeigte sich ein signifikantes Ergebnis in der Population Dresden (OR 1.31, 95 % KI 1.1-1.7, $p = 0.05$) und eine entsprechende Tendenz in der Gesamtpopulation, die allerdings keine Signifikanz erreichte. Diese Beobachtungen für das Nebenkriterium

„Giemen jemals“ stärkten in besonderem Maße die sich für SNP C1384T ergebende signifikante Assoziation zum Phänotyp Asthma.

Bei der stratifizierten Untersuchung nach Asthmatypen zeigten sich verschiedene Assoziationen unterschiedlichen Ausmaßes sowohl zu atopischem als auch zu nicht-atopischem Asthma, die alle einen Zusammenhang zu einer erhöhten Prävalenz der Erkrankung aufwiesen. In der Gesamtanalyse ergab sich ein signifikantes Resultat für atopisches Asthma (OR 1.52, 95 % KI 1.0-2.3, $p = 0.04$) und gleichzeitig ein Trend für die Ausbildung nicht-atopischen Asthmas. Genau umgekehrt verhielt es sich in der Dresdner Population: Hier zeigte sich ein hoch signifikantes Ergebnis für nicht-atopisches Asthma (OR 2.0, 95 % KI 1.2-3.4, $p = 0.01$) und zusätzlich ein Trend für atopisches Asthma. In der Münchner Population ergab sich lediglich eine Tendenz für das vermehrte Auftreten atopischen Asthmas.

Tab. 3.6: Assoziation der SNPs mit atopischen Erkrankungen und Atopieausprägung in der Population München + Dresden

Phänotyp	Asthma	Heuschnupfen	Neurodermitis	Atopie
G1051A	OR 0.75 (0.50-1.11) $p = 0.15$	OR 1.19 (0.85-1.68) $p = 0.31$	OR 1.27 (0.98-1.65) $p = 0.07$	OR 0.96 (0.76-1.23) $p = 0.77$
G1267A	OR 1.30 (0.94-1.80) $p = 0.11$	OR 1.02 (0.72-1.44) $p = 0.91$	OR 0.88 (0.67-1.15) $p = 0.35$	OR 1.15 (0.92-1.44) $p = 0.22$
C1384T	OR 1.46 (1.10-1.94) $p = 0.01$	OR 0.90 (0.66-1.23) $p = 0.52$	OR 1.02 (0.82-1.28) $p = 0.85$	OR 1.00 (0.82-1.22) $p = 0.98$

Dominantes Modell (Wildtyp vs. Heterozygot+Polymorphismus),
signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0.05$) fett gedruckt

Tab. 3.7: Assoziation der SNPs mit atopischen Erkrankungen und Atopieausprägung in der Population München

Phänotyp	Asthma	Heuschnupfen	Neurodermitis	Atopie
G1051A	OR 0.79 (0.43-1.45) p = 0.45	OR 0.73 (0.36-1.50) p = 0.39	OR 1.12 (0.71-1.74) p = 0.63	OR 0.82 (0.53-1.25) p = 0.35
G1267A	OR 1.69 (1.04-2.79) p = 0.03	OR 0.86 (0.44-1.71) p = 0.67	OR 0.88 (0.55-1.41) p = 0.59	OR 1.19 (0.79-1.77) p = 0.40
C1384T	OR 1.11 (0.72-1.71) p = 0.65	OR 1.02 (0.62-1.69) p = 0.93	OR 1.17 (0.82-1.66) p = 0.38	OR 1.18 (0.86-1.63) p = 0.30

Dominantes Modell (Wildtyp vs. Heterozygot+Polymorphismus),
signifikantes Ergebnis ($\alpha < 0.05$) fett gedruckt

Tab. 3.8: Assoziation der SNPs mit atopischen Erkrankungen und Atopieausprägung in der Population Dresden

Phänotyp	Asthma	Heuschnupfen	Neurodermitis	Atopie
G1051A	OR 0.74 (0.43-1.26) p = 0.26	OR 1.43 (0.96-2.12) p = 0.78	OR 1.37 (1.00-1.88) p = 0.05	OR 1.04 (0.78-1.40) p = 0.79
G1267A	OR 1.15 (0.74-1.78) p = 0.53	OR 1.07 (0.72-1.61) p = 0.73	OR 0.89 (0.64-1.23) p = 0.49	OR 1.13 (0.86-1.47) p = 0.38
C1384T	OR 1.79 (1.23-2.59) p = 0.002	OR 0.84 (0.57-1.25) p = 0.40	OR 0.92 (0.68-1.25) p = 0.60	OR 0.89 (0.69-1.16) p = 0.42

Dominantes Modell (Wildtyp vs. Heterozygot+Polymorphismus),
signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0.05$) fett gedruckt

Tab. 3.9: Assoziation der SNPs mit „Giemen im letzten Jahr“/„Giemen jemals“ in den jeweiligen Populationen

Phänotyp		Giemen im letzten Jahr	Giemen jemals
G1051A	München	OR 0.92 (0.45-1.77) p = 0.81	OR 1.01 (0.66-1.55) p = 0.97
	Dresden	OR 0.72 (0.43-1.21) p = 0.21	OR 0.90 (0.65-1.25) p = 0.54
	München + Dresden	OR 0.79 (0.52-1.18) p = 0.25	OR 0.93 (0.72-1.21) p = 0.60
G1267A	München	OR 1.34 (0.76-2.46) p = 0.29	OR 1.56 (1.05-2.32) p = 0.03
	Dresden	OR 0.82 (0.52-1.30) p = 0.40	OR 1.18 (0.88-1.57) p = 0.27
	München + Dresden	OR 0.98 (0.68-1.40) p = 0.89	OR 1.28 (1.01-1.61) p = 0.04
C1384T	München	OR 1.31 (0.81-2.11) p = 0.27	OR 1.01 (0.72-1.41) p = 0.97
	Dresden	OR 1.54 (1.06-2.22) p = 0.02	OR 1.31 (1.01-1.70) p = 0.05
	München + Dresden	OR 1.45 (1.08-1.94) p = 0.01	OR 1.90 (0.96-1.46) p = 0.11

Tab. 3.10: Assoziation der SNPs mit atopischem/nicht-atopischem Asthma in den jeweiligen Populationen

Phänotyp		Asthma atopisch	Asthma nicht-atopisch
G1051A	München	OR 0.49 (0.17-1.38) p = 0.17	OR 1.14 (0.55-2.38) p = 0.73
	Dresden	OR 0.86 (0.40-1.83) p = 0.69	OR 0.71 (0.32-1.58) p = 0.34
	München + Dresden	OR 0.67 (0.37-1.23) p = 0.20	OR 0.89 (0.52-1.52) p = 0.66
G1267A	München	OR 1.39 (0.66-2.93) p = 0.39	OR 2.25 (1.19-4.27) p = 0.01
	Dresden	OR 1.22 (0.64-2.34) p = 0.54	OR 1.11 (0.58-2.11) p = 0.76
	München + Dresden	OR 1.23 (0.76-2.01) p = 0.40	OR 1.48 (0.94-2.32) p = 0.09
C1384T	München	OR 1.37 (0.76-2.47) p = 0.29	OR 0.89 (0.47-1.69) p = 0.73
	Dresden	OR 1.64 (0.94-2.86) p = 0.08	OR 1.99 (1.18-3.35) p = 0.01
	München + Dresden	OR 1.52 (1.01-2.28) p = 0.04	OR 1.41 (0.94-2.09) p = 0.09

Dominantes Modell (Wildtyp vs. Heterozygot+Polymorphismus),
signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0.05$) fett gedruckt

3.2.4 Haplotypanalyse

Um Informationen darüber zu erhalten, inwieweit die Kombination verschiedener Allele (Haplotypen) die Entstehung von atopischem bzw. nicht-atopischem Asthma beeinflusst, wurde eine Haplotypanalyse durchgeführt. Diese analysiert die möglichen Kombinationen der identifizierten SNPs in Wildtyp- bzw. polymorpher Form und untersucht deren Auswirkung auf atopisches bzw. nicht-atopisches Asthma (Tab. 3.11). Vier Haplotypen zeigten dabei eine hohe Frequenz. Die am häufigsten vorkommende Kombination von Polymorphismen erreichte einen Wert von über 72 %. Dieser Haplotyp (G-G-C), bei dem alle drei Polymorphismen in Wildtypform auftraten, zeigte

einen protektiven Trend für nicht-atopisches und atopisches Asthma. Einer der drei anderen Haplotypen (Frequenzen zwischen sieben und zwölf Prozent, siehe Tab. 3.11), war mit einem signifikant erhöhten Risiko für atopisches Asthma vergesellschaftet (Haplotyp G-G-T, Frequenz = 11.6 %; OR 2.17, 95 % KI 1.0-4.5, p = 0.04). Zusätzlich zeigte er einen Trend für das erhöhte Vorkommen nicht-atopischen Astmas. An dieser Kombination waren SNP G1051A und SNP G1267A in ihrer Wildtypform beteiligt, SNP C1384T trat hier als einziger der SNPs in seiner polymorphen Form auf. Daraus ließ sich schließen, dass das Vorkommen der drei Polymorphismen in dieser Verknüpfung zu einem signifikant höheren Auftreten von Asthma führt.

Die beiden anderen niederfrequenten SNP-Kombinationen gaben jeweils Hinweis auf einen protektiven Effekt im Zusammenhang mit dem Phänotyp Asthma (Haplotyp A-G-C, Frequenz = 7.4 %), sowohl in der atopischen als auch in der nicht-atopischen Form, bzw. auf ein erhöhtes Vorkommen beider Asthmatypen im Zusammenhang mit dem Auftreten der Polymorphismen in der jeweiligen Kombination (Haplotyp G-A-C, Frequenz = 8.3). Allerdings erreichten diese beiden Haplotypen, genau wie die häufig vorkommende Kombination der Wildtypallele G-G-C (Haplotyp 1, siehe Tab. 3.11), nicht das Signifikanz-Niveau.

Tab. 3.11: SOCS3 Haplotypen und Haplotypfrequenzen für atopisches/nicht-atopisches Asthma

Nummer	Haplotyp	Frequenz (%) *	Asthma atopisch	Asthma nicht-atopisch
1	G-G-C	72.52	OR 0.68 (0.38-1.20) p = 0.18	OR 0.59 (0.34-1.03) p = 0.06
2	G-G-T	11.59	OR 2.17 (1.03-4.54) p = 0.04	OR 1.99 (0.96-4.12) p = 0.06
3	G-A-C	8.30	OR 1.57 (0.66-3.76) p = 0.32	OR 1.81 (0.79-4.19) p = 0.16
4	A-G-C	7.42	OR 0.47 (0.15-1.52) p = 0.21	OR 0.75 (0.27-2.09) p = 0.58

* = innerhalb aller Probanden für Asthma
signifikante Ergebnisse ($\alpha < 0.05$) fett gedruckt

3.3 Phylogenetische Untersuchung

Im Rahmen der Assoziationsstudien wurde gezeigt, dass die untersuchten SNPs mit der Prävalenz verschiedener atopischer Phänotypen vergesellschaftet sind.

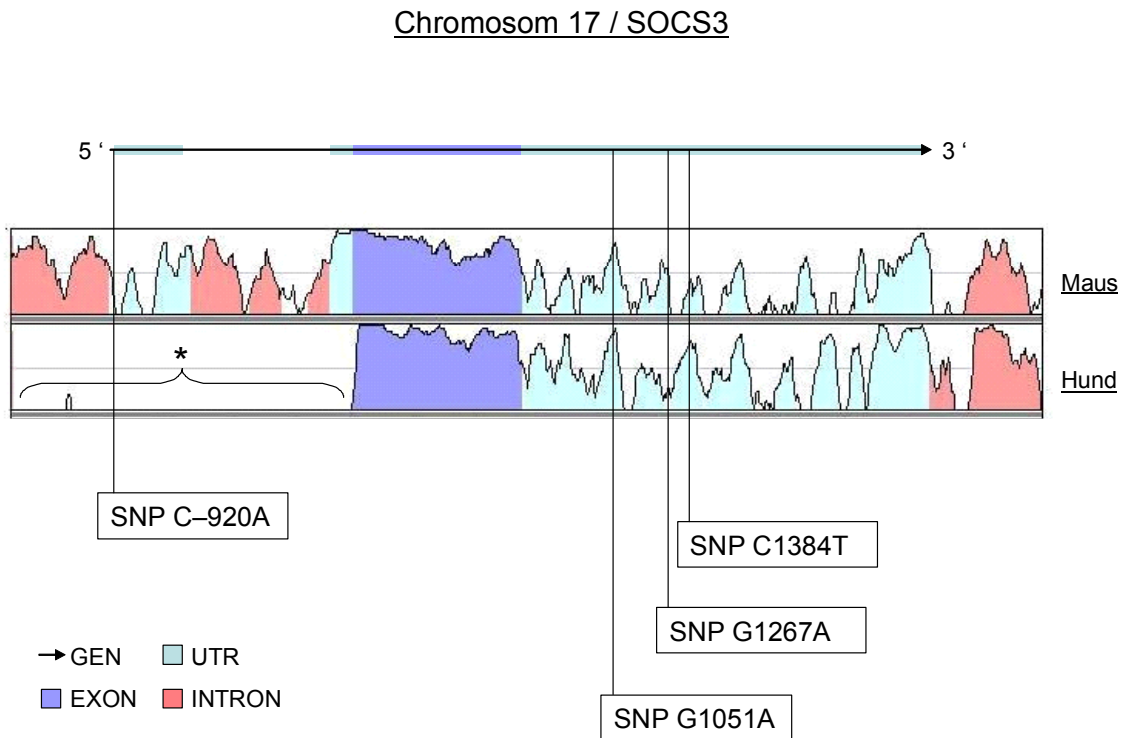
Im nächsten Schritt sollte nun geklärt werden, ob bzw. welche dieser SNPs möglicherweise auch zu einer kausalen Veränderung der Funktion von SOCS3 beitragen können. Alternativ könnte es sich bei den beobachteten Assoziationen mit den untersuchten Polymorphismen eher nur um genetische Marker für andere, korrelierte Polymorphismen handeln. Um Hinweise auf eine mögliche funktionelle Relevanz zu erhalten, wurde die evolutionäre Konservierung der Genabschnitte untersucht, die SOCS3-Polymorphismen enthalten. Aus früheren systematischen Studien des Genoms ist bekannt, dass Genomabschnitte, die wichtige Funktionen erfüllen (z.B. Bereiche, die für die Proteintranslation, also für Exons, codieren, aber auch regulatorische Regionen wie Promotoren oder Enhancer), während der Evolution fast unverändert beibehalten wurden. So gleichen sich zum Beispiel Maus und Mensch in der codierenden Sequenz wichtiger Gene zu mehr als 80 Prozent. Diese hohe Konservierung von funktionell relevanten Genomabschnitten wurde nun dafür verwendet, die mögliche Rolle von SOCS3-SNPs für die Funktion des SOCS3-Gens besser zu analysieren. Ein hohes Maß an Konservierung der SNP-tragenden Sequenzen spricht dabei für funktionelle Relevanz.

3.3.1 Phylogenetischer Vergleich Mensch – Maus – Hund

In einem ersten Schritt wurde die humane SOCS3-Sequenz mit weit entfernten Spezies (Maus bzw. Hund) verglichen. Wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist, zeigte sich eine hohe Homologierate zwischen allen drei Spezies im Exonbereich (Kurvenverlauf der Abbildung entnommen aus <http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>). Diese Beobachtung ist nicht unerwartet, allerdings ist bemerkenswert, dass auch im Intron- bzw. den 3`/5`-Regionen Abschnitte außergewöhnlich hoher Konservierung auftreten. Dies spricht für eine funktionelle Relevanz dieser Bereiche, legt also ihr Eingreifen in die Regulation der Genexpression nahe. Alle in der 3`UTR-Region lokalisierten SNPs fallen, sowohl beim Hunde- als auch beim Maus-Vergleich, in solche Abschnitte hoher

Kongruenz (im Bereich zwischen 60 und 90 Prozent). Besonders hoch ist die Übereinstimmung bei den SNPs G1051A und C1384T.

Abb. 3.5: SOCS3-Gen bei Maus bzw. Hund im Vergleich zum Menschen



Hoher Kurvenausschlag = hohe Sequenzanalogierate zum menschlichen Genom;
Berechnung der Sequenzanalogien unter Zusammenfassung von jeweils 50 Basenpaaren;
(* = fehlende Sequenzdaten im Hundegenom)

3.3.2 Vergleichende Sequenzanalyse der Primatenspezies

Um weiter eingrenzen zu können, wann in der Evolution die Polymorphismen im SOCS3-Gen aufgetreten sind, wurden in einem zweiten Schritt phylogenetische Vergleiche mit näher verwandten Primaten-Spezies durchgeführt. Für den Vergleich zum Menschen wurden unterschiedliche Affenarten (Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan, Gibbon und grüne Meerkatze; siehe 6.7) untersucht. Diese sind in absteigender

Reihenfolge immer weniger mit dem Menschen verwandt und spiegeln somit den evolutionären Primatenstammbaum wider.

Die Tabellen 3.12 und 3.13 zeigen die Verteilung und Anzahl der Mutationen im sequenzierten Bereich bei den verschiedenen Affen-Spezies (Tab. 3.13 fasst für jede Spezies die Anzahl der Mutationen der einzelnen Fragmente zusammen). Dabei gingen Deletionen bzw. Insertionen mehrerer aufeinander folgender Basenpaare jeweils als eine Mutation ein.

Tab. 3.12: Anzahl der Mutationen in den einzelnen Fragmenten des sequenzierten SOCS3-Gens bei den verschiedenen Affen-Spezies

Affen-Spezies	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9
1	5	1	2	0	1	0	6	5	A
2	9	5	4	4	2	7	10	4	1
3	A	11	8	9	5	7	7	4	12
4	18	9	8	5	6	1	18	8	A
5	A	18	10	20	8	5	32	15	A

A = Sequenzier-Ausfall;

Für die Berechnung der Mutationen insgesamt (Tab. 3.13) blieben die Fragment 1 und 9 aufgrund der Sequenzierausfälle bei den Spezies 3 und 5 für Fragment 1 bzw. bei den Spezies 1, 4 und 5 für Fragment 9 – siehe Tabelle 3.12 – unberücksichtigt.

Tab. 3.13: Anzahl der Mutationen insgesamt bei den verschiedenen Affen-Spezies

Affen- Spezies	Sequenzunterschiede
1	15
2	36
3	51
4	55
5	108

Im folgenden Sequenzvergleich (Tab. 3.14 bis 3.17) kann man in einem die jeweiligen Polymorphismen umgebenden DNA-Abschnitt das Vorkommen bzw. Fehlen des humanen SNPs ansehen.

Tab. 3.14: Vergleich des SNP C-920A bei Mensch und Affe

SNP C-920A					
H. sapiens	TTCGGCCCCG	CACGCAGCCA	GCCGCCAGCC	GCCCCGCCGG	CCCAGCTCCC
Schimpanse	TTCGGCCCCG	CACGCAGCCA	GCCGCCCGCC	GCCCCGCCGG	ACCAGCTCCC
Gorilla	TTCGGCCCCG	CACGCAGCCA	GCCGCCCGCC	GCCCCGCCGG	CCCAGCTCCC
Orang-Utan	TTCGGCCCCG	CACGCAGCCA	GCCGCCCGCC	GTCCGCCGGG	CCCAGCTCCC
Gibbon	TTCGGCCCCG	CACGCAGCCA	GCCGCCCGCC	GCCCCGCCGG	CCCAGCTCCC
Grüne Meerkatze	TCCGGTCCG	TACGCAGCCA	GCCGCCCGCC	GCCCCGCCGG	CCCAGCTCCC

hellblau unterlegt: SNP; gelb unterlegt: Wildtyp; grün unterlegt = zusätzliche Mutation im Affen-Genom

Tab. 3.15: Vergleich des SNP G1051A bei Mensch und Affe

SNP G1051A					
H. sapiens	GCCAGGGAAT	CTTCAAACCT	TCCAACAGAA	CTTGTTTGCT	CTTTGATTTG
Schimpanse	GCCAGGGAAT	CTTCAAACCT	TCCAACGGAA	CTTGTTTGCT	CTTTGATTTG
Gorilla	GCCAGGGAAT	CTTCAAACCT	TCCAACGGAA	CTTGTTTGCT	CTTTGATTTG
Orang-Utan	GCCAGGGAAT	CTTCAAACCT	TCCAACGGAA	CTTGTTTGCT	CTTTGATTTG
Gibbon	GCCAGGGAAT	CTTCAAACCT	TCCAACGGAA	CTTGTTTGCT	CTTTGATTTG
Grüne Meerkatze	GCCAGGGAAT	CTTCAAATTT	TCCAACGGAA	CTTGTTTGCT	CTTTGATTTG

hellblau unterlegt: SNP; gelb unterlegt: Wildtyp; grün unterlegt = zusätzliche Mutation im Affen-Genom

Tab. 3.16: Vergleich des SNP G1267A bei Mensch und Affe

SNP G1267A					
H. sapiens	GGTGACCTGA	AGGGAACCAT	CCTGGTACCC	CACATCCTCT	CCTCCGGGAC
Schimpanse	GGTGACCTGG	AGGGAACCAT	CCTGGTGCCC	CACATCCTCT	CCTCCGGGAC
Gorilla	GGTGACCTGA	AGGGAACCAT	CCAGGTGCCC	CACATCCTCT	CCTCCTGGAC
Orang-Utan	GGTGACCTGA	AGGGAACCAT	CCTGGTGCCC	CACATCCTCT	CCTCCGGGAC
Gibbon	AGTGACCTGA	AGGGAAMCAT	CCTGGTGCCC	CACATCCTCT	CCTCCGGGAC
Grüne Meerkatze	GGTGACCTGA	AGGGAACCAT	CCTGGTGCCC	CACATCCTCT	CCTCCGGGAC

hellblau unterlegt: SNP; gelb unterlegt: Wildtyp; grün unterlegt = zusätzliche Mutation im Affen-Genom; M = C/A;

Tab. 3.17: Vergleich des SNP C1384T bei Mensch und Affe

SNP C1384T					
H. sapiens	AAGCAACATT	TGGAGGGGAT	GGATGGGCTG	GTCAGCTGGT	CTCCTTTTCC
Schimpanse	AAGCAACATT	TGGAGGGGAT	GGATGGGCTG	GTCAGCTGGT	CTCCTTTTCC
Gorilla	AAGCAACATT	TGGAGGGGAT	GGATGGGCT	GGTCAGCTGGT	CTCCTTTTCC
Orang-Utan	AAGCAACATT	TGGAGGGGAT	GGATGGGCT	GGTCAGCTGGT	CTCCTTTTCCX
Gibbon	AAGCAACATT	TGGAGGGGAT	GGATGGGCT	GGTCAGCTGGT	CTCCTTTTCC
Grüne Meerkatze	AAGCAACATT	TGGAGGGGAT	GGATGGGCT	GGTCAGCTGGT	CTTCTTTTCC

hellblau unterlegt: SNP; X= fehlende/deletierte Base; grün unterlegt = zusätzliche Mutationen im Affen-Genom;

Von den vier Loci wurden zwei, nämlich der Bereich um SNP G1051A und SNP C1384T (siehe Tab. 3.15 bzw. 3.17), hoch konserviert, was sich mit den Beobachtungen bei Maus und Hund deckt.

Im Gegensatz zum Vorkommen von SNP C1384T, der ausgehend von der phylogenetisch am weitest entfernten Spezies bis hin zum Homo sapiens nachzuvollziehen ist, tritt SNP G1051A beim Menschen erstmals auf. Die Tatsache, dass SNP G1051A zum einen in einem stark konservierten, also funktionell relevanten Bereich lokalisiert ist, und außerdem hier erstmalig ein polymorphes Allel beim Menschen auftritt, könnte darauf hinweisen, dass durch die Mutation ein evolutionärer Vorteil entstanden sein könnte.

Im Fall von SNP C1384T ist das beim heutigen Menschen häufigere Allel erst beim Homo sapiens aufgetreten, während alle Affenspezies das beim Menschen seltenere Allel aufweisen.

3.4 Insilico-Analyse (Mat-Inspector- bzw. FastSNP-Untersuchung)

Die Ergebnisse des Sequenzvergleichs zwischen Mensch und Primatenspezies haben Hinweis darauf gegeben, dass die dabei als hoch konserviert identifizierten Bereiche funktionell interessant sein könnten. Da sich alle SNPs in nicht codierenden Bereichen befinden, könnten diese über die Beeinflussung der m-RNA-Stabilität auf die Translationsrate des Gens wirken. Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme bestünde jedoch über Effekte auf die Transkriptions-Regulation. Um zu analysieren, ob das Vorkommen der SNPs hier eine bedeutende Rolle spielt, wurde eine Transkriptionsfaktorenanalyse durchgeführt.

Für den Start der Gentranskription benötigen eukaryontische Polymerasen Sequenzelemente in der Nachbarschaft des Gens, die als Erkennungssignal für Transkriptionsfaktoren dienen. Diese binden an die DNA und aktivieren somit die Polymerase und damit die Transkription. Die wichtigsten Sequenzelemente für den Start der Transkription stellen Promotoren dar, die normalerweise vor der codierenden Region eines Gens liegen und an die Transkriptionsfaktoren bevorzugt binden.

Die in dieser Arbeit identifizierten SNPs wurden mit dem MatInspector- und dem FastSNP-Programm untersucht, die innerhalb einer Genomsequenz mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren erkennen. Ergab sich bei Eingabe des SNPs eine zusätzliche Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren beziehungsweise führte sie zum Wegfall einer solchen, konnte dies ein Hinweis auf eine Funktionsänderung in der Genregulation darstellen.

Um zu erkennen, ob im Bereich der identifizierten Polymorphismus eine potentielle Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren liegt, gibt man kurze, die jeweiligen SNPs flankierenden Genabschnitte in das entsprechende Programm ein. Dann überprüft man an der Stelle des Polymorphismus, ob es bei dessen Eingabe im Vergleich zum Wildtyp zu einer Änderung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen kommt.

3.4.1 MatInspector-Ergebnisse für SNP C-920A

SNP C-920A befindet sich als einziger der vier Polymorphismen im Promotorbereich des SOCS3-Gens, also vor der codierenden Region. Da die zur Transkription nötigen Proteine (Transkriptionsfaktoren) bevorzugt in diesem Bereich binden, sind die MatInspector- Ergebnisse (mit dem FastSNP-Programm konnten hier keine zusätzlichen Ergebnisse erzielt werden) für diesen SNP von besonderer Bedeutung.

Die entsprechenden Daten für SNP C-920A zeigen, dass in der Wildtypform eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor existiert, die mit Eingabe des Polymorphismus wegfällt. Es handelt sich hier um eine Bindungsstelle für einen ubiquitären Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, das so genannte „Stimulierende Protein 1“ (*SPI*).

Bei Auftreten des Polymorphismus ergibt sich eine zusätzliche Bindungsstelle, die in der Wildtypform fehlt, und zwar für einen Transkriptions-Repressor (*TR*), der im Zusammenhang mit Genen steht, die für den Lipidmetabolismus verantwortlich sind.

3.4.2 MatInspector/FastSNP-Ergebnisse für SNP G1051A

Für SNP G1051A existieren in der Wildtypform vier Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Dort binden zum einen die Faktoren *c-Myb* und *v-Myb*. Diese stehen im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus, der Entwicklung von T- und B-Zellen und der Hämatopoese.

Bei den beiden übrigen Transkriptionsfaktoren handelt sich um Vertreter der so genannten *Ets-Familie* (*c-Ets* und *Elk-1*), die die Genexpression im Rahmen zahlreicher unterschiedlicher biologischer Prozesse beeinflusst. So hat sie zum Beispiel Einfluss auf die Regulation der T-Zellaktivierung. *Elk-1* als ein Vertreter dieser Proteinfamilie spielt unter anderem eine Rolle bei cytokinassozierten Entzündungsprozessen.

Diese vier Bindungsstellen gehen mit der veränderten Basenabfolge, also beim Auftreten des Polymorphismus, verloren.

3.4.3 MatInspector/FastSNP-Ergebnisse für SNP G1267A

Bei SNP G1267A besteht in der Wildtypform eine Bindungsstelle, die beim Vorkommen des SNPs verloren geht. Es handelt sich hier um den so genannten *Tax/CREB* (cAMP responsive element binding protein)-Komplex. Dieser Komplex ist nötig für die Replikation und Expression des so genannten humanen T-Zell-Leukämie-Virus 1 (= HTLV1).

Gleichzeitig kommen vier neue Bindungsstellen beim Auftreten des SNPs hinzu, die in der Wildtypform nicht bestehen. Es handelt sich dabei um die Transkriptionsfaktoren *DMTF1* (= Myb-ähnlicher Transkriptionsfaktor 1, Cyclin D-bindend), der eine Rolle bei der Zellzyklusregulation spielt und einen Transkriptions-Repressor (= *TR*) für Gene im Zusammenhang mit dem Lipidmetabolismus.

Außerdem binden noch die Faktoren *Se-Cys tRNA* (= aktivierender Faktor der Transkription von Se-Cys tRNA) und *AML-1a* (= akutes Myeloisches Leukämie-Gen), ein Transkriptionsfaktor, der im Zusammenhang mit der Pathogenese maligner Erkrankungen steht.

3.4.4 MatInspector/FastSNP-Ergebnisse für SNP C1384T

Hier entstehen bei Eingabe des SNP, also beim Austausch der Base „T“ gegen „C“, drei neue potentielle Bindungsstellen. Zum einen für das so genannte *cut-like Homeodomain-Protein*, ein Transkriptionsfaktor, der wichtig für die Zelldifferenzierung ist und für den Transkriptionsfaktor *CDP CR*, ebenfalls ein Vertreter der cut-like Homeodomain-Proteinfamilie. Außerdem entsteht eine weitere Bindungsstelle für den Faktor *HOX/PBX*, der bei der Regulation der Hämatopoese mit beteiligt ist.

Interessant im Zusammenhang mit der Entstehung atopischer Erkrankungen sind vor allem die Ergebnisse der Transkriptionsfaktoranalysen für SNP G1051A. Alle vier Bindungsstellen, die hier nur in der Wildtypform bestehen und bei Auftreten des Polymorphismus entfallen, stehen im Zusammenhang mit Signalwegen, an denen

Cytokine beteiligt sind, die wichtige Funktionen bei der Entstehung atopischer Erkrankungen ausüben.

4 DISKUSSION

Asthma bronchiale stellt eine komplexe Erkrankung dar, deren Ursache im Zusammenspiel von genetischem Hintergrund und Umweltfaktoren zu sehen ist. Bislang wurde eine Vielzahl verschiedener Polymorphismen in unterschiedlichen Genen entdeckt, die eine Assoziation zu Asthma und der Entwicklung anderer atopischer Erkrankungen wie Heuschnupfen oder Neurodermitis aufweisen.

Bei der Untersuchung von Regulationsmechanismen, die im Zusammenhang mit der Ausbildung atopischer Krankheiten stehen, hat sich gezeigt, dass die SOCS-Genfamilie hier ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt. Um diese näher zu erforschen, wurde das SOCS3-Gen im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dabei konnten insgesamt vier Polymorphismen (SNP C-920A, SNP G1051A, SNP G1267A und SNP C1384T) identifiziert werden. Drei Polymorphismen wurden genotypisiert (SNP G1051A, SNP G1267A, SNP C1384T), während SNP C-920A mit SNP G1267A im Kopplungsgleichgewicht war und deshalb nicht weiter individuell analysiert wurde.

Im Rahmen der Assoziationsstudien zeigten sich signifikante Zusammenhänge mit Asthma bronchiale bei zwei der untersuchten Polymorphismen (SNP G1267A und C1384T). Begleitet wurde dieses Ergebnis von signifikanten Resultaten dieser beiden SNPs für ein vermehrtes Auftreten von „Giemen jemals“. Da diese Form des Giemens als wesentliches Symptom des allergischen Asthmas gilt, bekräftigt dies die für den Hauptphänotyp Asthma gefundenen Resultate. SNP C1384T zeigte zusätzlich ein signifikantes Ergebnis bezüglich der erhöhten Prävalenz von „Giemen im letzten Jahr“, dessen vermehrtes Auftreten im Zusammenhang mit nicht-atopischem Asthma zu sehen ist. Die Analyse von SNP G1267A ergab für die Ausbildung dieses Subphänotyps immerhin eine erhöhte Tendenz.

In der stratifizierten Untersuchung von atopischem bzw. nicht-atopischem Asthma zeigten sich für beide Formen signifikante Assoziationen, die alle Hinweis auf ein erhöhtes Prävalenz-Risiko im Zusammenhang mit dem Auftreten der Polymorphismen gaben (SNP C1384T stand im Zusammenhang mit atopischem, SNP C1384T und G1267A mit nicht-atopischem Asthma).

Bei der Qualitätskontrolle der Genotypisierung zeigte SNP G1051A in der Genotyp-Verteilung eine leichte Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Meist sind für diese Abweichungen methodische Fehler verantwortlich, es kommen jedoch auch biologische oder populationsbedingte Effekte als Ursache für Diskrepanzen im HWE-Test in Frage. Um eine technische Fehlerquelle mit größtmöglicher Sicherheit ausschließen zu können, wurde die Genotypisierung von SNP G1051A in einem zweiten Ansatz wiederholt, wobei die Genotypisierungs-Ergebnisse und die Genotyp-Verteilung der zweiten Analyse mit der ersten Untersuchung übereinstimmten. Damit konnte eine technische Ursache der Abweichung mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. Am ehesten ist die beobachtete, leichte Abweichung durch einen statistischen Effekt verursacht. Aufgrund der Populationsgröße werden nämlich auch kleine Abweichungen aus dem HWE im Testverfahren als signifikant gewertet, was im Sinne der Qualitätskontrolle durchaus wünschenswert ist und durch weitere Analysen, wie in diesem Fall, geklärt werden kann. Die für SNP G1051A erzielten Ergebnisse wurden daher als vertrauenswürdig gewertet und in die Interpretation der Daten mit eingeschlossen.

Am deutlichsten assoziiert mit dem Auftreten der Polymorphismen war das erhöhte Risiko, an Asthma bronchiale zu erkranken. Sowohl für SNP C1384T als auch für SNP G1267A ergaben sich hier signifikante Resultate. SNP G1267A wies dabei als einziger Polymorphismus Assoziationen zur Asthmaerkrankung in der Münchner Population auf. Alle anderen signifikanten Zusammenhänge (abgesehen vom Subphänotyp „Giemen jemals“, der eng mit dem Hauptphänotyp Asthma assoziiert ist), bezogen sich auf die Dresdner bzw. auf die Gesamtpopulation. Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Ergebnisse der Polymorphismen in den jeweiligen Städten besteht in den ungleichen regionalen Gegebenheiten. Ein Beispiel sind soziale Faktoren, wie das unterschiedliche Eintrittsalter in Kinderkrippen bzw. Kindergärten, die Einfluss auf das Ausmaß der Allergenexposition und damit auf die Krankheitsentstehung nehmen. Vergleichende Untersuchungen zwischen West- und Ostdeutschland zeigen in diesem Zusammenhang, dass das Auftreten atopischer Erkrankungen nicht nur beim Vergleich verschiedener Länder sondern auch innerhalb eines Landes nicht gleich verteilt ist. Im Rahmen entsprechender Studien wurde herausgefunden, dass das Risiko, an Asthma zu erkranken, im westlichen Teil Deutschlands signifikant höher ist (36).

Ein weiteres Beispiel für die potentielle Auswirkung unterschiedlicher regionaler Einflussfaktoren lieferte SNP C1384T im Rahmen der Untersuchung von atopischem versus nicht-atopischem Asthma. Im Gegensatz zur Assoziation zu atopischem Asthma in der Gesamtpopulation zeigte sich in Dresden bei diesem Polymorphismus ein Zusammenhang zu nicht-atopischem Asthma.

Da sich in dieser ersten Analyse interessante Zusammenhänge mit Asthma ergeben haben, wurde weiterführend untersucht, ob auch das Auftreten von Asthmasymptomen mit den Polymorphismen assoziiert ist. Diese Annahme bestätigte sich in den Ergebnissen der Assoziationsstudie: Die Resultate der Datenanalyse von SNP G1267A und C1384T entsprachen der klinischen Beobachtung, dass Kinder, die an Asthma erkrankt sind, charakteristischerweise auch giemende Atmung aufweisen. Beide Polymorphismen zeigten sowohl Assoziationen mit einem erhöhten Asthma-Risiko als auch mit dem Auftreten von giemender Atmung.

Wurde Asthma in eine atopische bzw. eine nicht-atopische Ausprägung unterteilt, so war atopisches und nicht-atopisches Asthma mit jeweils unterschiedlichen Formen des Giemens assoziiert. Zum einen wurde „Giemen, das jemals in der Vergangenheit des Probanden in Erscheinung getreten ist“, zum anderen „Giemen, das im letzten Jahr auftrat“, untersucht. SNP G1267A zeigte in München gleichzeitig signifikante Ergebnisse für nicht-atopisches Asthma und für „Giemen, das jemals aufgetreten ist“, nicht aber für aktuelles Giemen zum Zeitpunkt der Untersuchung.

Im Gegensatz dazu ergab sich für SNP C1384T in der Gesamtpopulation sowohl für atopisches Asthma als auch für „Giemen, das innerhalb des letzten Jahres aufgetreten ist“ ein signifikant erhöhtes Risiko. Dass diese Form des Giemens gemeinsam mit atopischem Asthma eine Assoziation zu SNP C1384T aufwies, ist gut erklärbar: Nicht-atopisches Asthma ist vor allem charakteristisch für das Vorschulalter und verliert sich oft im späteren Kindesalter, so dass bei den Kindern mit nicht-atopischem Asthma in unserer Untersuchung (9-11-Jährige) zwar Giemen in der Vergangenheit auftrat („Giemen jemals“), zum Zeitpunkt der Untersuchung jedoch keine Symptome mehr vorlagen. Anders verhält es sich mit atopischem Asthma: Dieses tritt vor allem im Schulalter auf und daher sind auch bei den Kindern mit atopischem Asthma zum Zeitpunkt der Untersuchung (Alter der Kinder ca. zehn Jahre) Symptome zu erwarten (48), was den Ergebnissen von SNP C1384T entspricht.

Die Assoziationen der Polymorphismen zeigen also ein komplexes, aber in sich geschlossenes Gesamtbild, das durch die Subanalysen bestätigt und noch detaillierter aufgearbeitet wird. Demnach scheinen zwei Polymorphismen im SOCS3-Gen mit zwei unterschiedlichen Formen des Asthma bronchiale im Kindesalter vergesellschaftet zu sein.

Zusätzlich zeigte SNP C1384T Tendenzen eines erhöhten Erkrankungsrisikos für atopische Dermatitis bzw. einer gesteigerten atopischen Sensibilisierung. Diese Beobachtungen, zusammen mit den signifikanten Resultaten für Asthma bronchiale, bestätigten das durch zahlreiche Untersuchungen nachgewiesene gehäufte parallele Vorkommen von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis (Asthma, Heuschnupfen, atopische Dermatitis und atopische Sensibilisierung).

Im Unterschied zu SNP C1384T und G1267A, die beide signifikante Assoziationen bzw. Tendenzen zur erhöhten Prävalenz von mindestens zwei parallel auftretenden atopischen Phänotypen erkennen ließen, zeigte SNP G1051A nur eine signifikante Assoziation mit atopischer Dermatitis und diese nur innerhalb der Dresdner Population. Die Assoziationen mit anderen atopischen Erkrankungen und atopischer Sensibilisierung sind im Vergleich zur Risikoerhöhung für atopische Dermatitis eher gegenläufig und weisen kein geschlossenes Bild auf. Auch wenn plausible Erklärungen für die Beobachtung gefunden werden könnten, dass sich für SNP G1051A zwar ein signifikantes Ergebnis für atopische Dermatitis, nicht aber für weitere atopische Phänotypen ergab (SOCS3 könnte einen organspezifischen Faktor an der Haut darstellen, der zum Auftreten von Symptomen führen könnte), so kommen bei der gemeinsamen Betrachtung der erzielten Resultate jedoch Zweifel auf, ob es sich tatsächlich um solch eine organspezifische Assoziation handelt. Vielmehr scheint eine zufällige statistische Assoziation zu bestehen, wie sie auch in einer großen Stichprobe beim multiplen Testen gelegentlich möglich ist.

Bei der Analyse der identifizierten Polymorphismen im SOCS3-Gen zeigte sich somit vor allem der Zusammenhang von SNP G1267A und SNP C1384T mit Asthma bronchiale, was sich auch in der Subgruppenanalyse bestätigte. Wichtig für die Beantwortung der Frage nach dem Effekt der Polymorphismen ist auch die Betrachtung des kombinierten Auftretens von Polymorphismen im Gen, das ja natürlicherweise zu

beobachtet ist. Die Analyse kann sich also nicht auf Einzeluntersuchungen von isolierten Polymorphismen beschränken, sondern muss auch die reelle Situation widerspiegeln, in der sich Effekte von Genveränderungen in einem Gen gegenseitig beeinflussen können. Dies wurde im Rahmen einer Haplotypanalyse untersucht. Hier ergab sich für den Phänotyp Asthma ein signifikantes Ergebnis für atopisches Asthma. Diese Signifikanz lag bei der Kombination von bestimmten Allelen vor („Risiko-Haplotyp“), in der SNP G1051A und G1267A in Wildtypform, SNP C1384T in polymorpher Form auftrat.

Wie Polymorphismen im SOCS3-Gen zu einer erhöhten Prävalenz von Asthma und assoziierten Erkrankungen beitragen, kann durch die genaue Betrachtung der Rolle von SOCS3 in der Entzündungskaskade als wichtiger Teil der Entstehung allergischer Erkrankungen weiter geklärt werden.

Das T-Helferzellensystem beispielsweise ist für die Entwicklung von Asthma und anderen atopischen Krankheiten maßgeblich verantwortlich. Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH2-Zellen spielt dabei eine entscheidende Rolle. Mitverantwortlich für die TH2-Differenzierung sind Antigene, die als Auslöser für die TH2-gerichtete Entwicklung der noch undifferenzierten T-Zellen fungieren. Bakterien und Viren hingegen stellen entsprechende Faktoren für die TH1-Zell-Entwicklung dar. Diese wirken als Gegenspieler zur TH2-Reaktion und stehen im Zusammenhang mit einer erniedrigten Prävalenz allergischer Erkrankungen.

Dass ein Zusammenhang zwischen SOCS3 und der TH-Zelldifferenzierung besteht, zeigt sich primär durch den Nachweis von SOCS3-m-RNA in noch undifferenzierten T-Zellen und der Beobachtung, dass die nachfolgende Differenzierung zu TH2-Zellen mit einer gesteigerten SOCS3-Expression assoziiert ist. Weiterführende Studien haben zudem gezeigt, dass SOCS3 außer der Rolle, die es bei der T-Zelldifferenzierung spielt, noch weiteren Einfluss auf die bereits differenzierte T-Zelle nimmt. TH1- bzw. TH2-Zellen nutzen unterschiedliche Signalwege, die über spezifische Interleukine aktiviert werden. Zum Beispiel stellt IL-4 ein Interleukin dar, das typischerweise an TH2-Zellen bindet und STAT6 als Komponente seines Signalwegs nutzt. Im Gegensatz dazu stehen TH1-Zellen vor allem im Zusammenhang mit der IL-12/STAT4-Signalkaskade. In TH2-Zellen mit starker SOCS3-Expression wurde eine Hemmung der durch IL-12 ausgelösten, für TH1-Zellen typischen STAT4-Aktivierung beobachtet (11). Daraus

lässt sich schließen, dass die hauptsächliche Nutzung des IL-4/STAT6-Signalwegs der TH2-Zellen durch die hemmende Wirkung von SOCS3 auf alternative Signalwege (z.B. IL-12/STAT-4) bedingt ist. Dies hat wiederum Einfluss auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen: Würde die hemmende Wirkung von SOCS3 auf die IL-12-Signalkaskade in TH2-Zellen ausbleiben, wäre das Gleichgewicht des TH1-/TH2-Zellsystems und somit die Regulation der Allergieentstehung gestört.

Im Bereich des Signalwegs der Cytokine IL-4 und IL-13, die entscheidende Faktoren bei der Entstehung atopischer Erkrankungen darstellen, übt SOCS3 über seine Regulationsmechanismen wohl die bedeutendste Einflussnahme auf die atopische Krankheitsentwicklung aus. Sowohl SOCS als auch IL-4/IL-13 nutzen Signalkaskaden, an denen STATS beteiligt sind. SOCS3 inhibiert über STAT6 speziell IL-4, das vor allem für die IgE-Regulation und damit die Entstehung von Asthma verantwortlich ist. Die Assoziation der im SOCS3-Gen identifizierten Polymorphismen mit der erhöhten Prävalenz von Asthma lässt den Schluss zu, dass diese Polymorphismen zu einer Verminderung der hemmenden Wirkung auf IL-4 führen. Um dies zu belegen, müssen weiterführende funktionelle Studien durchgeführt werden, die den Zusammenhang zwischen dem Auftreten der SNPs und dem Ausmaß der IL-4-Expression analysieren.

Im Rahmen solcher Untersuchungen könnte auch die Beobachtung näher erforscht werden, dass die Wirkung, die SOCS3 durch seine inhibitorische Funktion auf die Entstehung allergischer Erkrankungen hat, teils gegenläufig zu sein scheint. Forschungsergebnisse im Bereich der IL-4/IL-13-Signalwegskaskade beschreiben beispielsweise einen protektiven Effekt, den SOCS3 auf die Asthma- und Atopieentstehung ausübt. Im Gegensatz dazu führt SOCS3 im T-Zellsystem über spezifische Interleukin-Hemmung zu einer TH2-gerichteten Immunantwort (11). Dies entspricht einer atopiefördernden Wirkung, da TH2-Zellen für die Auslösung atopischer Erkrankungen mit verantwortlich sind und steht im Einklang mit den Ergebnissen, die in dieser Arbeit bezüglich der Auswirkungen der identifizierten Polymorphismen erzielt wurden. Das Nebeneinander dieser teils atopiepräventiven, teils atopiebegünstigenden Effekte von SOCS3 könnte auf die unterschiedliche Nutzung der zentralen Elemente seiner Signalwegs-Regulation, den STATS, zurückzuführen sein. So hemmt SOCS3 im Bereich der TH2-Regulation spezifisch STAT4. Bei der inhibitorischen Regulation von IL-6 durch SOCS3 hingegen, die eine antiinflammatorische, also asthma- und

allergieprotektive Wirkung nach sich zieht, stellt STAT3 den entscheidenden Angriffspunkt für SOCS3 dar. Weitere Elemente, die für die unterschiedlichen Regulationsvorgänge und Effekte von SOCS3 verantwortlich sein könnten, wären auf molekularer Ebene spezielle Domänen des SOCS3-Proteins. Über die beteiligten molekularen Strukturen des SOCS3-Proteins ist zum Beispiel die Spezifität der IL-4-Signalwegshemmung definiert: SOCS3 übt hier seine hemmende Funktion über die Bindung an das JAK1-Element des IL-4-Rezeptors aus; entscheidend ist, dass die Funktionalität der Hemmung nur dann gewährleistet ist, wenn SOCS3 mit seiner so genannten „Prä-SH2-Domäne“ bindet. Studien haben gezeigt, dass bei einem Austausch dieser Domäne zwischen SOCS3 und CIS die IL-4-Hemmung nicht mehr von SOCS3 geleistet, sondern von CIS übernommen wird (18).

Abgesehen von IL-4/IL-13 werden noch zahlreiche weitere Interleukine, die eine Rolle bei der Entstehung atopischer Erkrankungen spielen, von der regulierenden SOCS3-Funktion beeinflusst. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass SOCS3 einen inhibitorischen Effekt auf die Produktion von Interleukin 2 (IL-2) hat, das ebenfalls einen zentralen Faktor der T-Zellaktivierung darstellt. Ein weiterer enger Regulationszusammenhang besteht zwischen SOCS3 und Interleukin 6 (IL-6), einem proinflammatorischen Cytokin, das eine wichtige Rolle bei lokalen Entzündungsvorgängen spielt und STAT3 als Teil seines Signalwegs nutzt. SOCS3 wirkt als starker selektiver Inhibitor des IL-6-Signalwegs und übt somit einen entzündungshemmenden Effekt aus (7).

SOCS3 steht jedoch auch mit LPS (bakteriellen Lipopolysacchariden), die ebenfalls einen Einfluss auf die Entstehung atopischer Erkrankungen haben könnten, in Wechselwirkung. Diese Proteine, die Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien sind, interagieren im Rahmen bakterieller Infektionen mit antigen-präsentierenden Zellen, was zur Freisetzung bestimmter Cytokine führt (zum Beispiel IL-12 und Interferon- γ). Diese lenken das Immunsystem in Richtung TH1-Antwort und haben somit eine atopiepräventive Wirkung. Der Zusammenhang zwischen SOCS und LPS besteht darin, dass LPS im Rahmen ihres Signalwegs mit so genannten Toll-like-Rezeptoren (TLR) interagieren (12). SOCS3 kann, genau wie über Cytokine, auch über TLR aktiviert werden und deren Signalweg beeinflussen (2). Auch IL-6, ein Cytokin, dessen Signalweg über SOCS3 reguliert wird, steht im Zusammenhang mit dem LPS-Signalweg. Dabei übt IL-6 eine inhibitorische Wirkung aus. Die Möglichkeit von

SOCS3, durch eine IL-6-Blockade die hemmende Wirkung auf den LPS-Signalweg aufzuheben, stellt ein weiteres Beispiel für die Einflussnahme von SOCS3 auf atopieassoziierte Signalwege dar (57).

Die Beobachtung, dass LPS bei der Entwicklung von Asthma und atopischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnten, wird durch zahlreiche Studien gestützt. Diese zeigen, dass Bauernkinder, die regelmäßigen Kontakt zu Stalltieren hatten und damit in gesteigertem Maße den bakteriellen Proteinen ausgesetzt waren, eine signifikant niedrigere Asthmarate aufweisen als Kinder ohne entsprechende Umweltbedingungen. Somit scheint der enge Kontakt zu Stalltieren und die damit verbundene vergleichsweise hohe Bakteriendichte eine allergiepräventive Wirkung auszuüben. Ähnlich protektive Effekte wurden auch im Zusammenhang mit Haustierhaltung beobachtet (3).

Ob nun ein identifizierter SNP tatsächlich zu phänotypischen Auswirkungen führt, hängt von seiner funktionellen Relevanz ab. Diese wiederum ist von der Bindung durch Transkriptionsfaktoren, die bevorzugt im Promotorbereich, also vor der codierenden Region eines Gens andocken, beeinflusst. Ergibt sich für einen SNP eine im Vergleich zum Wildtyp zusätzliche TF-Bindungsstelle oder entfällt eine solche, hat dies möglicherweise Einfluss auf die entsprechende Genregulation und somit die funktionelle Relevanz.

Alle in dieser Arbeit genotypisierten SNPs befinden sich in der 3'UTR-Region, die sich an die codierende Region anschließt. Auch wenn jene Region nicht im Promotorbereich liegt, in dem Transkriptionsfaktoren vornehmlich binden, haben SNPs in diesem Bereich durchaus potentielle funktionelle Bedeutung. In vorangehenden Untersuchungen, zum Beispiel am Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) wurde gezeigt, dass Polymorphismen in der 3'UTR-Region die mRNA-Stabilität beeinflussen können (8). Somit ist vorstellbar, dass beim Auftreten des SNPs durch eine höhere Stabilität der SOCS3-mRNA eine größere Menge an SOCS3-Proteinen produziert wird. Dies wiederum kann über die STAT-Transkriptionsfaktoren zu einem gesteigerten inhibitorischen Einfluss führen, was im Falle von SOCS3 einem verstärkten Effekt bei der Suppression von zum Beispiel Interleukinwirkungen entspräche.

Die Ergebnisse der Transkriptionsfaktorenanalyse für SNP G1051A ergaben beim Vorkommen des Polymorphismus den Wegfall von TF-Bindungsstellen, die im

Zusammenhang mit der Entwicklung allergischer Erkrankungen stehen. Im speziellen sind hier die Transkriptionsfaktoren aus der Ets-Familie zu nennen (Elk-1/c-Ets), die an der frühen T-Zelldifferenzierung beteiligt sind (1). Außerdem bestand eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktore c-Myb, der im Mausversuch Einfluss auf die T-Zellentwicklung und das Vorkommen von Eosinophilen zeigt (41).

Für SNP C1384T ergab sich beim Wechsel vom Wildtyp zum Polymorphismus eine neue Bindungsstelle für das so genannte „cut-like Homeodomain-protein“. Die Klasse der Homeodomain-Proteine, die ursprünglich in Fruchtfliegen entdeckt wurde und von der mittlerweile bekannt ist, dass sie in allen Eukaryonten existiert, spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklungsregulation und Zelldifferenzierung (9). Vor dem Hintergrund des engen Zusammenhangs zwischen der Entstehung atopischer Erkrankungen und der T-Zellentwicklung/T-Zelldifferenzierung stellt diese durch den Polymorphismus neu entstandene Bindungsstelle einen Anhaltspunkt für weitere funktionelle Untersuchungen dar.

Einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Relevanz eines Polymorphismus kann das Ausmaß seiner phylogenetischen Konservierung geben. Diese lässt sich durch die Analyse genetischen Materials evolutionär unterschiedlich weit entfernt verwandter Spezies untersuchen. Die SOCS3-Region der Maus bzw. des Hundes zeigt im Bereich der identifizierten Polymorphismen (3'UTR-Region) eine hohe Kongruenz zum menschlichen Genom. Speziell im engeren Umfeld von SNP G1051A und SNP C1384T besteht eine auffallend hohe Rate an Konservierung.

Dies ist deshalb besonders bemerkenswert, da dieses hohe Maß an Übereinstimmung üblicherweise vor allem für Exonsequenzen, also für Abschnitte, die in Proteine umgeschrieben werden, charakteristisch ist. Bei der 3'UTR-Region handelt es sich aber um einen Bereich, der am späteren Translationsprozess nicht direkt teilnimmt. Trotzdem spielt er für diesen Vorgang eine wichtige Rolle, da er über bestimmte Faktoren regulierend in den Ablauf der Translation eingreifen kann. Dass die 3'UTR-Region des SOCS3-Gens phylogenetisch über einen langen Zeitraum erhalten wurde, lässt auf einen solchen regulierenden Einfluss und damit auf eine funktionelle Relevanz dieser Region schließen.

Nachdem beim Vergleich zwischen Mensch und Maus/Hund das gesamte SOCS3-Gen betrachtet worden war, standen bei der anschließenden Untersuchung die jeweiligen Polymorphismen und ihr engeres Umfeld im Mittelpunkt der Betrachtungen. Ob bzw. wann die SNPs in der phylogenetischen Vergangenheit aufgetreten sind, wurde anhand genetischen Materials verschiedener Primatenspezies analysiert (3.3.2). Abgesehen von der Überprüfung des Vorkommens der einzelnen SNPs bei den jeweiligen Arten zeigte sich prinzipiell, dass sich die phylogenetische Verwandtschaftsreihe der Primaten mit den Ergebnissen der Mutationsanalyse deckt. Das heißt, dass je weiter entfernt verwandt eine Primatenart (jeweils untersucht an einem Vertreter) mit dem Menschen ist, desto mehr Sequenzunterschiede weist sein Genom (in der untersuchten SOCS3-Region) im Vergleich auf. Dies lässt sich durchgehend in der evolutionären Reihe der fünf Arten beobachten: Die am weitest entfernt verwandte Spezies (Grüne Meerkatze) trägt beispielsweise 108 Sequenzvariationen im analysierten Bereich, die dem Menschen genetisch am nächsten stehende (Schimpanse) hingegen nur 15 (Tab. 3.12).

Im näheren Bereich um die Polymorphismen zeigt sich, wie schon beim Maus/Hund-Vergleich, eine besonders hohe Konservierung für SNP G1051A und C1384T. Dies legt den durchgehenden Erhalt der Konservierung dieses Abschnitts von den weit entfernt verwandten Spezies Maus und Hund über die Primatenarten bis hin zum Menschen nahe. In einem nächsten Schritt wurden die jeweiligen Polymorphismen selbst betrachtet. Hier zeigten sich für die beiden SNPs G1051A und C1384T, die in der hoch konservierten Region lokalisiert sind, unterschiedliche Ergebnisse. SNP G1051A tritt erstmals beim *Homo sapiens* auf, alle Primatenarten hingegen tragen das Allel in Wildtypform. Dies könnte dafür sprechen, dass durch das Vorkommen des Polymorphismus für den Menschen ein evolutionärer Vorteil entstanden sein könnte. Im Gegensatz dazu ist bei SNP C1384T das häufiger vorkommende Allel erst beim Menschen aufgetreten, alle Primatenarten tragen das für den Menschen seltenere, polymorphe Allel. Dies legt die Vermutung nahe, dass für SNP C1384T die Ausprägung des Wildtypallels eine relevante Funktion erfüllt. Diese Beobachtung wiederum stützt die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Assoziationsstudien: Hier hat sich gezeigt, dass das Vorkommen der SNPs im Zusammenhang mit einer erhöhten Krankheitsprävalenz steht. Dies würde dafür sprechen, dass sich im evolutionären Verlauf eher die Wildtypform durchsetzt, da sie einen protektiven Effekt auf die Krankheitsentstehung auszuüben scheint.

Allerdings kann die Betrachtung der Konservierung genetischer Bereiche über weite evolutionäre Zeiträume hinweg nur Hinweise auf die Relevanz dieser Regionen bzw. spezifischer Basenaustausche geben, beweisend sind sie jedoch nicht. Zusätzliche Argumente für die Bedeutung identifizierter Sequenzvariationen in hoch konservierten Bereichen kann auch die Transkriptionsfaktorenanalyse liefern. Sowohl bei SNP C1384T als auch bei SNP G1267A kommt es durch das Auftreten des jeweiligen Polymorphismus, wie *in silico* vorhergesagt, zu gravierenden Veränderungen in der Transkriptionsfaktorenbindung. SNP G1267A führt zu vier neuen Bindungsstellen, die in der Wildtypform nicht vorhanden waren. Gleichzeitig geht eine Bindungsstelle in der polymorphen Form verloren, die in der Wildtypform bestand. Bei SNP C1384T kommt es beim Vorkommen des Polymorphismus zu drei neuen möglichen Bindungsstellen. Diese Veränderungen können potentiell die Regulation und die Expression des SOCS3-Gens beeinflussen. Ob dies tatsächlich so ist, können jedoch nur funktionelle Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* zeigen.

Das SOCS3-Gen spielt bei dem vielschichtigen Zusammenwirken zahlreicher Faktoren, die zur Entstehung atopischer Erkrankungen führen, eine wichtige Rolle. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Identifikation und Analyse von SOCS3-Polymorphismen zeigt vor allem Zusammenhänge zwischen der erhöhten Prävalenz des Phänotyps Asthma und dem Vorkommen von zwei der genotypisierten Polymorphismen. Die Bedeutung dieser Assoziation wurde durch die Ergebnisse der vergleichenden Primatensequenzanalyse und der Transkriptionsfaktorenanalyse betont. Diese Beobachtungen führen zu der Überlegung, ob SOCS3 eventuell bei der Behandlung von Asthma bronchiale einsetzbar ist. Ein dementsprechendes therapeutisches Eingreifen ist allerdings vor allem deshalb schwierig, weil SOCS3 über verschiedene Signalwege und Effekte die Entstehung atopischer Erkrankungen mit beeinflusst und somit seine Auswirkungen schwer abzuschätzen sind. Eine denkbare Möglichkeit wäre, auf Patienten über die Exposition bestimmter Mediatoren, deren Einfluss auf die SOCS3-Expression näher erforscht ist, wünschenswerte, also asthmaprotektive Effekte auszuüben. Da SOCS3 nachgewiesenermaßen eine hemmende Wirkung auf den IL-4-Signalweg hat, könnte beispielsweise im Rahmen dieser Signalwegskaskade durch die Hochregulation von SOCS3 über einen spezifischen Auslöser (zum Beispiel LPS) die hemmende Wirkung auf IL-4 verstärkt und somit eine

atopiepräventive Wirkung erzielt werden. Allerdings bestehen bei der Durchführung eines solchen Therapieansatzes diverse Probleme, zu deren Lösung noch weitere Studien durchgeführt werden müssten. Zum Beispiel müssten erst Mediatoren identifiziert werden, die zum einen spezifisch auf SOCS3 wirken und zum anderen auch tatsächlich zu dessen Hochregulation führen. Außerdem stellt die Selbstregulation der SOCS-Gen-Expression einen bedeutenden Einflussfaktor dar. Eine exzessive Stimulation der Expression würde mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer negativen Rückkopplung der eigenen Produktion führen. Daher wäre es unerlässlich, parallel im Rahmen zusätzlicher Studien das tatsächliche Ausmaß des produzierten SOCS3-Genprodukts zu quantifizieren.

Weiterführende funktionelle Studien müssen, genau wie für die Planung eines eventuellen Einsatzes von SOCS3 in der Asthmatherapie, auch für die Untersuchung der multiplen und komplexen Zusammenhänge zwischen den im SOCS3-Gen identifizierten Polymorphismen und der Entstehung atopischer Erkrankungen durchgeführt werden. Nur anhand solcher Analysen können letztendlich Aussagen darüber getroffen werden, ob und wie ein bestimmter Polymorphismus die Krankheitsentstehung beeinflusst. Vor dem Hintergrund, dass sich die in dieser Arbeit untersuchte Studienpopulation aus Kindern einer Altersstufe zusammensetzt, in der die Prävalenz atopischer Erkrankungen besonders hoch ist - sie liegt bei etwa zehn Prozent - wird die Relevanz intensiver Forschung in diesem Bereich verdeutlicht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Asthma bronchiale und assoziierte atopische Erkrankungen sind in ihrer Entstehung sehr komplex. Sie werden sowohl durch Umwelteinflüsse als auch durch verschiedene Mutationen in zahlreichen Genen ausgelöst. So werden annäherungsweise etwa 30 bis 40 Gene dafür verantwortlich gemacht, an der Entstehung atopischer Erkrankungen mit beteiligt zu sein.

Ein Kandidatengen, das im Verdacht steht, in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle zu spielen, stellt das SOCS3-Gen dar. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit auf das Vorhandensein potentieller Polymorphismen hin untersucht. Dabei wurden vier Polymorphismen identifiziert, von denen drei bereits beschrieben waren und einer neu entdeckt wurde. Anschließend wurden die Polymorphismen innerhalb einer großen Studienpopulation bestehend aus Münchner und Dresdner Schulkindern auf Assoziationen zu verschiedenen atopischen Phänotypen hin untersucht. Hierbei ergaben sich vor allem signifikante Zusammenhänge zur erhöhten Prävalenz von Asthma bronchiale.

Um die funktionelle Relevanz der identifizierten Polymorphismen zu analysieren, wurde ihr Vorkommen bei verschiedenen, vom Menschen unterschiedlich weit entfernt verwandten Primatenarten überprüft. Es zeigte sich, dass jene Bereiche des SOCS3-Gens, in dem sich die Polymorphismen befinden, im evolutionären Verlauf stark konserviert wurden, was auf eine funktionelle Bedeutung dieser Genabschnitte rückschließen lässt. Diese Vermutung wurde durch die Resultate einer in silico Transkriptionsfaktorenanalyse bekräftigt. Sie zeigte, dass das Vorkommen der Polymorphismen zur Veränderung des Bindungsverhaltens von Transkriptionsfaktoren, die im Zusammenhang mit der Entstehung atopischer Erkrankungen stehen, führen könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Polymorphismen im SOCS3-Gen eine signifikante Rolle bei der Entstehung von Asthma bronchiale spielen. Präliminare Analysen, die untersuchten, wie SOCS3-Polymorphismen Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung ausüben könnten, wurden durchgeführt und lieferten Hinweise auf mögliche kausale Zusammenhänge zwischen Genveränderungen, Gen-Funktion und

Krankheitsentstehung. Daraus könnten sich in weiteren Studien interessante Ansatzpunkte für neue Möglichkeiten in der Prävention und der Therapie atopischer Erkrankungen ergeben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Anderson MK., Hernandez-Hoyos G., Diamond RA., Rothenberg EV. (1999)

Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage.

Development 126: 3131-3148

2. Baetz A., Frey M., Heeg K., Dalpke AH. (2004)

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells.

J Biol Chem 279: 54708-54715

3. Berdel D. und Mitarbeiter (2000)

Asthmatherapie bei Kindern und Jugendlichen. 1. Aufl., Bremen: UNI-MED Verlag AG

4. Boffelli D., McAuliffe J., Ovcharenko D., Lewis KD., Ovcharenko I., Pachter L., Rubin EM. (2003)

Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome.

Science 299: 1391-1394

5. Cartharius K., Frech K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A., Frisch M., Bayerlein M., Werner T. (2005)

MatInspector and beyond: promotor analysis based on transcription factor binding sites.

Bioinformatics 13: 2933-2942

6. Chomarat P., Banchereau J. (1998)

Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies.

Int Rev Immunol 17: 1-52

7. Croker BA., Krebs DL., Zhang JG., Wormald S., Willson TA., Stanley EG., Robb L., Greenhalgh CJ., Forster I., Clausen BE., Nicola NA., Metcalf D., Hilton DJ., Roberts AW., Alexander WS. (2003)

SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo.

Nat Immunol 4: 540-545

8. Di Marco S., Hel Z., Lachance C., Furneaux H., Radzioch D. (2001)

Polymorphisms in the 3'-untranslated region of TNFalpha mRNA impairs binding of the post-transcriptional regulatory protein HuR to TNFalpha mRNA.

Nucleic Acids Res 29: 863-871

9. Dickinson LA., Dickinson CD., Kohwi-Shigematsu T. (1997)

An atypical homeodomain in SATB1 promotes specific recognition of the key structural element in a matrix attachment region.

J Biol Chem 272:11463-11470

10. Ding C., Cantor CR. (2003)

A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS.

Proc Natl Acad Sci U.S.A. 100: 3059-3064

11. Egwuagu CE., Yu CR., Zhang M., Mahdi RM., Kim SJ., Gery I. (2002)

Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance.

J Immunol 168: 3181-3187

12. Eisenbarth S., Piggott D., Huleatt J., Visintin I., Herrick C., Bottomly K. (2002)

Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen.

JEM 196: 1645-1651

13. Emanuelli B., Peraldi P., Filloux C. et al. (2000)

SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling.

J Biol Chem 275: 15985-15991

14. Gohlke, Henning (2004)

Genetische Assoziation von SNPs in IL1RN mit Asthma bronchiale.

München, Technische Universität, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Diss., 2004

15. Graves PE., Kabesch M., Halonen M., Holberg CJ., Baldini M., Fritsch C., Weiland SK., Erickson RP., v. Mutius E., Martinez FD. (2000)

A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children.

J Allergy Clin Immunol 105: 506-513

16. Griffin TJ., Smith LM. (2000)

Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry.

Trends Biotechnol 18: 77-84

17. Grunig G., Warnock M., Wakil AE., Venkayya R., Brombacher F., Rennick DM., Sheppard D., Mohrs M., Donaldson DD., Locksley RM., Corry DB. (1998)

Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma.

Science 282: 2261-2263

18. Haque SJ., Harbor PC., Williams BRG. (2000)

Identification of critical residues required for suppressor of cytokine signaling-specific regulation of interleukin-4 signaling.

J Biol Chem 275: 26500-26506

19. Hartl DL., Clark AG. (1997)

Principles of population genetics. 3.Aufl., Sinauer Associates

20. Hartmer R., Storm N., Boecker S., Rodi CP., Hillenkamp F., Jurinke C., van den BD. (2003)

RNase T1 mediated base-specific cleavage and MALDI-TOF MS for high-throughput comparative sequence analysis.

Nucleic Acids Res 31: 1-10

21. Howard T., Koppelman GH., Xu J., Zheng S., Postma DS., Meyers DA., Bleeker ER. (2002)

Gene-gene interaction in Asthma: *IL4RA* and *IL13* in a dutch population with asthma.

Am J Hum Genet 70: 23023-6

22. Ito S., Ansari P., Sakatsume M. et al. (1999)

Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1.

Blood 93: 1456-1463

23. Kabesch M., Carr D., Weiland SK., von Mutius E. (2004)

Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample.

Clin Exp Allergy 34: 340-345

24. Kabesch M., Tzotcheva I., Carr D., Höfler C., Weiland SK., Fritsch C., v. Mutius E., Martinez FD. (2003)

A complete screening of the *IL4* gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood.

J Allergy Clin Immunol 112: 893-898

25. Karas M., Bahr U., Ingendoh A., Nordhoff E., Stahl B., Strupat F., Hillenkamp F. (1991)

Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry.

Anal Chim Acta 241: 151-153

26. Karas M., Hillenkamp F. (1988)

Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.

Anal Chem 60: 2299-2301

27. Karow T., Lang-Roth R. (2003)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 11. Aufl., Köln: Eigenverlag

28. Kormann MSD., Carr D., Klopp N., Illig T., Leupold W., Fritsch C., Weiland SK., v. Mutius E., Kabesch M. (2005)

G-Protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large german population.

Am J Respir Crit Care Med 171: 1358-1362

29. Krebs D., Hilton D. (2001)

SOCS Proteins: negative regulators of cytokine signaling.

Stem Cells 19: 378-387

30. Kubo M., Hanada T., Yoshimura A. (2003)

Suppressors of cytokine signaling and immunity.

Nature Immunology 4: 1169-1176

31. Lander ES. et al. (2001)

Initial sequencing and analysis of the human genome.

Nature 409: 860-921

32. Leushner J. (2001)

MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics.

Expert Rev Mol Diagn 1: 11-18

33. Little DP., Braun A., Darnhofer-Demar B., Frilling A., Li Y McIver RT. Jr., Koster H. (1997)

Detection of RET proto-oncogene codon 634 mutations using mass spectrometry.

J Mol Med 75: 745-750

34. Little DP., Braun A., Darnhofer-Demar B., Koster H. (1997)

Identification of apolipoprotein E polymorphisms using temperature cycled primer oligo base extension and mass spectrometry.

Eur J Clin Chem Clin Biochem 35: 545-548

35. Little DP., Braun A., O'Donnell MJ., Koster H. (1997)

Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis.

Nat Med 3: 1413-1416

36. von Mutius E., Martinez FD., Fritsch C., Nicolai T., Roell G., Thiemann HH. (1994)

Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany

Am J Respir Crit Care Med 149: 358-364

37. Nicola N., Greenhalgh C.J. (2000)

The suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins. Important feedback inhibitors of cytokine action.

Experimental Hematology 28: 1105-1112

38. Pusch W., Wurmbach JH., Thiele H., Kostrzewa M. (2002)

MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping.

Pharmacogenomics 3: 537-548

39. Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. (2004)

Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Aufl., München: Urban&Fischer-Verlag

40. Romagni S. (1992)

Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology.

Int Arch Allergy Immunol 98: 279-285

41. Sandberg ML., Sutton SE., Pletcher MT., Wiltshire T., Tarantino LM., Hogenesch JB., Cooke MP. (2005)

c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation.

Dev Cell 8:153-166

42. Sanger F., Nicklen S., Coulson AR. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463–5467

43. Schedel M., Carr D., Klopp N., Woitsch B., Illig T., Stachel D., Schmid I., Fritzsich C., Weiland SK., v. Mutius E., Kabesch M. (2004)

A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels.

J Allergy Clin Immunol 114: 1100-1105

44. Schedel M., Carr D., Woitsch B., Schmid I., Fritzsich C., Weiland SK., v. Mutius E., Kabesch M. (2005)

Polymorphismen in der IL-4/IL-13-Signalkaskade beeinflussen die IgE-Regulation und Asthma bronchiale.

Allergologie 28:307-314

45. Seki Y. et al. (2003)

SOCS-3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses.

Nat Med 9: 1047-1054

46. Shirakawa I., Deichmann KA., Izuhara I., Mao I., Adra CN., Hopkin JM. (2000)

Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling.
Immunol Today 21: 60-64

47. Starr R., Willson TA., Viney EM. et al. (1997)

A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.
Nature 387: 917-921

48. Stein RT., Holberg CJ., Morgan WJ., Wright AL., Lombardi E., Taussig L., Martinez FD. (1997)

Peak flow variability, methacholine responsiveness and atopy as markers for detecting different wheezing phenotypes in childhood.
Thorax 52: 946-952

49. Stoiber D., Kovarik P., Cohney S. et al. (1999)

Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma.
J Immunol 163: 2640-2647

50. Storm N., Darnhofer-Patel B., van den BD., Rodi CP. (2003)

MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping.
Methods Mol Biol 212: 241-262

51. Umeshita-Suyama R., Sugimoto R., Akaiwa M., Arima K., Yu B., Wada M., Kuwano M., Nakajima K., Hamasaki N., Izuhara K. (2000)

Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor alpha chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation.
Int Immunol 12: 1499-1509

52. Weiland SK. et al (1999)

Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification.

Eur Respir J 14: 862-870

53. Wills-Karp M. (2000)

The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits.

Respir Res 1: 19-23

54. Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X., Schofield B., Neben TY., Karp CL., Donaldson DD. (1998)

Interleukin-13: central mediator of allergic asthma.

Science 282: 2258-2261

55. Woitsch B., Carr D., Stachel D., Schmid I., Weiland SK., Fritzscher C., v. Mutius E., Kabesch M. (2004)

A comprehensive analysis of interleukin-4 receptor polymorphisms and their association with atopy and IgE regulation in childhood.

Int Arch Allergy Immunol 135: 319-324

56. Yasukawa H., Misawa H., Sakamoto H. et al. (1999)

The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop.

EMBO J 18: 1309-1320

57. Yasukawa H., Ohishi M., Mori H., Murakami M., Chinen T., Aki D., Hanada T., Takeda K., Akira S., Hoshijima M., Hirano T., Chien KR., Yoshimura A. (2003)

IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages.

Nat Immunol 4: 551-556

58. Zhang JG., Farley A., Nicholson SE. et al. (1999)

The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation.

Proc Natl Acad Sci USA 96: 2071-2076

7 ANHANG

7.1 Geräte

- DNA-Sequenzierer: ABI 3730 DNA Analyzer 63920 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- Gel-Dokumentationssystem: KODAK Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak, Stuttgart/Wangen, D)
- Gelelektrophoreseapparatur:
 - BIO RAD Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
 - BIO RAD Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)
- Massenspektrometer: BIFLEX II-TOF (Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen, D)
- Mikrowelle: Bosch, Stuttgart, D
- PCR-System:
 - eppendorf Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, D)
 - PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Boston, USA)
- Pipettierroboter:
 - Pipettierroboter Genesis 150 (Tecan AG, Crailsheim, D)
 - Pipettierroboter Multimek 96 (Beckman/Sagain, Unterschleißheim, D)
 - Sequenom Spectro Point Nanoliter Pipetting Systems (Sequenom, Hamburg, D)
 - Pipettierroboter Te-MO (Tecan AG, Crailsheim, D)
- Photometer: eppendorf BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Pipetten: eppendorf Research 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- Tischzentrifuge: Hettich Zentrifugen Mikro 20 (Hettich GmbH, Tuttlingen, D)
- Vortexer: Scientific Industries Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., NY, USA)

- Waage: Kern 440-33 (Kern, Ballingen, D)
- Wasserbad: Köttermann Labortechnik, D (Köttermann GmbH, Uelze, D)
- Zentrifuge: eppendorf Centrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, D)

7.2 Computerprogramme

7.2.1 Pipettierroboter

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

7.2.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

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

7.2.3 Sequenzierung

- DNA Sequencing Analysis Software Version 3.6.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- 3100 Data Collection Software Version (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)

7.2.4 Primer und PCR-Bedingungen

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

7.2.5 Analyse genomischer DNA-Sequenzen

- BioEditSequence Alignment Editor (Hall 1999,
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

7.2.6 Datenbanken aus dem Internet

- National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)
- CHIP Bioinformatics Tools (<http://snpper.chip.org/bio/>)
- MAT-Inspector (<http://www.genomatix.de/>)
- FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>)

7.2.7 Statistische Programme

- SAS 9.1.3
- SAS/Genetics

7.3 Puffer, Lösungen, Reagenzien

7.3.1 Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Extraktion

- Ery-Lyse-Puffer [155mM NH₄Cl (Merck, Darmstadt, D), 10mM KHCO₃ (Merck, Darmstadt, D), 0,5M EDTA pH = 8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), ad H₂O mit pH = 7,4]
- Proteinase-K-Puffer [1M Tris/Cl pH = 7,5 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 0,5M EDTA pH = 8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 5M NaCl (Sigma-Aldrich, Osterode, D)]
- SDS 20 % (Na-Dodecylsulfat, Serva, Heidelberg, D)
- EtOH 100 % (Ethanol absolut zur Analyse, Merck, Darmstadt, D)
- TE-Puffer [10mM Tris/Cl (Sigma-Aldrich, Osterode, D), 1mM EDTA pH = 8 (Sigma-Aldrich, Osterode, D)]

7.3.2 Puffer, Lösungen, Reagenzien für die PCR

- 10x Puffer S [100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, 0,1 % Tween 20, 15 mM MgCl₂; (PeqLab Erlangen, D)]
- 10x Puffer Y [200 mM Tris-HCl (pH 8.55), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20, 20 mM, MgCl₂; (PeqLab, Erlangen, D)]

- MgCl₂ 25mM (Promega GmbH, Mannheim, D)
- Betain 5M (Sigma-Aldrich, Osterode, D)
- H₂O Water Molecular Biology Grade (Eppendorf AG, Hamburg, D)
- dNTP-Set je 100mM (PeqLab, Erlangen, D)

7.3.3 Puffer, Lösungen, Reagenzien für die Sequenzierung

- 10x PCR Buffer containing 15mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden., D)
- LiChrosolv H₂O, HPLC grade (Merck, Darmstadt, D)
- FG, 3100 POP6 Sequenziergel (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- Sequenzierpuffer 5 x

7.3.4 Puffer, Lösungen, Reagenzien für die MALDI-TOF

- 10x PCR Buffer containing 15mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden., D)
- 4x dNTPs (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- MgCl₂ 25mM (Qiagen, Hilden., D)
- MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 25 (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)
- MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 26 (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)
- MassExtend Nucleotide Mix Pack Tri 28 (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)
- HME MassEXTEND Nucleotide Tri-Mix-Pack (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)
- 3-Punkt Kalibrant (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)
- hME-Puffer (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)
- Spectro CLEAN (SEQUENOM, San Diego, CA, USA)

7.3.5 Puffer, Lösungen, Reagenzien für die DNA-Gelelektrophorese

- 100bp DNA-Ladder 500µg/ml (New England Biolabs, Frankfurt a. Main, D)
- SeaKem LE Agarose (Cambrex Bioscience Rockland, ME, USA)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Osterode, D)
- Loading dye (30 % Glycerin, Bromphenolblau, Xylenecyanol-FF)

- 5 % TBE-Puffer [54g Tris-Puffer, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA (pH=8), ad 1l H₂O]

7.4 Reaktionskits

7.4.1 PCR-Aufreinigung

- Montage 96PCR Plates (Millipore, D)

7.4.2 Sequenzierkits

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

7.4.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

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

7.5 Enzyme

7.5.1 Polymerasen

- Taq-Polymerase 5U/μl
- Thermosequenase (Amersham Bioscience, Freiburg, D)
- HotStar Taq (5units/μl; Qiagen, Hilden., D)

7.5.2 sonstige Enzyme

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

7.6 Primer

7.6.1 PCR-Primer

- bezogen von Metabion (Planegg/Martinsried, D), siehe Tabelle 2.1

7.6.2 PEP-Primer

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

7.6.3 Sequenzier-Primer

- bezogen von Metabion (Planegg/Martinsried, D), siehe Tabelle 2.8

7.6.4 MALDI-TOF-Primer

- Sense-/Antisense-/Extensions-Primer von Metabion (Planegg/Martinsried, D),
siehe Tabellen 2.11 und 2.12

7.7 Sonstige Materialien

- Thermo-Fast 96 PCR Plates (Low Profile; Peqlab, Erlangen, D)
- Mikrotiterplatten (Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- Thermofast 384 MTP (ABgene, Surrey, UK)
- 96-er Clusterplates (Qiagen, Hilden., D)
- DNA-Material der Primatenspezies Schimpanse, Gorilla, Orang-Utan, Gibbon
und grüne Meerkatze bezogen von ECACC: European collection of cell cultures
(Wiltshire, England)

DANKSAGUNG

Mein Dank geht an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Allergogenetik, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Dabei möchte ich mich im speziellen bedanken bei

- PD Dr. Michael Kabesch für die Bereitstellung des Themas, sein Engagement bei der Betreuung und den Korrekturarbeiten
- Dr. Wilfried Peters für die fachliche Unterstützung und die netten Gespräche
- Michaela Schedel für ihre Bereitschaft, in jeglicher Situation helfend zur Seite zu stehen
- Michael Kormann für Rat und Tat vor allem in computertechnischen Belangen
- Martin Depner für die statistische Auswertung und die Beseitigung diesbezüglicher Unklarheiten
- Leonardo Araujo-Pinto für seine besonders engagierte und nette Hilfe bei etlichen Belangen
- Sonja Zeilinger für die Hilfe bei der Durchführung der Sequenzierarbeiten
- Anja Pleiss und Ilona Dahmen für ihre Unterstützung und die lustigen Stunden im Labor
- Anna Lenz für die nette Zusammenarbeit und den motivierenden Austausch
- allen Mit-Doktoranden für das angenehme Arbeitsklima im Labor
- Dr. Dieter Andres, dem Experten für Bilder und Format
- meiner Familie und meinen Freunden für ihr Durchhaltevermögen, mich bis zum Ende meines Studiums auf vielerlei Weise unterstützend zu begleiten

LEBENS LAUF

Dipl. biol. Stephanie Eva Maria Harabacz
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: griech.-katholisch
Geburtsdatum: 07. Oktober 1974
Geburtsort: München

SCHULBILDUNG

1981 – 1985	Grundschule an der Führichstr., München
1985 – 1994	Michaeli-Gymnasium, München Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,9)

HOCHSCHULSTUDIUM

1994 – 1995	Studium der Psychologie, Kath. Universität Eichstätt
1995 – 2001	Studium der Dipl.-Biologie, LMU München Abschluss: Diplom (Note 1,5)
2000 – 2001	Doppelstudium Dipl.-Biologie/Humanmedizin, LMU München
2000 – 2002	Vorklinischer Teil des Studiums der Humanmedizin, LMU München 30/08/2002: Ärztliche Vorprüfung (Note 2,66)
2002 – 2006	Klinischer Teil des Studiums der Humanmedizin, TU München 28/08/2003: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3) 26/08/2005: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,66)
2005 – 2006	Praktisches Jahr: TU München, Klinik für Innere Medizin TU München, Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie TU München, Klinik für Chirurgie
Oktober 2006	20/10/2006: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,49) 30/10/2006: Erhalt der Approbation als Ärztin

WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN / PROMOTION

2000 – 2001	Diplomarbeit im Fach Biologie, Fachbereich Humangenetik (Thema: „Neue auf der FISH-Technik basierende Ansätze zur hochauflösenden Analyse von Telomeren“, Veröffentlichung der Ergebnisse in Hum. Genet. 2001, 109: 576-583), LMU München, Betreuer PD Dr. med. M. R. Speicher
2004 – 2007	Promotion im Fachbereich Humangenetik/Pädiatrie („Die Rolle von SOCS3-Polymorphismen bei Asthma bronchiale und Atopie im Kindesalter“), LMU München, Betreuer PD Dr. med. M. Kabesch