

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

**Die Rolle von Single-Nukleotid-Polymorphismen im Gen  
der Interleukin-4-Rezeptor-alpha-Kette bei der Entstehung  
von Asthma bronchiale und atopischen Erkrankungen**

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

vorgelegt von  
Bernd Woitsch  
aus  
München

2008

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

Berichterstatter: PD Dr. med. M. Kabesch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Behr  
Prof. Dr. Ralph Rupp

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2008

# 1. INHALTSVERZEICHNIS

<u>1. Inhaltsverzeichnis</u>	<u>3</u>
<u>2. Einleitung</u>	<u>6</u>
2.1. Die Bedeutung des IL-4/IL-13 bei der IgE-vermittelten Immunreaktion	6
2.2. Genetik allergischer Erkrankungen	10
2.3. Genetik von IL-4R $\alpha$	11
2.3.1. IL-4R $\alpha$ _A148G	14
2.3.2. IL-4R $\alpha$ _T1432C	15
2.3.3. IL-4R $\alpha$ _A1652G	15
2.4. Genetik weiterer Komponenten der Signalkaskade	16
2.4.1. Interleukin-4 (IL-4)	17
2.4.2. Interleukin-13 (IL-13)	18
2.4.3. Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6)	18
2.5. Ziele der Arbeit	19
<u>3. Methoden</u>	<u>21</u>
3.1. Population	21
3.2. Fragebogen	21
3.3. Haut-Prick-Test (SPT)	22
3.4. IgE-Messung	23
3.5. Lungenfunktionsprüfung	24
3.5.1. Leipzig	24
3.5.2. München	24
3.6. DNS-Extraktion	24
3.7. Bestimmung des DNS-Gehaltes der Proben	25
3.8. Sequenzierung	25
3.9. PCR	25
3.10. Genotypisierung	26
3.10.1. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	26
3.10.2. Allel-spezifische PCR ( <sup>as</sup> PCR)	27

3.10.3. IL-4R $\alpha$ _A148G	28
3.10.4. IL-4R $\alpha$ _T1432C	30
3.10.5. IL-4R $\alpha$ _A1652G	32
3.11. Qualitätskontrolle der Genotypisierung	33
3.12. Statistische Analysen	34
3.12.1. Statistische Analysen der Einzelloziationen	34
3.12.2. Haplotypanalysen innerhalb des IL-4R $\alpha$ -Gens	36
3.12.3. Genüberschreitende Haplotypanalyse mit IL-4_C-589T und IL-13_G2044A	37
4. Ergebnisse	38
<hr/>	
4.1. Qualitätskontrolle der Genotypisierung	38
4.1.1. Qualitätskontrolle IL-4R $\alpha$ _A148G	38
4.1.2. Qualitätskontrolle IL-4R $\alpha$ _T1432C	38
4.1.3. Qualitätskontrolle IL-4R $\alpha$ _A1652G	39
4.2. Analyse der Assoziationen mit den einzelnen SNPs	39
4.2.1. Assoziationsergebnisse IL-4R $\alpha$ _A148G	39
4.2.2. Assoziationsergebnisse IL-4R $\alpha$ _T1432C	42
4.2.3. Assoziationsergebnisse IL-4R $\alpha$ _A1652G	44
4.3. Haplotypisierung	45
4.3.1. Linkage Disequilibrium der SNPs im IL-4R $\alpha$ in der untersuchten Population	45
4.3.2. Paarweise Haplotypisierung der drei untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$	46
4.3.3. Gemeinsame Haplotypisierung der drei untersuchten SNPs in IL-4R $\alpha$	48
4.4. Genüberschreitende Haplotypanalyse	50
4.4.1. Paarweise Analyse der SNPs im IL-4R $\alpha$ und von IL-4_C-589T im IL-4-Promotor	50
4.4.2. Kombinationsanalyse von SNPs im IL-4R $\alpha$ und im Gen von IL-4	51
4.4.3. Paarweise Analyse der SNPs im IL-4R $\alpha$ und von IL-13_G2044A	54
4.4.4. Kombinationsanalyse aus SNPs im IL-4R $\alpha$ (A148G und A1652G) und von IL-13_G2044A	56
4.4.5. Kombinationsanalyse aus SNPs im IL-4R $\alpha$ (A148G und A1652G) und dem STAT6-Gen (C2892T und T12888C)	58

<u>5. Diskussion</u>	<u>60</u>
5.1. Einleitung und Limitationen	60
5.2. Einflüsse der Studienpopulation aus Ost- und Westdeutschland	63
5.3. IL-4R $\alpha$ _A148G	64
5.4. IL-4R $\alpha$ _T1432C	68
5.5. IL-4R $\alpha$ _A1652G	69
5.6. Analysen der Haplotypen innerhalb der IL-4R $\alpha$ -Kette	71
5.7. Genüberschreitende Interaktionen der SNPs	73
5.7.1. Analysen mit IL-4 und IL-4R $\alpha$	73
5.7.2. Analysen mit IL-13 und IL-4R $\alpha$	74
5.7.3. Analysen mit STAT6 und IL-4R $\alpha$	76
<u>6. Zusammenfassung</u>	<u>78</u>
<u>7. Anhang</u>	<u>80</u>
7.1. Abkürzungsverzeichnis	80
7.2. Verwendete Primer von Metabion, Neuried bei München	83
7.3. Darstellung der Schmelztemperatur und des Anteils der GC-Basen beim Primer für die Allel-spezifische PCR des SNPs IL4-R $\alpha$ _A1652G	84
7.4. Puffer für Restriktionsenzyme und sonstige Materialien von New England Biolabs	84
7.5. Puffer für die DNS-Extraktion	85
7.6. Graphische Übersicht der Exons und Introns sowie der im Jahr 2001 bekannten SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen	86
7.7. Komplementäre DNS (cDNS) des humanen Chromosom 16, Darstellung der Exons 12 und 5	87
7.8. Abbildungsverzeichnis	89
7.9. Literaturverzeichnis	93
7.10. Danksagung	103
7.11. Lebenslauf	104

## 2. EINLEITUNG

Unter Allergie versteht man eine inadäquate Abwehrreaktion auf natürlich vorkommende Stoffe durch das Immunsystem des betroffenen Organismus. Zur Gruppe der allergischen Erkrankungen zählen unter anderem Asthma bronchiale und Heuschnupfen, welche abgesehen von der individuellen Belastung durch Arbeitszeit- und Schulausfall auch bedeutende gesellschaftliche Probleme verursachen (Janeway 2005). Als häufigste chronische Erkrankung des Kindesalters gehören sie auch zu den pädiatrischen Herausforderungen. Asthma bronchiale betrifft bis zu 10 % aller Schulkinder in Deutschland und besitzt in den westlichen Industrienationen teilweise noch höhere Prävalenzen (Asher, Keil et al. 1995; Daniels, Bhattacharrya et al. 1996; Palmer and Cookson 2000; Berdel 2002).

Warum das Immunsystem von Organismen Stoffe aus der natürlichen Umwelt als Allergene bewertet und mit einer überschießenden Abwehr reagiert, ist noch nicht geklärt. Jedoch kann bei diesen Erkrankungen bei den Patienten eine Erhöhung des Gesamt-Immunglobulin E (IgE) festgestellt werden, ebenso gelingt der Nachweis von spezifischem IgE gegen auslösende Allergene. IgE, produziert von Plasmazellen in Lymphknoten und mit dem hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεR<sub>1</sub>) an Mastzellen oder basophile Granulozyten gebunden, gehört nach der Klassifikation von Coombs und Gell zum entscheidenden Mediator sowohl der allergischen Sofort- wie auch der Spätreaktion (Coombs and Gell 1963; Janeway 2005).

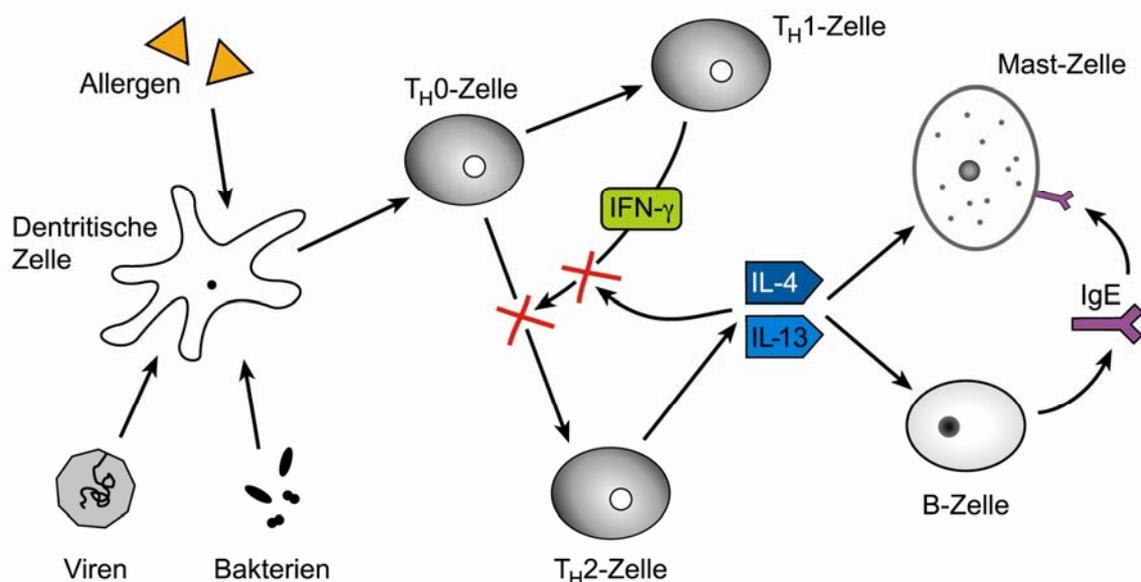
### 2.1. Die Bedeutung des IL-4/IL-13 bei der IgE-vermittelten Immunreaktion

Den Anfang einer allergischen Immunreaktion bilden die antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC). DC phagozytieren Allergene und präsentieren Fragmente in Form von Peptiden mithilfe von MHC (Major Histocompatibility)-II-Molekülen auf der Zelloberfläche den nativen T<sub>H</sub>0-Zellen. Die T<sub>H</sub>0-Zellen erkennen die ihnen dargebotenen Antigene mittels eines für das Antigen spezifischen T-Zell-Rezeptors. Der Komplex aus MHC-II-Molekül, Antigen und passendem T-Zellrezeptor ist in der Lage, die Ausreifung und Aktivierung der nativen T<sub>H</sub>0- Zelle zu T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2 bewirken. Die T<sub>H</sub>1-gewichtete Immunantwort aktiviert über Interleukin (IL)-2, Interferon-gamma (IFN-γ) und Tumornekrose-Faktor (TNF)-β die zellvermittelte Immunität. Im Gegensatz dazu ist die T<sub>H</sub>2-gewichtete Immunreaktion mit der Ausschüttung verschiedener Mediatoren wie IL-4 und IL-13, hohen IgE-Serumspiegeln und eosinophiler Inflammation verbunden. IL-4 selbst kann

wiederum die Expression von Klasse-II-MHC-Proteinen zur Antigenpräsentation erhöhen (Youn, Hwang et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass IL-4 ein wesentlicher Verstärker einer in Richtung  $T_H2$  gewichteten T-Zell-Differenzierung ist, wohingegen  $IFN-\gamma$  eine starke  $T_H2$ -suppressorische Wirkung zukommt (Parronchi, De Carli et al. 1992).  $T_H1$  und  $T_H2$  stellen demnach ein durch negative Feedbackmechanismen konkurrierendes System dar. Nach diesem, auch  *$T_H1$ -/ $T_H2$ -Hypothese* genannten Modell führt eine Fehleinstellung dieses Systems zu einer Fortsetzung des frühkindlich überwiegenden, IgE-produzierenden  $T_H2$ -Pfades.

Die Interleukine-4 und -13 sind in der Lage, das von  $T_H1$ -Zellen gebildete  $IFN-\gamma$  im Sinne der Aufhebung einer Inhibition zu blocken und somit eine verstärkte Ausdifferenzierung in Richtung  $T_H2$  zu fördern. Erst durch die Interaktion zwischen aktivierter  $T_H2$ -Zelle und immunkompetenter B-Zelle kommt es zur vermehrten Bildung von allergen-spezifischem IgE. IL-4 führt also zu einer vermehrten Differenzierung von  $T_H0$  zu  $T_H2$  und damit zu einem in Richtung allergischer Reaktion verschobenem Verhältnis zwischen  $T_H1$  und  $T_H2$  (Or, Renz et al. 1994; Cohn, Whittaker et al. 2002).

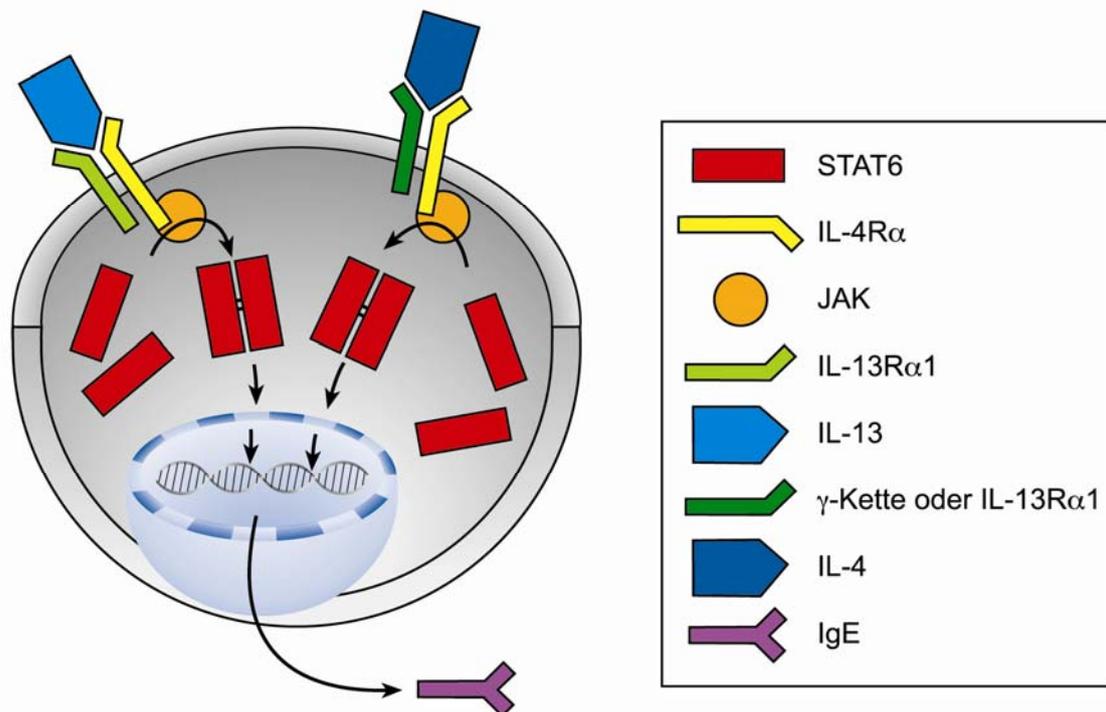
Ohne IL-4 kann kein IL-4 gebildet werden und ohne IL-4 findet kein Antikörper-, „Switch“ von IgM zu IgE statt. Damit ist der IL-4 Signalweg essentiell für IgE-vermittelte allergische Reaktionen (Vercelli 1995) [Abbildung 2.1].



[Abbildung 2.1] Die Rolle von IL-4 und IL-13 bei der T-Zell-Differenzierung und IgE-Produktion.

IL-13 kann unter anderem von dendritischen Zellen, aktivierten T<sub>H</sub>2-Zellen und B-Zellen gebildet werden und ist IL-4 funktionell sehr ähnlich (Rolling, Treton et al. 1996). So ist IL-13 wichtig für eine optimale Induktion der IgE-Synthese und kann IFN- $\gamma$  blockieren (de Vries and Zurawski 1995; Punnonen, Yssel et al. 1997; de Vries 1998). IL-13 kann im Tiermodell unabhängig von IL-4 eine bronchiale Übererregbarkeit mit Bronchokonstriktion, vermehrter Schleimproduktion und Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten provozieren (Grünig, Warnock et al. 1998). Dieses sind neben der chronischen Inflammation wesentliche Bestandteile des allergischen Asthmas.

Sowohl IL-4 wie auch IL-13 signalisieren über einen Rezeptorkomplex, bestehend aus jeweils einer spezifischen, sowie einer gemeinsamen Komponente. Diese gemeinsame Komponente ist die IL-4-Rezeptor- $\alpha$ -Kette (IL-4R $\alpha$ , *Cluster of Differentiation* CD 124). [Abbildung 2.2]



[Abbildung 2.2] IL-4R $\alpha$  als gemeinsame Komponente des IL-4- und IL-13-Rezeptors.

IL-4R $\alpha$  gehört zur Familie der Hämatoetin-Rezeptoren und ist ein Protein bestehend aus 825 Aminosäuren mit einer extrazellulären Bindungsstelle, einer solitären transmembranen und einer intrazellulären Domäne (Cosman 1993; Kruse, Forster et al. 1999). IL-4R $\alpha$  wird von B- und T-Zellen, endothelialen und epithelialen Zellen, Fibroblasten, hämatopoetischen (Vorläufer-) Zellen und Makrophagen exprimiert. Durch alternatives Splicing oder limitierte Proteolyse entsteht eine lösliche Form (*soluble* IL-4R $\alpha$ ), deren Rolle in der Modulation der Rezeptorantwort durch Abfangen des Liganden gesehen wird (Jung, Schrader et al. 1999; Kruse, Forster et al. 1999; Hackstein, Hecker et al. 2001).

Zellmembran-gebundenes IL-4R $\alpha$  bildet nach der Bindung von IL-4 gemeinsam mit der unspezifischen  $\gamma$ -Kette ( $\gamma_c$ ; CD 132) den IL-4-Rezeptor und dient kombiniert mit der IL-13-Rezeptor- $\alpha$ 1-Kette (IL-13R $\alpha$ 1) dem IL-13 als Rezeptorkomplex (Shirakawa, Deichmann et al. 2000). Beide Rezeptorkomplexe stellen dimere transmembrane Proteine dar, welche auf ihrer zytosolischen Seite mit Januskinasen (JAK $_n$ ) aus der Familie der Tyrosinkinase assoziiert sind. Durch die Dimerisation der jeweils beiden Rezeptorketten wird bei IL-4R $\alpha$  JAK $_3$ , bei der  $\gamma$ -Kette JAK $_1$  und bei IL-13R $\alpha$ 1 JAK $_2$  oder eine weitere Tyrosinkinase (TYK $_2$ ) aktiviert. Durch JAK $_3$  wird mit STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription) das Bindeglied in der intrazellulären Signalkaskade phosphoryliert, welches nach Dimerisation in Form von zwei phosphorylierten STAT6-Molekülen in den Zellkern vordringt und an Promotorregionen von IL-4 und IL-13 susceptiblen Genen bindet [Abbildung 2.2, siehe vorherige Seite]. Hierdurch findet eine Regulation von IgE-Produktion und T $_H$ 2-Differenzierung statt (Corry and Kheradmand 1999). Ebenso können an der intrazellulären Domäne von IL-4R $\alpha$  Insulin-Rezeptor-Substrat-(IRS $_n$ ) Proteine binden und über Phosphorylierung auf Wachstum und Überleben der Zelle sowie für die Genexpression im Zellkern Einfluss nehmen (Kelly-Welch, Hanson et al. 2003).

Da es sich beim IL-4R $\alpha$  um einen zentralen Bestandteil der IL-4- und IL-13-Signalkaskade handelt, kann angenommen werden, dass genetisch bedingte Veränderungen des Rezeptors die Signalkaskade beeinflussen und das Risiko für allergische Erkrankungen modifizieren könnte.

## 2.2. Genetik allergischer Erkrankungen

Die klinische Beobachtung, dass allergische Erkrankungen familiär gehäuft vorkommen, geht auf Meinhard von Pfaundler zurück (Pfaundler 1933). Sie ist bereits 1971 im Rahmen von Zwillingsstudien validiert worden. Hierbei wurde bei genetisch identischen (monozygoten) Zwillingspärchen im Vergleich zu genetisch nicht-identischen (dizygoten) Zwillingen überzufällig häufig eine allergische Erkrankung berichtet. Bei gleichen Umweltbedingungen legte dies den Verdacht auf eine genetische Beteiligung bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen nahe. Diese nicht durch Umwelteinflüsse zu erklärende Konkordanz bei genetisch identischen Zwillingen konnte zunächst für Asthma bronchiale, dann aber auch für Heuschnupfen, atopisches Ekzem und erhöhtes Gesamt-IgE im Serum der Probanden festgestellt werden (Edfors-Lubs 1971; Hopp, Bewtra et al. 1984; Duffy, Martin et al. 1990; Koppelman, Los et al. 1999).

Bei der Untersuchung vieler betroffener Familiengenerationen wird deutlich, dass sich allergische Erkrankungen wie Asthma bronchiale nicht mit den von monogenen Erkrankungen bekannten Vererbungsmodi wie autosomal-gonosomal oder rezessiv und dominant beschreiben lassen. Vielmehr sind allergische Erkrankungen polygen vererbt und werden durch Umwelteinflüsse getriggert (Feijen, Gerritsen et al. 2000).

Um die beteiligten Gene zu identifizieren, können mittels Mikrosatellitenmarkern, welche auf bestimmten Genabschnitten binden und diese markieren, chromosomale Regionen (Loci) im Vererbungsgang von einer Generation zur Nächsten verfolgt werden. Bei gleichzeitigem Vorliegen von phänotypischen Daten kann so versucht werden, eine Genregion mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit dem Auftreten von allergischen Erkrankungen zuzuordnen. Ein ähnliches Prinzip wie diesem „Kopplungsanalyse“ genanntem Verfahren liegt der Geschwisterpaaranalyse zugrunde, bei welcher das Auftreten von Mikrosatellitenmarkerbestimmten Genregionen mit der Ausprägung einer Erkrankung oder Nichterkrankung bei Geschwistern in gleicher Umwelt untersucht wird. Beide Verfahren haben dazu beigetragen, Gene mit einer Assoziation zu allergischen Erkrankungen zu entdecken (Deichmann, Heinzmann et al. 1998; Haagerup, Bjerke et al. 2002; Wjst, Kruse et al. 2002).

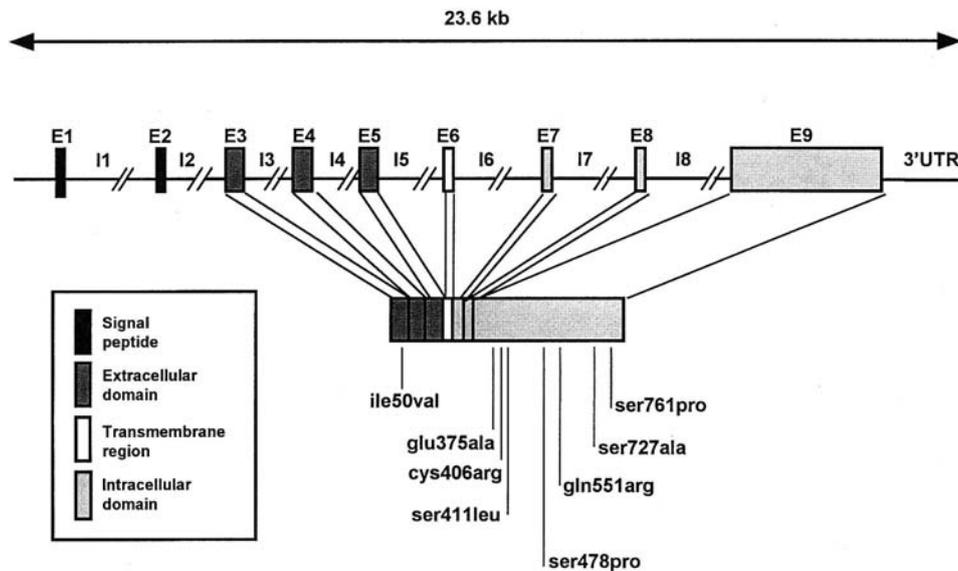
Nachdem die auf diese Weise identifizierten Genregionen häufig mehrere Megabasenpaare groß sind, ist im Anschluss an die Kopplungs- oder Geschwisterpaaranalyse eine Einengung der markierten Region hilfreich. Diese Einengung kann beispielsweise ein im betreffenden Bereich liegendes Gen eines funktionell für die untersuchte Krankheit bedeutsamen Proteins darstellen. Gene, die auf diese Weise entweder funktionell oder durch ihre Lage im Genom entscheidend für die Entstehung oder Ausprägung einer Erkrankung sein können, nennt man Kandidatengene. In Assoziationsstudien wird versucht, in einer möglichst großen Population von betroffenen und gesunden Personen Veränderungen an diesen Genen mit dem Auftreten von bestimmten krankheitsrelevanten Phänotypen zu assoziieren. Diese Genveränderungen (Mutationen) treten im Genom auch spontan regelmäßig als Austausch eines Basenpaares auf und werden bei einer Häufigkeit von über 3 % in der Bevölkerung als Single-Nucleotide-Polymorphismus (SNP) bezeichnet.

### 2.3. Genetik von IL-4R $\alpha$

1990 wurde der Interleukin-4-Rezeptor als Kettenglied in der Immunantwort identifiziert (Idzerda, March et al. 1990), ein Jahr später konnte IL-4R $\alpha$  dem Bereich 16p11.2-p12.1 zugeordnet werden (Pritchard, Baker et al. 1991). Den zweiten Teil des Rezeptors für IL-4 bildet eine 1993 als gemeinsame Einheit von IL-2R und IL-4R entdeckte *common- $\gamma$ -chain* ( $\gamma_c$ ) (Harad, Castle et al. 1990; Kondo, Takeshita et al. 1993; Russell 1993; Russell, Keegan et al. 1993) [Abbildung 2.2, siehe Seite 8]. Für IL-13 sind zwei spezifische Rezeptorketten bekannt, wobei die Kombination von IL-13R $\alpha$ 1 mit IL-4R $\alpha$  zu einer intrazellulären Transmission führt (de Vries 1998).

Mithilfe von Mikrosatelliten-Markern konnten Verbindungen zwischen dem Genlocus des IL-4R $\alpha$  und allergischen Erkrankungen gefunden werden, jedoch ist die Studienlage inkonsistent (Deichmann, Heinzmann et al. 1998; Forrest, Dunn et al. 1999; Hackstein, Hofmann et al. 1999; Izuhara and Shirakawa 1999; Mitsuyasu, Yanagihara et al. 1999; Noguchi and Shibasaki 1999; Haagerup, Bjerke et al. 2001; Kauppi, Lindblad-Toh et al. 2001; Xu, Meyers et al. 2001; Haagerup, Bjerke et al. 2002; Mujica-Lopez and Flores-Martinez 2002; Wjst, Kruse et al. 2002). IL-4R $\alpha$  -/- Knockout-Mäuse entwickelten trotz verspäteter Bildung von IgE und allergischen Reaktionen keine obstruktive oder chronisch inflammatorische Lungenerkrankung (Grunewald, Teufel et al. 2001). Kodierende Single-

Nucleotide-Polymorphismen (SNPs), welche zum Austausch von Aminosäuren im Aufbau von IL-4R $\alpha$  und damit potentiell zu einer morphologischen und funktionellen Veränderung des Rezeptorproteins führen, könnten sowohl protektive wie auch aggravierende Effekte auf allergische Erkrankungen haben (Wang, Shelburne et al. 1999; Gessner and Rollinghoff 2000; Kruse, Braun et al. 2002; Risma, Wang et al. 2002). Im Jahr 2000 waren acht kodierende SNPs im Gen des IL-4R $\alpha$  bekannt [Abbildung 2.3].



[Abbildung 2.3] Schematische Darstellung der acht im Jahr 2000 bekannten kodierenden SNPs im Gen des IL-4R $\alpha$  (Ober, Leavitt et al. 2000).

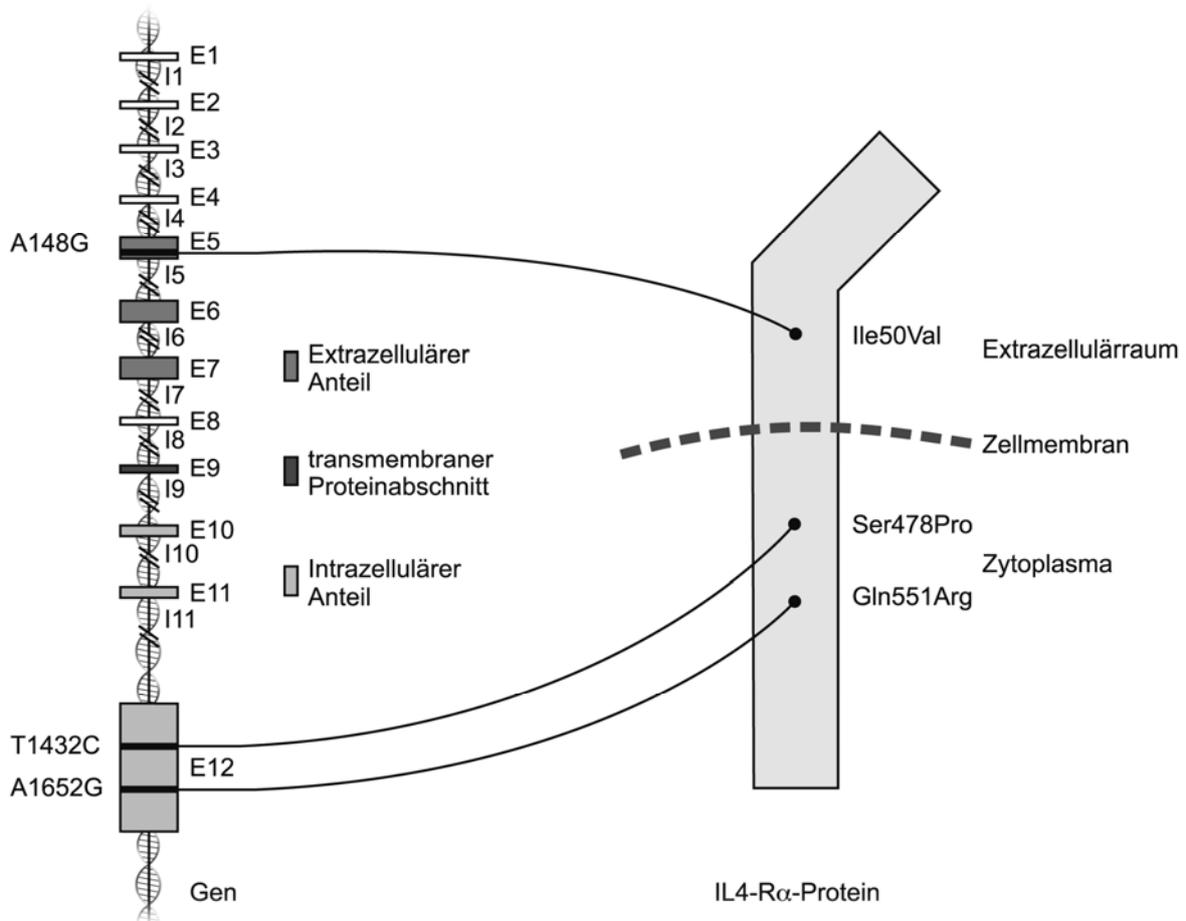
Carol Ober fand in der *Collaborative Study on the Genetics of Asthma* (CSGA), einer großen Studienpopulation (n = 711) in unterschiedlichen ethnischen Gruppen, signifikante Assoziationen zwischen SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen und allergischen Phänotypen wie Asthma bronchiale. Von den acht zu diesem Zeitpunkt identifizierten kodierenden SNPs in den Exons des IL-4R $\alpha$  waren lediglich fünf in allen von C. Ober untersuchten ethnischen Gruppen vertreten. Für diese 5 SNPs wurde das Linkage Disequilibrium (LD) als Maß für Wahrscheinlichkeit der gemeinsamen Vererbung zweier Allelausprägungen bestimmt (Ober, Leavitt et al. 2000) [Abbildung 2.4, siehe folgende Seite].

ETHNIC GROUP AND AMINO ACID	LINKAGE DISEQUILIBRIUM <sup>a</sup> IN AMINO ACID (D')				
	50	375	406	478	551
Blacks:					
50		.120	1.0 <sup>+</sup>	.107	.092
375			1.0 <sup>+</sup>	.314 <sup>**</sup>	.598 <sup>+</sup>
406				1.0 <sup>+</sup>	.376
478					.521 <sup>+</sup>
Whites:					
50		.144	.166	.169	.028
375			1.0 <sup>+</sup>	1.0 <sup>+</sup>	.943 <sup>+</sup>
406				1.0 <sup>+</sup>	1.0 <sup>+</sup>
478					.753 <sup>+</sup>
Hispanics:					
375			1.0 <sup>+</sup>	.843 <sup>+</sup>	.903 <sup>+</sup>
406				1.0 <sup>+</sup>	1.0 <sup>+</sup>
478					.918 <sup>+</sup>

[Abbildung 2.4] Darstellung des Linkage Disequilibrium der Aminosäuren in den jeweiligen Positionen des Proteins in der von C. Ober 2000 untersuchten Population, entnommen aus (Ober, Leavitt et al. 2000).

Die SNPs IL-4R $\alpha$ \_A1124G (entspricht dem Aminosäuretausch Glu375Ala) und IL-4R $\alpha$ \_T1216C (entspricht dem Aminosäuretausch Cys406Arg) waren in allen Populationen in hohem LD mit dem SNP IL-4R $\alpha$ \_T1432C [Abbildung 2.4]. IL-4R $\alpha$ \_T1432C kann daher als repräsentativ für IL-4R $\alpha$ \_A1124G und IL-4R $\alpha$ \_T1216C angesehen werden.

Auf Grundlage dieser repräsentativen Eigenschaft von IL-4R $\alpha$ \_T1432C und der Daten von C. Ober konnte mit der Genotypisierung von drei Polymorphismen, A148G (Ile50Val), T1432C (Ser478Pro) und A1652G (Gln551Arg), eine Aussage über die fünf zu diesem Zeitpunkt bekannten, in allen ethnischen Gruppen relevanten SNPs des IL-4R $\alpha$  getroffen werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Assays für die Leipziger und Münchener Studienpopulation für diese drei SNPs entwickelt. Einen schematischen Überblick über diese untersuchten kodierenden SNPs mit ihren zugehörigen Aminosäureveränderungen im transmembranen Protein liefert die *Abbildung 2.5* auf der folgenden Seite.



[Abbildung 2.5] Schematische Darstellung der Exon (E)- und Intron (I)-Struktur des IL-4R $\alpha$ -Gens in der Region p11.2-p12.1 auf Chromosom 16. Rechts sind die mit den untersuchten Polymorphismen korrespondierenden Aminosäureveränderungen im transmembranen Rezeptorprotein dargestellt.

### 2.3.1. IL-4R $\alpha$ \_A148G

Der Austausch eines Adenins an Stelle 148 nach dem *Open Reading Frame* (ORF) durch ein Guanin führt zu einem Wechsel von Isoleucin zu Valin an Stelle 50 im Protein. Dies ist der einzige bisher bekannte extrazellulär gelegene Aminosäuretausch und wird zudem durch den einzigen nicht im Exon 12 des IL-4R $\alpha$ -Gens gelegenen SNP kodiert (Deichmann, Bardutzky et al. 1997). Damit könnte diesem SNP eine Rolle im Bindungsverhalten der Liganden IL-4 und IL-13 zukommen (Deichmann, Bardutzky et al. 1997; Izuhara and Shirakawa 1999; Izuhara, Yanagihara et al. 2000). In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen der Ausprägung IL-4R $\alpha$ \_A148 die Rezeptorantwort für IL-4 hochreguliert wird, so wie auch die Zell-Proliferation und die IgE-Produktion zunimmt (Mitsuyasu, Izuhara et al.

1998; Howard, Koppelman et al. 2002). In einer Assoziations-Studie (n = 200) konnte IL-4R $\alpha$ \_A148 mit Asthma bronchiale korreliert werden (Takabayashi, Ihara et al. 2000). Ergebnisse von Assoziationsstudien sind jedoch zwiespältig, was möglicherweise auf ethnische Unterschiede zurückzuführen ist (Haagerup, Bjerke et al. 2001). Diverse Studien in unterschiedlichen Populationen konnten die Assoziationen von IL-4R $\alpha$ \_A148G mit allergischen Erkrankungen nicht bestätigen (Noguchi and Shibasaki 1999; Tan, Lee et al. 1999; Gao 2000; Oiso and Fukai 2000; Haagerup, Bjerke et al. 2001; Kauppi, Lindblad-Toh et al. 2001; Tanaka, Sugiura et al. 2001; Haagerup, Bjerke et al. 2002; Mujica-Lopez and Flores-Martinez 2002; Risma, Wang et al. 2002; Wjst, Kruse et al. 2002; Hoebee, Rietveld et al. 2003).

### 2.3.2. IL-4R $\alpha$ \_T1432C

Der SNP IL-4R $\alpha$ \_T1432C führt zum Austausch von Serin an Stelle 478 des IL-4R $\alpha$ -Proteins durch Prolin, liegt im Exon 12 des IL-4R $\alpha$ -Gens und wurde 1999 erstmals beschrieben (Kruse, Japha et al. 1999). Die vorliegenden Assoziationsstudien hinsichtlich Beeinflussung von IgE-Werten oder allergischen Erkrankungen sind inkonsistent (Kruse, Japha et al. 1999; Kauppi, Lindblad-Toh et al. 2001; Bottini and Borgiani 2002; Haagerup, Bjerke et al. 2002; Wjst, Kruse et al. 2002; Liu, Beaty et al. 2003). In funktionellen Studien konnte ein Einfluss dieses SNPs auf die Phosphorylierung von weiteren intrazellulären Signalübermittlern wie dem *Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6)* und dem *Insulin-like Receptor-Substrat (IRS)* gefunden werden, insbesondere bei gemeinsamen Auftreten mit weiteren SNPs des IL-4-Rezeptors (Kruse, Japha et al. 1999).

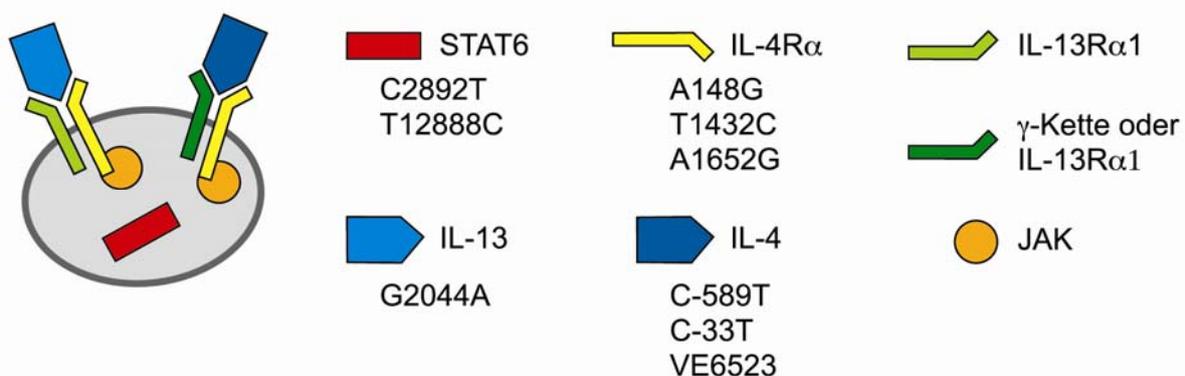
### 2.3.3. IL-4R $\alpha$ \_A1652G

Der SNP IL-4R $\alpha$ \_A1652G führt zu einem Aminosäuretausch von Glutamin (WT) an Stelle 551 zu Arginin (POL). An der unmittelbar in der Aminosäurekette benachbarten Stelle 550 binden mit STAT- und SHP-Proteinen wichtige Übermittler (STAT3 und STAT6) beziehungsweise Kontrollmechanismen (SHP-1 und -2) der weiteren intrazellulären Signalkaskade. Abhängig vom jeweiligen Liganden konnte in manchen funktionellen Studien ein deutlicher Einfluss des SNPs IL-4R $\alpha$ \_A1652G auf die zytosolische Signalübermittlung nachgewiesen werden, was auf diese Nachbarschaft im Rezeptorprotein zurückgeführt wurde (Hershey, Friedrich et al. 1997; Kruse, Braun et al. 2002). Allerdings konnte in einem in-vitro Modell gezeigt werden, dass IL-4R $\alpha$ \_A1652G die spezifische Phosphorylierung von STAT6, einem wesentlichen Glied der intrazellulären Signalkaskade von IL-4R $\alpha$ , nicht beeinflusst

(Wang, Shelburne et al. 1999). Assoziationsstudien konnten einen Zusammenhang zwischen der homozygoten Ausprägung IL-4R $\alpha$ \_1652GG und allergischem Asthma bronchiale und hohem IgE herstellen (Hershey, Friedrich et al. 1997; Grimbacher, Holland et al. 1998; Rosa-Rosa, Zimmermann et al. 1999; Sandford, Chagani et al. 2000; Risma, Wang et al. 2002; Hoebbe, Rietveld et al. 2003). In einer Studie mit allerdings nur geringen Fallzahlen zur atopischen Dermatitis (AD) zeigten nur betroffene Individuen den Polymorphismus Arginin an Stelle 551 (Oiso and Fukai 2000). Dagegen wurden in einzelnen Studien auch gegensätzliche oder fehlende Assoziationen mit allergischen Phänotypen beobachtet (Forrest, Dunn et al. 1999; Kruse, Japha et al. 1999; Malerba, Trabetti et al. 1999; Noguchi and Shibasaki 1999; Tan, Lee et al. 1999; Patuzzo, Trabetti et al. 2000; Wjst, Kruse et al. 2002).

## 2.4. Genetik weiterer Komponenten der Signalkaskade

Will man die Rolle von genetischen Veränderungen bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen untersuchen, sollte das IL-4R $\alpha$ -Gen nicht isoliert betrachtet werden, sondern im Kontext mit weiteren Komponenten der Signalkaskade. Daher wurden bei der vorliegenden Arbeit auch bereits beschriebene und mit allergischen Phänotypen assoziierte SNPs in den Genen der Liganden IL-4 und IL-13, sowie in einem intrazellulären Signalübermittler, STAT6, mit in die Assoziationsanalysen einbezogen [Abbildung 2.6].



[Abbildung 2.6] Übersicht über die in die Haplotypenanalyse involvierten Proteine mit den entsprechenden Genloci.

#### 2.4.1. Interleukin-4 (IL-4)

Das Gen von Interleukin-4 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 5 in der Region 5q31, benachbart mit Genen weiterer immunregulatorischer Proteine wie IL-13, IL-5, IL-3 und IL-9. In Linkage-Studien wurden Signale aus dieser Genregion mit IgE, bronchialer Hyperreaktivität und weiteren allergischen Phänotypen assoziiert (Meyers, Postma et al. 1994; Doull, Lawrence et al. 1996; Martinez, Solomon et al. 1998). Von der Arbeitsgruppe Kabesch wurde DNS von 33 verschiedenen Personen in einem Bereich von 871 bp (Basenpaaren) am 5'-Beginn und 4465 Basenpaaren nach dem 3'-Ende des IL-4-Gens mittels „Denaturing High Performance Liquid Chromatography“ (DHPLC) und nachfolgender Sequenzierung untersucht. Es konnten acht neue Polymorphismen in dem nicht-kodierenden Bereich des Interleukin-4-Gens identifiziert werden. Hiervon lagen 4 SNPs und eine 2-Basenpaar-Deletion im zweiten Intron. Das dritte Intron enthielt einen SNP und einen 70-Basenpaar-Abschnitt, welcher als Wiederholungssequenz in ein-, zwei- oder dreifacher Kopie vorlag (Variable Element = VE).

In einer Untergruppe von 55 zufällig gewählten Kindern der Münchener Population wurde das Linkage Disequilibrium (LD) bestimmt. In dieser Untergruppe fand man ein hohes LD für 7 der gefundenen SNPs ( $\delta > 0,985$ ), so dass für weitere Analysen ein Referenz-SNP (IL-4\_C-33T) als ausreichend angesehen wurde. Neben diesem wurde die ISAAC-Population (n = 1120) in der genannten Arbeit noch für IL-4\_C-589T, IL-4\_G2979T und IL-4\_VE6523 genotypisiert. Es konnte eine Assoziation mit dem im Promotorbereich liegenden SNP C-589T und Asthma bronchiale sowie zwischen IL-4\_VE6523 und Gesamt-IgE gefunden werden. Keine Assoziation zeigten die getesteten SNPs beziehungsweise VEs mit den Phänotypen allergische Dermatitis (AD), bronchiale Hyperreaktivität (BHR) und allergische Rhinitis (AR) (Kabesch, Baldini et al. 2000). In weiteren Studien zeigte IL-4\_C-589T eine Assoziation mit Asthma bronchiale, FEV<sub>1</sub> als Schwereindikator von asthmatischen Beschwerden und Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben (Burchard, Silverman et al. 1999). Jedoch konnten diese Ergebnisse in anderen Populationen nicht bestätigt werden (Walley and Cookson 1996). Ein weiterer SNP in diesem Gen, IL-4\_G2979T, war assoziiert mit Asthma bronchiale (Kabesch, Tzotcheva et al. 2003; Basehore, Howard et al. 2004).

#### 2.4.2. Interleukin-13 (IL-13)

Das Gen von Interleukin-13 liegt benachbart dem des Interleukin-4 auf 5q23-31. In mehreren Populationen konnte eine Assoziation zwischen IL-13\_G2044A (führt zu einem Aminosäuretausch Arg130Gln) und erhöhten Serum-IgE-Spiegeln oder Asthma bronchiale gezeigt werden (van der Pouw Kraan, Van Veen et al. 1999; Graves, Kabesch et al. 2000; Heinzmann, Mao et al. 2000; Van Der Pouw Kraan, Kucukaycan et al. 2002; Liu, Beaty et al. 2003; Wang, Xing et al. 2003).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass IL-13 unabhängig von IL-4 und ohne Einfluss auf die IgE-Produktion oder der Anwesenheit von eosinophilen Granulozyten in der Lage ist, bronchiale Hyperreaktion und verstärkte bronchiale Schleimbildung zu induzieren. Obwohl diese Wirkung durch IL-4R $\alpha$  und STAT6 vermittelt scheint, ist der genaue Signalweg bisher unbekannt (Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998). Bei bestehenden Asthmasymptomen im Tiermodell konnten durch selektives Ausschalten von IL-13 Lungenparameter wie FEV<sub>1</sub> signifikant verbessert werden. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die selektive Neutralisation von IL-13 zur Verminderung der induzierten Asthmasymptome führen kann. Ebenso konnte mittels IL-13 eine T-Zell-unabhängige bronchiale Schleimproduktion und Muskelkontraktion hervorgerufen werden (Grünig, Warnock et al. 1998; Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998; Vercelli 2002).

#### 2.4.3. Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6)

Das Gen des *Signal Transducer and Activator of Transcription 6* (STAT6) liegt auf 12q13-q24. Funktionelle Studien zeigten, dass STAT6-defiziente Mäuse auf Allergenexposition im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren nicht mit bronchialer Hyperreaktivität oder pulmonaler Mucusproduktion reagieren (Akimoto, Numata et al. 1998; Kuperman, Schofield et al. 1998; Miyata and Matsuyama 1999). Ebenso konnten gezeigt werden, dass der Klassenwechsel von IgM zu IgE und die Ausdifferenzierung von T<sub>H0</sub> zu T<sub>H2</sub> STAT6-abhängige Vorgänge sind (Shimoda, van Deursen et al. 1996; Takeda, Tanaka et al. 1996; Kaplan, Wurster et al. 1999). In einer 108 Familien umfassenden Zwillingsstudie wurden alle 23 Exons sowie die angrenzenden Bereiche der Introns und der Promotor-Bereich des STAT6-Gens auf SNPs untersucht. In dieser Studie wurden 13 nicht-kodierende SNPs gefunden, eine Dinukleotid-Wiederholungs-Sequenz im Exon 1 zeigte eine deutliche Assoziation mit Eosinophilie (Tamura, Arakawa et al. 2001; Duetsch, Illig et al. 2002),

schwächere Assoziationen ließen sich zwischen erhöhten Serum-IgE-Spiegeln und SNPs in den Introns des Gens beobachten. Mit weiteren getesteten Phänotypen, wie Asthma oder bronchialer Hyperreaktivität, zeigten sich keine Assoziationen. In einer Studie mit Münchener und Leipziger Kindern waren zwei nicht-kodierende SNPs (C2892T und T12888C) mit Gesamt-IgE-Spiegeln assoziiert (Schedel, Carr et al. 2004; Weidinger, Klopp et al. 2004).

## 2.5. Ziele der Arbeit

Der Interleukin-4-Rezeptor, im Besonderen die alpha-Kette des Rezeptors, ist aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Entwicklung einer T<sub>H</sub>2-gewichteten Immunantwort und Entstehung von allergischer Reaktionsbereitschaft ein vielfach in Assoziationsstudien erforschter Kandidat. Die Ergebnisse der bestehenden Studien hinsichtlich der Assoziation von genetischen Veränderungen im IL-4-Rezeptor mit allergischen Phänotypen wie Asthma bronchiale und allergischer Rhinitis sind jedoch teils widersprüchlich, funktionelle Daten aus Tiermodellen werden kontrovers diskutiert. (Mitsuyasu, Izuhara et al. 1998; Forrest, Dunn et al. 1999; Hackstein, Hofmann et al. 1999; Izuhara and Shirakawa 1999; Mitsuyasu, Yanagihara et al. 1999; Noguchi and Shibasaki 1999; Oiso and Fukai 2000; Kauppi, Lindblad-Toh et al. 2001; Tanaka, Sugiura et al. 2001; Xu, Meyers et al. 2001; Mujica-Lopez and Flores-Martinez 2002; Wjst, Kruse et al. 2002).

Die bisherigen Arbeiten zu einzelnen SNPs im Gen des IL-4R $\alpha$  und ihrer Assoziation zu allergischen Phänotypen sind jedoch aufgrund geringer Fallzahl der Studienpopulation oft nicht aussagekräftig (Palmer and Cookson 2001). Erst in jüngerer Vergangenheit wurde begonnen, auch Gen-Gen-Interaktionen der einzelnen SNPs des IL-4R $\alpha$ -Gens und ihre Assoziation mit allergischen Erkrankungen in Studien zu erfassen.

Die vorliegende Arbeit versucht, anhand einer großen europäischen Studienpopulation von Kindern im Alter von 9 bis 11 Jahren aus Ost- und Westdeutschland (n = 1120) die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Effekte kodierender SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen auf die Entstehung allergischer Krankheiten im Kindesalter zu verifizieren. Daher wurden stellvertretend für die IL-4R $\alpha$ -Polymorphismen in der kodierenden Region die drei Polymorphismen A148G, T1432C und A1652G genotypisiert und analysiert. Insbesondere soll eine Aussage zur Assoziation dieser Polymorphismen mit einer Veränderung des Gesamt-

IgE der Probanden, der Erkrankungen Asthma bronchiale sowie Heuschnupfen getroffen werden. Zusätzlich werden die Phänotypen *bronchiale Überempfindlichkeit* sowie *atopisches Asthma bronchiale* auf ihre Assoziation mit den Genotypen getestet. Die Rolle von genetischen Veränderungen im IL-4R $\alpha$ -Gen soll darüber hinaus im Zusammenspiel mit anderen Gen-Veränderungen in der IL-4-/IL-13-Signalkaskade untersucht werden.

## 3. METHODEN

### 3.1. Population

In den Jahren 1995 und 1996 wurden in München (ca. 1.3 Mio. Einwohner) und Leipzig (ca. 530000 Einwohner) Querschnittsstudien zur Erforschung von Asthma und Allergie im Kindesalter durchgeführt. Die Untersuchungen wurden auf Grundlage von randomisierten Stichproben aus vierten Klassen der Gemeindeschulen vorgenommen. Da die große Mehrzahl der Kinder in der 4. Klasse im Alter zwischen 9 und 11 Jahren waren (> 95 %), wird im Folgenden der Begriff der 9- bis 11-Jährigen synonym verwendet. Die Münchener Kinder wurden gemäß dem Protokoll der ISAAC-Studie mittels Elternfragebogen, Hautuntersuchungen, Haut-Prick-Test (= *Skin-Prick-Test*, SPT), Blutabnahmen, Spirometrie und bronchialen Provokationstest untersucht (Weiland and von Mutius 1999). In Leipzig wurde entsprechend eines ähnlichen, jedoch in einigen Punkten nicht identischen Protokolls vorgegangen (von Mutius, Weiland et al. 1998). Auf Unterschiede der Protokolle wird, falls vorhanden, im Folgenden speziell eingegangen. Insgesamt 1120 deutsche Kinder aus Leipzig und München konnten in die Studie eingeschlossen werden, da von ihnen zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit sowohl DNS-Proben wie auch vollständige Fragebogeninformationen vorlagen.

Die für die genübergreifende Haplotypanalyse verwendete Population von Schedel et al. (STAT6) aus München und Leipzig war mit der Population dieser Studie identisch. Auch die bei Kabesch (IL-4) und Graves (IL-13) verwendete Population war, neben Weiteren, aus der Population der Leipziger und Münchener Kinder gebildet worden (Graves, Kabesch et al. 2000; Kabesch, Baldini et al. 2000; Schedel, Carr et al. 2004).

### 3.2. Fragebogen

Alle Fragebogen wurden über die Schulen an die Eltern geschickt und von diesen ausgefüllt. Bei den Münchener Schülern wurden gemäß den Kernfragen der ISAAC-Studie Symptome von Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis und allergischem Ekzem abgefragt (Asher, Keil et al. 1995), (ISAAC Steering Committee (Writing Committee: Beasley R 1998). Im Speziellen wurde gefragt: *Diagnostizierte ein Arzt jemals eine der folgenden Krankheiten an*

ihrem Kind: a) Asthma; b) asthmatische, spastische oder obstruktive Bronchitis; c) Bronchitis? Die Kinder wurden in die Gruppe *Ärztliche Diagnose Asthma bronchiale* aufgenommen, wenn die Eltern eine ärztliche Asthma-Diagnose angaben, oder wenn laut elterlicher Auskunft der Arzt mehr als einmal *asthmatische, spastische oder obstruktive Bronchitis* diagnostiziert hatte. Aus dieser Gruppe wurden jene Kinder in die Kategorie *akutes Asthma bronchiale* aufgenommen, deren Eltern zusätzlich eine pfeifende Atmung ihres Kindes in den letzten 12 Monaten angaben. Des Weiteren wurde nächtlicher oder morgendlicher Husten ohne Erkältung abgefragt. Die von einem Arzt gestellte Diagnose Heuschnupfen oder allergische Dermatitis wurde ebenfalls per Fragebogen evaluiert. Auch die derzeitigen und früheren Lebensumstände und familiären Begleitfaktoren der Kinder wurden in detaillierten Fragen erhoben.

### 3.3. Haut-Prick-Test (SPT)

Im Haut-Prick-Test wurden die teilnehmenden Kinder auf sechs häufige inhalative Allergene getestet. Sowohl in München wie auch in Leipzig wurde *Dermatophagoides pteronyssinus*, Graspollen und Katzenschuppen getestet. Zusätzlich wurde in München ein Test auf *Dermatophagoides farinae*, *Alternaria tenuis* und gemischte Baumpollen und in Leipzig auf Birken- und Haselnusspollen und Hundeschuppen durchgeführt [Tabelle 3.1].

München	Leipzig
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<i>Dermatophagoides farinae</i>	
<i>Alternaria tenuis</i>	
Graspollen	Graspollen
Katzenschuppen	Katzenschuppen
gemischte Baumpollen	
	Birken- und Haselnusspollen
	Hundeschuppen

[Tabelle 3.1] *Getestete Allergene in den zwei Studienpopulationen.*

In München kamen standardisierte Allergen-Extrakte und Kontroll-Lösungen von ALK (Horsholm, Dänemark) zur Anwendung, in Leipzig wurde ein standardisiertes Kit von Stallergenes verwendet. Als Positivkontrolle diente Histamin (10 mg/ml), als Negativkontrolle 0,9 %iges Natriumchlorid. Die Testung wurde auf der Volarseite des linken Unterarmes mit Lanzetten vorgenommen, das Ergebnis nach 15 Minuten abgelesen. Das Ergebnis wurde als *positiv* bewertet, wenn das Mittel aus größter Länge und einer senkrecht dazu gemessenen Linie abzüglich der Negativkontrolle größer oder gleich 3 mm gemessen wurde. Kinder, die nach dieser Definition im Hautpricktest positiv auf eines der in *Tabelle 3.1* genannten Allergene reagierten, wurden als atopisch definiert.

### 3.4. IgE-Messung

Die Messungen des Gesamt-IgE im Serum wurden mit dem Immulite System (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) durchgeführt und werden im Folgenden mit dem geometrischen Mittelwert und dem zugehörigen 95 %-Konfidenzintervall (*Confidence Interval*, CI) angegeben. Aufgrund unzureichender Werte in der Standardliteratur für einen physiologischen Bereich des Serum-IgEs bei Kindern im Alter der Studienpopulation dienten die gemessenen IgE-Werte aller ISAAC-Studienkinder aus Leipzig, München und Dresden (n = 4825) für dessen Bestimmung (Bazaral, Orgel et al. 1971; Hamburger 1971; Behrman, Kliegman et al. 2004; Hamburger 2005). Die 50. Perzentile dieser Population lag bei 60.4 IU/ml, die 66. Perzentile bei 115 IU/ml und die 90. Perzentile bei 457 IU/ml [*Tabelle 3.2*].

	50. Perzentile	66. Perzentile	90. Perzentile
Gesamtpopulation	60.4	115.0	457.0
München	57.6	118.0	464.0
Dresden	63.8	121.0	478.0
Leipzig	58.0	106.0	406.0

[*Tabelle 3.2*] Eckdaten der Serum-IgE-Normalverteilung in der ISAAC-Studienpopulation in IU/ml.

## 3.5. Lungenfunktionsprüfung

### 3.5.1. Leipzig

Mit einem Pneumoskop der Firma Jäger aus Würzburg wurden forcierte Fluss-Volumen-Kurven gemessen, bis mindestens drei reproduzierbare Ergebnisse vorlagen. Die Messung erfolgte vier Minuten vor und nach einer Provokation durch Hyperventilation mit -15 °Celsius kalter (am Mundstück gemessen) und trockener Luft (*Kaltluftprovokation*). Bronchiale Hyperreaktivität wurde dann als gegeben gewertet, wenn das gemessene FEV<sub>1</sub> unter die 95 %-Perzentile der Gesamtpopulation sank (von Mutius, Weiland et al. 1998; Kabesch, Schaal et al. 1999).

### 3.5.2. München

Bei den Münchener Kindern wurde die Lungenfunktion mit dem MasterScope Version 4.1 der Firma Jäger gemessen. Es wurden mindestens 2 Standard-Spirogramme aufgezeichnet und die höchsten von zwei reproduzierbaren forcierten Einsekundenvolumina (FEV<sub>1</sub>) waren die Ausgangswerte der Untersuchung. Bronchiale Hyperreaktivität wurde anhand des Abfalls des FEV<sub>1</sub> nach Inhalation von hyperosmolarer Kochsalzlösung (4.5 %) gemessen. Die Kinder inhalierten die Kochsalzlösung für zunehmende Zeiteinheiten: für ½, 1, 2, 4 und 8 Minuten. Bestehende Asthma-Medikation wurde mindestens 12 Stunden vor der Untersuchung abgesetzt. Ein Kind wurde als bronchial hyperreagibel angesehen, wenn a) entweder das FEV<sub>1</sub> unter 15 % des vorher ermittelten Ausgangswert fiel, oder b) mit einem beständigen Abfall des FEV<sub>1</sub> auf 85-90 % des Ausgangs-FEV<sub>1</sub> bei wiederholter Provokation ein Abbruchkriterium erreicht wurde (Weiland and von Mutius 1999).

## 3.6. DNS-Extraktion

Die DNS wurde aus Leukozyten aus EDTA-Vollblut mithilfe des Protokolls von Miller, Dykes und Polesky gewonnen (Miller, Dykes et al. 1988). Die Erythrozyten wurden mittels Pufferlösung und Erschütterung lysiert, mehrfach zentrifugiert und abpipettiert. Anschließend wurden die Leukozyten mit Proteinase-K-Puffer inkubiert, die Zellbestandteile abzentrifugiert und der DNS-haltige Überstand mit Ethanol gefällt. Schließlich wurden das Ethanol abpipettiert, die DNS luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

### 3.7. Bestimmung des DNS-Gehaltes der Proben

Der DNS-Gehalt der verwendeten Proben wurde mit einem Eppendorf BioPhotometer gemessen und mittels Verdünnung auf einen Wert von 20 µg dsDNS/ml eingestellt. Die Zielgröße des 260/280 nm-Wertes lag zwischen 1.7 und 2.0.

### 3.8. Sequenzierung

Zur Kontrolle der Genotypisierungen mittels Allel-spezifischer PCR und Enzymverdau wurden Sequenzierungen von Einzelproben vorgenommen. Die Reinigung hierfür wurde mit dem Säulchenreinigungsverfahren von Quiagen nach dem QIAquick-PCR-Purification-Kit-Protokoll durchgeführt, bei welchem nach einer Amplifikation durch PCR die an ein Säulchen gebundene DNS mittels repetitiver Zentrifugation gewaschen und anschließend eluiert wird. Die Proben wurden anschließend von der Firma Medigenomix in Martinsried bei München sequenziert und mit dem Programm Bioedit ausgelesen und analysiert (Tippmann 2004).

### 3.9. PCR

Alle PCR-Reaktionen wurden mit Puffer, Magnesium-Chlorid, dNTPs und Taq-Polymerase der Firmen Promega oder New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Alle Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt. PCR-Primer wurden mithilfe des Programms „Netprimer“ von Premier Biosoft erstellt. Die Spezifität der Primer wurde mithilfe von NCBI-Blast untersucht. Für die Optimierung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von Primer-Paaren wurde der Gradientenblock eines „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf benutzt, für die folgenden PCR-Reaktionen wurden Thermocycler dieser Firma verwendet. Das Probenvolumen betrug sowohl bei der Allel-spezifischen PCR wie auch bei den Ansätzen für einen Restriktionsverdau jeweils 15 µl. Alle PCR-Reaktionen wurden mit einer 2-minütigen Denaturierungsphase von 96 °Celsius eingeleitet und mit 4-minütiger Verlängerungsphase (Elongation) bei 72 °Celsius beendet. Für die Ansätze wurde bei einem PCR-Produkt von höchstens 439 Basenpaaren (bp) 40 PCR-Zyklen mit jeweils 20 Sekunden Denaturierung, Schmelzen (Annealing) und Verlängerungsphase gewählt.

## 3.10. Genotypisierung

### 3.10.1. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Beim RFLP werden Verdauungsenzyme (Restriktionsenzyme) eingesetzt, welche abhängig von einer definierten Basenpaarfolge (meist 4 bis 6 Basen) an die DNS binden können und inner- oder außerhalb dieser Erkennungssequenz die Basenpaarfolge unterbrechen. Diese Restriktionsenzyme sind Nukleasen, die DNS an spezifischen Stellen schneiden können und werden nach den Bakterien benannt, aus denen sie gewonnen werden.

Das Restriktionsenzym wird so gewählt, dass der zu untersuchende SNP innerhalb der Erkennungssequenz liegt. Nachdem das Enzym den Schnitt der DNS nur dann vornimmt, wenn es seine spezifische Erkennungssequenz vorfindet, entstehen abhängig vom Vorhandensein des SNPs entweder geschnittene oder ungeschnittene DNS-Stücke. Die dadurch entstandenen Längenunterschiede können mittels einer Gelelektrophorese, in der verschieden lange DNS-Fragmente im elektrischen Feld unterschiedlich weit wandern, sichtbar gemacht werden.

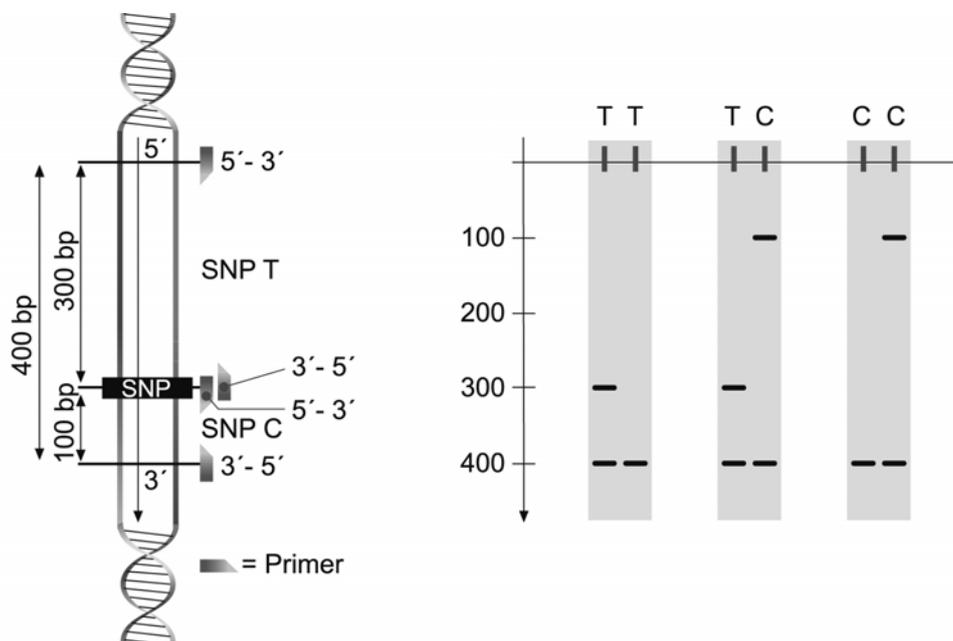
Es muss allerdings in jeder dieser Untersuchungen kontrolliert werden, dass die Bedingungen für einen Schnitt bei Erkennen der entsprechenden DNS-Sequenz ausreichend waren, da sonst ein Versagen des Enzyms trotz Vorhandensein des zu detektierenden SNPs nicht ausgeschlossen werden könnte. Zu dieser Funktionskontrolle für Ansatz und Enzym ist ein vom Vorliegen des SNPs unabhängiger zweiter Schnittpunkt nötig. Die Lage der Schnittpunkte kann ebenso wie die Länge des PCR-Produkts mithilfe einer standardisierten DNS-bp-Leiter, einer alle 100 bp geschnittenen DNS, kontrolliert werden. Zur Abschätzung der benötigten Restriktionsenzym-Menge dient eine standardisierte DNS-Probe, in dieser Arbeit wurde hierfür Lambda-DNS der Firma Fermentas mit einer Konzentration von 300 µg DNS/ml benutzt (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

Für keinen der Versuchsansätze war ein Enzym verfügbar, welches die SNP-spezifischen Veränderungen selektiv detektieren konnte. Daher wurde jeweils durch den Austausch einer Base in den Primern in 3'-Richtung des Polymorphismus ein *Missmatch* erzeugt, um die Erkennungssequenz für ein Enzym mittels der PCR-Reaktion künstlich zu erstellen. Restriktionsenzyme schneiden in Nähe ihrer Erkennungssequenz, welche durch diese Methode des *Missmatches* innerhalb der Länge des Primers von 20 bis 30 bp liegt. Um

Unterschiede bei solch geringen Schnittlängen zuverlässig zu erkennen, wurden PCR-Produkte mit einer Gesamtlänge von  $< 300$  bp angestrebt und hochauflösende Agarosegele verwendet. Als zuverlässiger und günstiger Versuchsaufbau war die RFLP-Methode Standard bei der Genotypisierung dieser Arbeit

### 3.10.2. Allel-spezifische PCR (<sup>as</sup>PCR)

Bei der <sup>as</sup>PCR wird das Bindungsverhalten der Primer in Abhängigkeit von dem Vorliegen eines SNPs genutzt. Für den Wildtyp und für den Polymorphismus wird jeweils ein spezifisch bindender Primer erstellt. Dieser bildet entweder mit einem gemeinsamen entgegengesetzten Primer das PCR-Produkt, wobei für jede Probe jeweils zwei PCR-Reaktionen durchgeführt werden müssen, oder die Allel-spezifischen Primer bilden einmal als vorwärts ( $5' \rightarrow 3'$  der DNS) und einmal als rückwärts ( $3' \rightarrow 5'$ ) gerichteter Primer mit jeweils entgegengesetzten Primern im selben Ansatz unterschiedlich lange PCR-Produkte, so dass eine Genotypisierung in einem Ansatz möglich ist. Auch bei dieser Methode wird die erfolgreiche PCR-Reaktion mittels einer zusätzlichen Bande überprüft [Abbildung 3.1].



[Abbildung 3.1] Methodischer Aufbau einer Allel-spezifischen PCR-Reaktion. Zur Verdeutlichung wird in diesem Beispiel für jedes Allel eine Bande auf der rechten Gel-Darstellung abgebildet. Wenn die amplifizierten Stücke keine verwechselbare Länge aufweisen, ist dies im tatsächlichen Versuch nicht nötig.

Für die Etablierung einer <sup>as</sup>PCR bietet es sich an, die letzte 3'-Base des Primers zur Detektion zu nutzen, da dies der sensibelste Bereich für die anschließende Verlängerung mit der Taq-Polymerase ist (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Da kein Enzymverdau notwendig ist, ist die Methode der <sup>as</sup>PCR schnell und günstig, jedoch die Etablierung aufgrund der sehr diskreten Unterschiede im Bindungsverhalten deutlich aufwendiger und die Durchführung störanfälliger. Zudem muss bei der erstbeschriebenen Variante die zweifache Menge genomischer DNS eingesetzt werden. Eine Qualitätskontrolle für <sup>as</sup>PCR-Versuche wurde mittels RFLP und Sequenzierung bei mindestens 10 % aller Proben durchgeführt.

Unabhängig von der Methode wurden die Allelfrequenzen zur Plausibilitätskontrolle mit bereits veröffentlichten Werten anderer Studien und den berechneten Hardy-Weinberg-Equilibrium-Werten verglichen (Ober, Leavitt et al. 2000).

Als Grundlage für das Design der Primer und Enzyme, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, diente die mRNA des IL-4R $\alpha$  (Idzerda, March et al. 1990) in der über das *National Center for Biotechnology Information* erhältlichen Version vom 31. Oktober 2000 und die cDNS des *Homo sapiens chromosome 16 working draft* in der Version vom 16. Juli 2001 (Loftus, Kim et al. 1999).

### 3.10.3. IL-4R $\alpha$ A148G

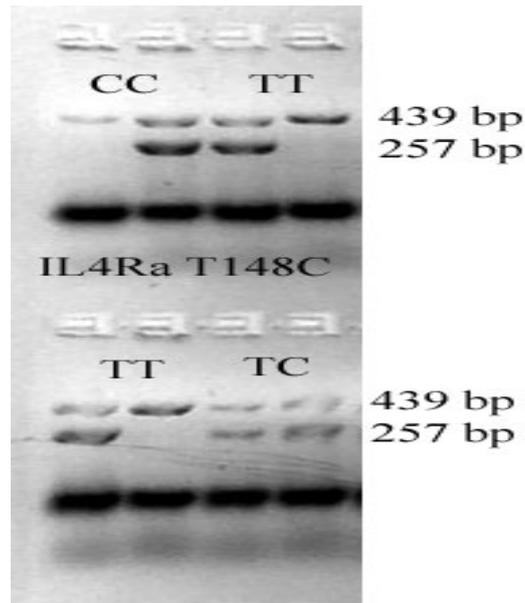
Der Polymorphismus A148G wurde mittels eines Enzymverdaus mit Rsa I (Restriktionsenzym aus *Rhodopseudomonas sphaeroides* der Firma New England Biolabs, Erkennungssequenz und [I]-Schnittstelle GT/AC) genotypisiert. Mit dem Primerpaar 5'-GCC TCC GTT GTT CTC AGG TA-3' (vorwärts) und 5'-TGT GAG GAG CAT CCT TGG TAC-3' (rückwärts) ergab sich ein PCR-Produkt mit 267 Basenpaaren (bp) Gesamtlänge. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Mismatches für die Erkennungssequenz des Enzyms. Bei einem PCR-Produkt von 267 bp schnitten sowohl der Kontroll- wie auch der Detektionsschnitt jeweils 19 bp ab. Damit ergab sich ein unverdautes DNS-Produkt von 267 bp Länge. Der Wildtyp ergab ein Produkt von 267 bp - 19 bp = 248 bp Länge, der Polymorphismus ergab eine Bande bei 267 bp - 38 bp = 229 bp Länge. Bei Heterozygoten traten zwei Banden bei je 248 bp und 229 bp Länge auf.

Der PCR-Ansatz enthielt 1 µl genomische DNS, 1.5 µl Puffer, 1.2 µl Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 0.3 µl dNTPs und jeweils 0.3 µl der 5'- und 3'-Primer, sowie 0,06 µl Taq-Polymerase ad 15 µl H<sub>2</sub>O. Die PCR-Optimierung bezüglich der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) ergab im Gradientencycler die deutlichste Bande zwischen 57,8 und 59,1 °Celsius, im endgültigen Ansatz wurden daher 58 °Celsius als Schmelztemperatur T<sub>m</sub> gewählt. Der Verdau wurde mit 1.7 µl NEB-Puffer 1 (10-fach konzentriert) und 0.2 µl Enzym für 2 Stunden bei 37 °Celsius angesetzt. Anschließend liefen die Proben für 125 Minuten in einem drei-prozentigen Agarosegel in der Elektrophorese.

Zur späteren Qualitätskontrolle wurde zusätzlich zu diesem Verfahren eine Allel-spezifische PCR für diesen SNP entwickelt. Hierbei waren die 5'-Primer für den Wildtyp (WT) 5'-GCC TCC GTT GTT CTC AGG TAT-3' und für den Polymorphismus (POL) 5'-GCC TCC GTT GTT CTC AGG TAC-3'. Das unterstrichene T am 3'-Ende kennzeichnet hierbei einen Mismatch zur Beeinflussung der T<sub>m</sub>, die letzte Base ist jeweils Allel-spezifisch. Der gemeinsame 3'-Primer hatte die Basenfolge 5'-ATC CTT GGT GCA TGT GGT AAG-3'.

Da bei diesem PCR-Design sowohl der Wildtyp wie auch der Polymorphismus die gleiche Produktlänge generieren, muss für jede untersuchte Probe die PCR einmal für den Wildtyp und nochmals für den Polymorphismus getrennt durchgeführt werden.

Die Kontroll-Primer zur Sicherstellung der korrekten PCR-Reaktion waren 5'-GCT TAT ACC CCT CTT CCC CAC-3' als 5'-Primer und 5'-ACG CCC CTC GTC ATC GCA G-3' als 3'-Primer mit einem PCR-Gesamtprodukt von 439 bp. Um die für die Kontrolle sinnvolle schwächere Bandenstärke zu gewährleisten, wurden die Primer in einem Verhältnis von 4 Teilen <sup>as</sup>PCR- zu 1 Teil Kontroll-Primer gemischt. Nach einer Optimierung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration konnten stabile Ergebnisse erreicht werden. Die Ansätze für diese PCR-Reaktionen enthielten 1.5 µl genomische DNS, 1.5 µl Puffer, 1 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µl dNTPs, jeweils 0.4 µl der Detektions- und 0.1 µl der Kontroll-Primer, 0.1 µl der Taq-Polymerase ad 15 µl H<sub>2</sub>O. Die optimale T<sub>m</sub> betrug 59 °Celsius. Die Auftrennung mittels Elektrophorese fand über 60 Minuten auf einem 2.5 %-Agarosegel statt [*Abbildung 3.2, siehe folgende Seite*].

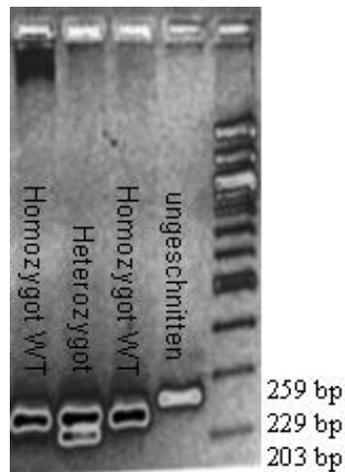


[Abbildung 3.2] Auswertung der <sup>as</sup>PCR für IL-4R $\alpha$ \_A148G. Pro Individuum wird die PCR-Reaktion zuerst mit dem Wildtyp-Primer, dann in der zweiten Gelbahn mit dem Polymorphismus-Primer durchgeführt. Bindet der Primer nur in der ersten Bahn, liegt ein homozygoter WT (TT) vor, bindet er in der zweiten Bahn, liegt der SNP vor. Bei heterozygoten Individuen binden beide Primer, es kommt in jeder Bahn zu einem Produkt von 257 bp Länge (TC). Eine Bahn wird nur ausgewertet, wenn die Kontrollamplifikation mit 439 bp Länge vorliegt. Nachdem die komplementäre DNS amplifiziert wurde, entspricht T = A und C = G.

#### 3.10.4. IL-4R $\alpha$ \_T1432C

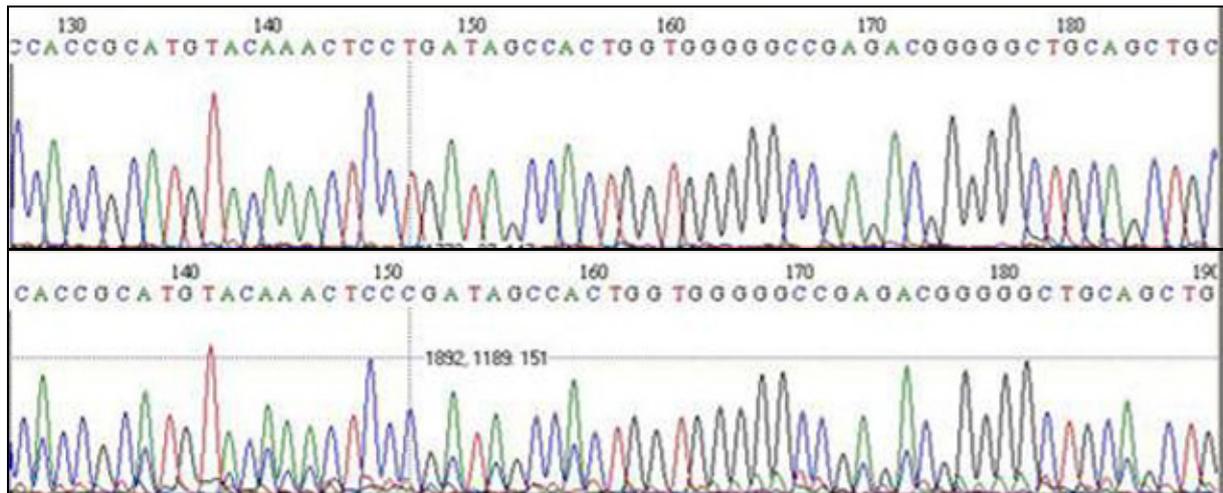
Um den SNP T1432C zu genotypisieren, wurde ein Restriktionsverdau für das Enzym BseRI (Bazillus spezie R, Erkennungssequenz GAGGAG, Schnitt nach 10 beliebigen bp in 3'-Richtung) mit den Primern 5'-GAC ACG GTG ACT GGC TCG AGG-3' (5') und 5'-GCA TCG CCT GAG AGC AGC AG-3' (3') mit einem ungeschnittenen PCR-Produkt von 373 bp entwickelt. BseRI schneidet am 3'-Ende eine Kontrolle von 107 bp (POL), im Falle des WT ergibt sich ein weiterer Schnittpunkt von 33 bp am 5'-Ende des PCR-Produkts. Trotz Optimierung der Versuche mit Betain als Stabilisator der DNS-Tertiärstruktur, Hinzugabe von SH-Gruppen-Donatoren und Veränderungen der MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen schlug der Verdau fehl, weshalb ein alternativer Ansatz entwickelt werden musste.

Durch Mismatch zweier Basen (in Folge unterstrichen) des 5'-Primers konnte, 2 bp vom SNP entfernt, eine Erkennungssequenz für das Enzym *AvaI* (aus *Anabaena variabilis*, Erkennungssequenz C/YCGRG) gebildet werden. Der 5'-Primer war 5'-GCT CTC TGG GAC ACG GTG ACT GGC TCT CGG-3', der 3'-Primer 5'-ATG GGG GAG TCA TGC CTT CTT CCA CCC TCG G-3'. Das Gesamtprodukt der PCR hatte eine Länge von 259 bp, die optimale Schmelztemperatur betrug 65 °Celsius. Der PCR-Ansatz bestand aus 1 µl genomischer DNS, 1.4 µl Puffer, 1.2 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µl dNTPs, jeweils 0.3 µl Primer, 0.1 µl Taq-Polymerase ad 15 µl H<sub>2</sub>O. Der Verdau der 15 µl-Proben fand über mindestens 10 Stunden mit 1.9 µl 10fach-konzentriertem NEB-Puffer 4, 1.7 µl H<sub>2</sub>O und 0.4 µl *AvaI* statt. Die Ergebnisse waren nach einer Elektrophorese-Laufzeit von 150 Minuten auf einem 2.5 %-Agarosegel zuverlässig abzulesen [Abbildung 3.3].



[Abbildung 3.3] Darstellung der Auswertung eines *AvaI*-Verdaus zur Detektion des SNPs *IL-4Rα\_T1432C*. Das ungeschnittene PCR-Produkt besitzt eine Länge von 259 bp, zur Kontrolle der Enzymfunktion wird das Produkt um 30 bp auf 229 bp gekürzt. Bei Auftreten des Polymorphismus werden weitere 26 bp abgeschnitten, es erscheint eine Bande bei 203 bp Länge. Beim homozygoten SNP fehlt die 229 bp-Bande, es erscheint nur eine Bande bei 203 bp (hier nicht dargestellt).





[Abbildung 3.5] Vergleich zweier homozygoter DNS-Proben, oben Wildtyp *IL-4R $\alpha$ \_AA1652* (entsprechend der komplementären *cDNS*, welche amplifiziert und sequenziert wurde), unten der Polymorphismus *IL-4R $\alpha$ \_1652GG*. Die entsprechende Base ist mit dem vertikalen Strich markiert.

Zur Kontrolle der Ergebnisse der Allel-spezifischen PCR wurde auch für *IL-4R $\alpha$ \_A1652G* entsprechend der bisherigen RFLP-Ansätze ein Restriktionsverdau für das Enzym *AvaI* mit dem 5'-Primer 5'-CAA AGG TGA ACA AGG GGA CAG GGA CTC G-3' und dem 3'-Primer 5'-GTC TCG GCC CCC ACC AGT GGC TCT C-3' entwickelt. Hierbei war der Ansatz wie folgt: 1  $\mu$ l genomische DNS, 1.4  $\mu$ l Puffer, 1.2  $\mu$ l  $MgCl_2$ , 0.3  $\mu$ l pro Primer, 0.3  $\mu$ l dNTPs, 0.1  $\mu$ l Taq-Polymerase ad 15  $\mu$ l  $H_2O$ . Die optimale  $T_m$  wurde mit 66 °Celsius bestimmt. Der Verdau fand mit 1  $\mu$ l *AvaI* und 3  $\mu$ l  $H_2O$  für 2 Stunden statt, die Ergebnisse konnten nach einer Laufzeit von 2 Stunden auf einem 2.5 %-Agarosegel abgelesen werden.

### 3.11. Qualitätskontrolle der Genotypisierung

Durch technische Probleme am Gel nicht eindeutig genotypisierbare Proben wurden bis zu zweimal wiederholt. Regelhaft wurde nach Abschluss einer Genotypisierung eine Zufallsstichprobe von mindestens zehn Prozent der Ergebnisse ausgewählt und nochmals genotypisiert.

Zudem wurden die Ergebnisse der Genotypisierung nach Bestimmung der Wildtyp-Allelfrequenz mit den aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz errechneten Allelhäufigkeiten abgeglichen.

Dieses Gesetz kann mit der Formel  $1 = p^2 + 2pq + q^2$  ausgedrückt werden (mit  $p^2 = h[AA]$ ;  $2pq = h[Aa]$ ;  $q^2 = h[aa]$ ) und erlaubt die Bestimmung von Allelfrequenzen in einer idealisierten Population. Bei großen Populationen kann es eine zuverlässige Abschätzung einer erwarteten Allelhäufigkeit leisten. In dieser Arbeit wurden – neben dem Vergleich mit den in anderen Veröffentlichungen berichteten Frequenzen – zur Plausibilitätskontrolle die festgestellten Allelfrequenzen stets mit den Hardy-Weinberg-Erwartungen verglichen.

### 3.12. Statistische Analysen

#### 3.12.1. Statistische Analysen der Einzelassoziationen

Die genetische Ausprägung in einer Einzelstudie kann 3 Werte annehmen: homozygoter Wildtyp, Heterozygotie sowie homozygoter Polymorphismus, da jedes Individuum 2 Allele an gleicher Position besitzt. Aus diesen Möglichkeiten ergeben sich ein dominantes und ein rezessives Modell. Im dominanten Modell werden heterozygoter und homozygot polymorpher (seltener Allelausprägung) Genotyp zusammengefasst und anschließend in einem Vierfelder-Chi-Quadrat-Test hinsichtlich des Auftretens bei einem Phänotyp berechnet. Dementsprechend werden im rezessiven Modell die Häufigkeit des Wildtyp-Allels in homozygoter Form und der heterozygote Genotyp bei betroffenen und nicht-betroffenen Individuen im Vierfeldertest berechnet. Diese Form der Analyse folgt dem *allelischen Modell*.

Betrachtet man einen definierten polymorphen Allelort hinsichtlich der Anzahl einer bestimmten Ausprägung, beispielsweise das Vorhandensein der Base A, so kann dies den Wert 0 (Base A liegt an diesem Allelort nicht vor), 1 oder 2 (Base A liegt einmal respektive zweimal vor) ergeben. Dieses *lineare Modell* nimmt eine Veränderung der Krankheitswahrscheinlichkeit mit wachsender Anzahl einer Allelausprägung an (Sasieni 1997).

Beide Modelle sind nur dann zuverlässig, wenn die Allelfrequenz der untersuchten Population nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweicht und das Ergebnis dichotom ist. Dies ist im Falle der untersuchten Phänotypen und Population gegeben.

Um die Assoziation mit einem Phänotyp zu bestimmen, wurde beim allelischen Modell der Chi-Quadrat-Test, beim linearen Modell der Armitage-Trend-Test durchgeführt.

Als Quotenverhältnis zwischen betroffenen und nicht-betroffenen Individuen im Vierfeldertest wurde das Odds Ratio berechnet (auch *Kreuzproduktverhältnis*). Das Odds Ratio kann Werte zwischen 0 und  $\infty$  annehmen. Ein Odds Ratio von 1.0 bedeutet in der vorliegenden Arbeit, dass sich das zuschreibbare Risiko für einen Phänotyp zwischen zwei Gruppen mit unterschiedlichen Allelausprägungen nicht unterscheidet. Ein Odds Ratio  $> 1$  gibt ein erhöhtes, ein Odds Ratio  $< 1$  ein erniedrigtes Risiko für eine Erkrankung an. Odds Ratios werden stets mit 95 %igem Konfidenzintervall angegeben. Dieses Intervall gibt an, dass in 95 % aller Ziehungen die Odds Ratio innerhalb der Intervallsgrenzen liegen würden. Demzufolge ist das Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$ , ein Ergebnis wird also dann als signifikant interpretiert, wenn die Fehlerwahrscheinlichkeit 5 % nicht übersteigt.

Die statistischen Analysen der Einzelassoziationen wurden mit der Software SAS (Version 8.2) durchgeführt, die Haplotypanalysen mit dem Genetik-Modul von SAS.

### 3.12.2. Haplotypanalysen innerhalb des IL-4R $\alpha$ -Gens

Bei der Haplotypanalyse wurden aus den drei untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$  paarweise und mehrfache Gruppen von Kombinationen gebildet und die jeweilige Frequenz des Auftretens in der untersuchten Population bestimmt. Anschließend wurden aufgrund geringer Fallzahlen und damit unzureichender Aussagekraft alle Haplotypen mit einem Auftreten von weniger oder gleich 5 % in der Population von der Analyse ausgeschlossen. Nun wurden die verbliebenen Haplotypen auf ihre Assoziation mit den Phänotypen hin untersucht, wobei als Referenz für die Nullhypothese (= es gibt keine Korrelation) drei verschiedene Methoden zur Anwendung kamen:

- 1) Ein im Genetikmodul von SAS integriertes Modell namens *SAS Haplotype-Trend-Regression*, bei welcher die Haplotypen entsprechend ihrer Auftretenswahrscheinlichkeit mit in die Referenzgruppe einbezogen werden (Zaykin, Westfall et al. 2002).
- 2) Beim zweiten Modell wurden alle Haplotypen als Referenz gewertet, unabhängig von ihrem tatsächlichen Vorkommen in der Population. Bei dieser Methode ist die Schwelle für die Wertung eines Haplotyps als zur Index- oder Referenzgruppe gehörig willkürlich veränderbar. Carol Ober hat in ihrer Studie alle Haplotypen mit einer Auftretenswahrscheinlichkeit von  $> 0$  als vorhanden gewertet und als Referenzgruppe eingesetzt (Ober, Leavitt et al. 2000).
- 3) In modifizierter Weise, mit einer Schwelle von  $\geq 0.8$  ist diese Methode auch von William Cookson benutzt worden und wird derzeit als konservativste Methode bewertet (Moffatt, James et al. 1999; Cookson and Moffatt 2000). Hier werden also nur jene Haplotypen als Referenzgruppe gewertet, welche mit mindestens 80 % in der jeweiligen Studienpopulation repräsentiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse dann als signifikant gewertet, wenn sie in allen drei Methoden stabil waren. Diese drei unterschiedlichen Methoden wurden auch bei den gegenüberstehenden Analysen eingesetzt.

### 3.12.3. Genüberschreitende Haplotypanalyse mit IL-4\_C-589T und IL-13\_G2044A

Für die Analyse der genübergreifenden Haplotypen wurden zunächst Paare mit den Ausprägungen „Wildtyp in beiden untersuchten SNPs“ als Referenzpopulation gebildet. Als Einflussvariable wurden Paare gewertet, welche entweder heterozygot oder homozygot für den Polymorphismus in einem oder beiden untersuchten Genen waren.

Um eine über das erwartete Maß hinausgehende Assoziation eines Analyseergebnisses mit dem getesteten Phänotyp zu detektieren, wurden signifikante Ergebnisse auf ihre Abweichung von den aus den Einzelanalysen zu erwartenden additiven bzw. multiplikativen Odds Ratios geprüft.

Diese sind nach Botto und Khoury sowohl

1) Additiv

$$OR_1 + OR_2 - 1 = X$$

Abweichung vom erwarteten OR ist beobachtetes OR minus X, und

2) Multiplikativ

$$OR_1 \times OR_2 = Y$$

Abweichung vom erwarteten OR ist beobachtetes OR geteilt durch Y

zu beschreiben (Botto and Khoury 2001).

Wenn aufgrund geringer Fallzahlen der gebildeten Haplotypen abweichend von der sonst in dieser Arbeit verwendeten Methode in den Kombinationsstudien teilweise 100 IU/ml als Grenzwert für „erhöhtes Serum-IgE“ festgelegt und nicht nach den Serum-IgE-Werten stratifiziert wurde, ist das im Ergebnisteil jeweils gesondert angegeben.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Qualitätskontrolle der Genotypisierung

#### 4.1.1. Qualitätskontrolle IL-4R $\alpha$ \_A148G

Bei der <sup>as</sup>PCR für IL-4R $\alpha$ \_A148G waren 22 Proben nicht primär bewertbar und wurden mittels RFLP wiederholt. In der Gesamtpopulation wurden bei teils schlechter Ablesbarkeit von einzelnen Proben insgesamt 306 von 1120 (27.3 %) Proben wiederholt, 26 von 1120 Proben (2.3 %) konnten definitiv nicht erfolgreich genotypisiert werden.

Die Allelfrequenz in der ISAAC-Population war 57.1 % Adenin und 42.9 % Guanin und entsprechen damit den anderen europäisch publizierten Frequenzen (Hackstein, Hecker et al. 2001; Bottini and Borgiani 2002; Howard, Koppelman et al. 2002), weichen jedoch erwartungsgemäß deutlich von den von Carol Ober genotypisierten Allelfrequenzen der südamerikanischen, afrikanischen und der Mormonen-Populationen ab (Ober, Leavitt et al. 2000). Die Genfrequenzen wurden mit den aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Werten verglichen, 33 % der Proben waren homozygot für Adenin, 48 % (Hardy-Weinberg: 49 %) waren heterozygot, 19 % (Hardy-Weinberg: 18 %) waren homozygot für Guanin.

#### 4.1.2. Qualitätskontrolle IL-4R $\alpha$ \_T1432C

Bei dieser Genotypisierung wurden 104 der 1120 Fälle (9.3 %) der Studienpopulation randomisiert wiederholt und ergaben keine Fehlbestimmung. Für 44 Proben (4.1 %) war keine erfolgreiche Genotypisierung möglich. Die Allelfrequenzen für IL-4R $\alpha$ \_T1432 betragen 86.7 %, für IL-4R $\alpha$ \_1432C 13.3 % und entsprachen damit mit einer maximalen Abweichung von 3.4 Prozentpunkten den europäischen Referenzpopulationen, welche von Hackstein 2001 sowie von Bottini 2002 berichtet wurden, sowie weitgehend den südamerikanischen und kaukasischen Populationen der Studie von Carol Ober 2000 und von Howard 2002 (Ober, Leavitt et al. 2000; Hackstein, Hecker et al. 2001; Bottini and Borgiani 2002; Howard, Koppelman et al. 2002). Ebenfalls wurden die Genotyp-Häufigkeiten der Population von den nach Hardy-Weinberg errechneten Werten mit 20 % heterozygoten Trägern (Hardy-Weinberg: 22 %) sowie 3 % homozygoten IL-4R $\alpha$ \_1432CC-Trägern (Hardy-Weinberg: 2 %) bestätigt.

#### 4.1.3. Qualitätskontrolle IL-4R $\alpha$ \_A1652G

146 Proben der 528 Münchener ISAAC-Kinder (27.6 %) und 140 Proben der 592 Leipziger Studienteilnehmer (23.6 %) wurden wiederholt, im Anschluss wurden sämtliche als <sup>as</sup>PCR genotypisierte Proben aufgrund von ungenügender Ablesegenauigkeit mittels Restriktionsverdau (RFLP) überprüft. Die Allelfrequenzen für diesen SNP betragen 79.7 % für die Ausprägung A beziehungsweise 20.3 % für G, decken sich hiermit mit den europäischen Publikationen (Hackstein, Hecker et al. 2001; Bottini and Borgiani 2002; Howard, Koppelman et al. 2002) und entsprechen den berechneten Hardy-Weinberg-Erwartungen (Heterozygotie 33 % in der Population versus 32 % Hardy-Weinberg-Gleichgewicht; Homozygot für den Polymorphismus waren 4 % in der Population und der Hardy-Weinberg-Berechnung).

### 4.2. Analyse der Assoziationen mit den einzelnen SNPs

#### 4.2.1. Assoziationsergebnisse IL-4R $\alpha$ \_A148G

In der Studienpopulation ließ sich keine Assoziation zwischen dem SNP IL-4R $\alpha$ \_A148G und Asthma bronchiale oder Heuschnupfen beobachten.

Heterozygote oder homozygote Träger des SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G aus Leipzig hatten signifikant höhere Serum-IgE-Spiegel als Träger des Wildtyps Adenin sowohl in der kontinuierlichen (59.5 IU/ml vs. 41.9 IU/ml,  $p = 0.004$ ), wie auch in der kategorischen Messung (32.7 % IgE > 100 IU/ml versus 24.2 % bei homozygotem WT,  $p = 0.038$ ). Dieser Trend war auch in der Gesamtpopulation (33.0 % versus 26.6 %,  $p = 0.032$ ), nicht jedoch in der Münchener Population vorhanden [Tabellen 4.1 und 4.2, siehe folgende Seite].

IL-4R $\alpha$ _A148G vs. IgE (IU/ml)	Alle Kinder (IU/ml) (n = 1092)	Leipzig (IU/ml) (n = 581)	München (IU/ml) (n = 511)
oberes 95 % CI für WT	54.35	51.12	65.65
Median WT	47.06	41.90	53.24
unteres 95 % CI für WT	40.74	34.33	43.18
oberes 95 % CI für Het./Pol.	61.78	68.12	60.66
Median Het./Pol.	55.52	59.45	51.22
unteres 95 % CI für Het./Pol.	49.89	51.89	43.25
p-Wert	0.079	0.004	0.784

*[Tabelle 4.1] Mittlere Serum-IgE-Spiegel in den untersuchten Populationen in Abhängigkeit von IL-4R $\alpha$ \_A148G.*

Atopische (SPT  $\geq$  3 mm) Leipziger Kinder, die den Polymorphismus an Stelle 148 dieses Rezeptors tragen, litten vermehrt an wiederholt auftretender Kurzatmigkeit oder Atemnot (71 % vs. 29 %, p = 0.005). 2.78 % der für den Wildtyp homozygoten und 6.87 % der Kinder, die entweder einen oder beide Allele mit dem SNP tragen, fielen als bronchial hyperreaktiv auf (Leipzig p = 0.0477, in München nicht signifikant [n. s.]) *[Tabelle 4.2, siehe folgende Seite].*

Leipziger Kinder (581)	Homozygot Wildtyp (186)	Het./Pol. (395)
Asthma (37)	7.1	6.3
BHR (32)	2.8	6.9*
Heuschnupfen (27)	5.4	4.4
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (158)	24.3	28.6
IgE > 100 IU/ml (174)	24.2	32.7*
Münchener Kinder (513)	Homozygot Wildtyp (175)	Het./Pol. (338)
Asthma (55)	10.9	10.7
BHR (46)	19.3	20.0
Heuschnupfen (46)	11.8	8.0
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (127)	24.6	25.0
IgE > 100 IU/ml (163)	29.1	33.3
Alle Kinder (1094)	Homozygot Wildtyp (361)	Het./Pol. (733)
Asthma (92)	9.0	8.3
Heuschnupfen (73)	8.5	6.0
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (285)	24.4	26.9
IgE > 100 IU/ml (337)	26.6	33.0*

[Tabelle 4.2] Untersuchte Phänotypen in Abhängigkeit von *IL-4R $\alpha$ \_148* (Werte in Prozent, Anzahl *n* in Klammern; \* entspricht  $p \leq 0.05$ ).

<i>IL-4R<math>\alpha</math>_A148G</i> vs. Phänotypen	Alle Kinder (n = 1076) OR (95 % CI) (n)	Leipzig (n = 565) OR (95 % CI) (n)	München (n = 511) OR (95 % CI) (n)
Asthma	0.9 (0.6-1.4) (92)	0.9 (0.4-1.7) (37)	1.0 (0.5-1.8) (55)
BHR	<i>siehe Anmerkung</i>	2.6 (1.0-6.8) (32)	1.0 (0.5-2.0) (46)
Heuschnupfen	0.7 (0.4-1.1) (73)	0.8 (0.4-1.7) (27)	0.7 (0.4-1.2) (46)
Atopisch SPT $\geq$ 3mm	1.1 (0.9-1.5) (285)	1.2 (0.8-1.9) (158)	1.0 (0.7-1.6) (127)
IgE > 100 IU/ml	1.4 (1.0-1.8)* (337)	1.5 (1.0-2.3) (174)	1.2 (0.8-1.8) (163)

[Tabelle 4.3] Odds Ratio der untersuchten Phänotypen (Hauptaussagen) in Abhängigkeit von *IL-4R $\alpha$ \_148* mit Angabe der 95 %-Konfidenzintervalle (CI) (\*  $p < 0.05$ ). Beim Phänotyp BHR wurde aufgrund unterschiedlicher Provokationsmethoden (Kaltluft versus hyperosmolare Kochsalzlösung) kein gemeinsamer Wert bestimmt.

#### 4.2.2. Assoziationsergebnisse IL-4R $\alpha$ \_T1432C

Für diesen SNP wurde keine Assoziation mit den getesteten Phänotypen Asthma bronchiale, Heuschnupfen, positiver SPT oder erhöhtes Gesamt-IgE beobachtet. In der Subgruppe der Leipziger Kinder konnte ein grenzwertig signifikanter protektiver Effekt bezüglich Heuschnupfen beobachtet werden, dieses Resultat war jedoch weder in der Münchener, noch in der Gesamtpopulation stabil [Tabellen 4.4 und 4.5].

Leipziger Kinder (567)	Homozygot Wildtyp (432)	Het./Pol. (135)
Asthma (37)	5.9	9.2
BHR (33)	5.4	7.4
Heuschnupfen (27)	5.9	1.5*
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (155)	26.2	31.1
IgE > 100 IU/ml (172)	31.0	28.1
Münchener Kinder (509)	Homozygot Wildtyp (395)	Het./Pol. (114)
Asthma (55)	10.7	11.4
BHR (45)	20.3	16.0
Heuschnupfen (45)	9.7	7.1
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (123)	24.2	24.6
IgE > 100 IU/ml (158)	31.0	31.6
Alle Kinder (1076)	Homozygot Wildtyp (827)	Het./Pol. (249)
Asthma (92)	8.2	10.2
Heuschnupfen (72)	7.7	4.1
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (278)	25.2	28.1
IgE > 100 IU/ml (330)	31.0	29.7

[Tabelle 4.4] Getestete Phänotypen in Abhängigkeit von IL-4R $\alpha$ \_1432 (Werte in Prozent, Anzahl n in Klammern).

IL-4R $\alpha$ _T1432C vs. Phänotyp	Alle Kinder (n = 1060) OR (95 % CI) (n)	Leipzig (n = 553) OR (95 % CI) (n)	München (n = 507) OR (95 % CI) (n)
Asthma	1.3 (0.8-2.1) (92)	1.6 (0.8-3.3) (37)	1.1 (0.6-2.1) (55)
BHR	<i>siehe Anmerkung</i>	1.4 (0.6-3.0) (33)	0.7 (0.3-1.7) (45)
Heuschnupfen	0.5 (0.3-1.0) (72)	0.2* (0.1-1.1) (27)	0.7 (0.3-1.6) (45)
Atopisch	1.2 (0.8-1.6) (278)	1.3 (0.8-1.9) (155)	1.0 (0.6-1.7) (123)
IgE > 100 IU/ml	0.9 (0.7-1.3) (330)	0.9 (0.6-1.3) (172)	1.0 (0.7-1.6) (158)

[Tabelle 4.5] Odds Ratio für IL-4R $\alpha$ \_T1432C für die getesteten Phänotypen mit Angabe der 95 %-Konfidenzintervalle (CI) (\*  $p < 0.05$ ). Beim Phänotyp BHR wurde aufgrund unterschiedlicher Provokationsmethoden (Kaltluft versus hyperosmolare Kochsalzlösung) kein gemeinsamer Wert bestimmt.

#### 4.2.3. Assoziationsergebnisse IL-4R $\alpha$ \_A1652G

Für IL-4R $\alpha$ \_A1652G wurde keine Assoziation mit den getesteten Phänotypen Asthma bronchiale, Heuschnupfen, positiver SPT oder erhöhtes Gesamt-IgE beobachtet. Ebenso waren die Phänotypen *Asthma bronchiale bei allergischen Kindern (SPT  $\geq$  3 mm)* oder *bronchiale Hyperreaktivität* nicht mit diesem Genotyp assoziiert [Tabellen 4.6 und 4.7].

Leipziger Kinder (583)	Homozygot Wildtyp (373)	Het./Pol. (210)
Asthma (37)	6.9	5.9
BHR (32)	5.7	5.3
Heuschnupfen (28)	6.0	2.9
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (158)	26.9	27.6
IgE > 100 IU/ml (176)	30.8	29.0
Münchener Kinder (500)	Homozygot Wildtyp (313)	Het./Pol. (187)
Asthma (55)	11.3	10.7
BHR (44)	23.0	13.8
Heuschnupfen (44)	9.9	7.7
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (124)	25.4	24.1
IgE > 100 IU/ml (159)	33.4	29.4
Alle Kinder (1083)	Homozygot WT (686)	Het./Pol. (397)
Asthma (92)	8.9	8.2
Heuschnupfen (72)	7.8	5.2
Atopiker SPT $\geq$ 3 mm (282)	26.2	25.9
IgE > 100 IU/ml (335)	32.0	29.2

[Tabelle 4.6] Ergebnisse getestete Phänotypen in Abhängigkeit von IL-4R $\alpha$ \_A1652G (Anzahl n in Klammern).

IL4Ra_A1652G vs. Phänotyp	Alle Kinder (n = 1065) OR (95 % CI) (n)	Leipzig (n = 567) OR (95 % CI) (n)	München (n = 498) OR (95 % CI) (n)
Asthma	0.9 (0.6-1.4) (92)	0.8 (0.4-1.7) (37)	0.9 (0.5-1.7) (55)
BHR	<i>siehe Anmerkung</i>	0.9 (0.4-2.0) (32)	0.5 (0.3-1.1) (44)
Heuschnupfen	0.6 (0.4-1.1) (72)	0.5 (0.2-1.2) (28)	0.8 (0.4-1.5) (44)
Atopisch	1.0 (0.7-1.3) (282)	1.0 (0.7-1.5) (158)	0.9 (0.6-1.4) (124)
IgE > 100 IU/ml	0.9 (0.7-1.1) (335)	0.9 (0.6-1.3) (176)	0.8 (0.6-1.2) (159)

[Tabelle 4.7] Odds-Ratio-Werte der getesteten Phänotypen im Einfluss von IL-4R $\alpha$ \_A1652G mit Angabe der 95 %-Konfidenzintervalle (CI). Beim Phänotyp BHR wurde aufgrund unterschiedlicher Provokationsmethoden (Kaltluft versus hyperosmolare Kochsalzlösung) kein gemeinsamer Wert bestimmt.

### 4.3. Haplotypisierung

#### 4.3.1. Linkage Disequilibrium der SNPs im IL-4R $\alpha$ in der untersuchten Population

Zur Haplotypanalyse wurde zunächst das Linkage Disequilibrium (LD) der getesteten SNPs in der untersuchten Gesamtpopulation bestimmt. Das LD kann Werte zwischen 0 und 1.0 annehmen und ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des gleichzeitigen Auftretens zweier Allelausprägungen in einem Individuum. In der untersuchten Population wurde mit 0.85 ein relativ hohes LD zwischen den SNPs IL-4R $\alpha$ \_T1432C und IL-4R $\alpha$ \_A1652G festgestellt. Dieser Wert liegt zwischen den von Carol Ober 2000 berichteten Werten für nicht-verwandte, weiße und südamerikanische erwachsene Individuen [Tabelle 4.8 und Abbildung 2.5, siehe Seite 14] (Ober, Leavitt et al. 2000).

LD ( $\delta$ -Werte)	IL-4R $\alpha$ _A148G	IL-4R $\alpha$ _T1432C	IL-4R $\alpha$ _A1652G
IL-4R $\alpha$ _A148G	1.0	0.16	0.20
IL-4R $\alpha$ _T1432C	0.16	1.0	0.85
IL-4R $\alpha$ _A1652G	0.20	0.85	1.0

[Tabelle 4.8] Linkage Disequilibrium der untersuchten SNPs in der untersuchten Gesamtpopulation,  $\delta$ -Werte (Lewontin and Kojima 1960).

#### 4.3.2. Paarweise Haplotypisierung der drei untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$

Es wurden aus den drei untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$  paarweise Haplotypen gebildet und die Haplotypfrequenzen bestimmt. Haplotypfrequenzen unter 5 % in der getesteten Population wurden nicht zur weiteren Assoziationsstudie herangezogen. [Tabellen 4.9 bis 4.11].

Haplotyp	Frequenz
AA	0.48
AG	0.10
GA	0.32
GG	0.11

[Tabelle 4.9] Haplotypfrequenzen in der untersuchten Gesamtpopulation für die SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G + IL-4R $\alpha$ \_A1652G.

Haplotyp	Frequenz
AC	0.06
GT	0.35
GC	0.07
AT	0.52

[Tabelle 4.10] Haplotypfrequenzen in der untersuchten Gesamtpopulation für die SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G + IL-4R $\alpha$ \_T1432C.

Haplotyp	Frequenz
TA	0.78
TG	0.09
CA	0.01
CG	0.12

[Tabelle 4.11] Haplotypfrequenzen in der untersuchten Gesamtpopulation für die SNPs IL-4R $\alpha$ \_T1432C + IL-4R $\alpha$ \_A1652G.

Für die Haplotypen IL-4R $\alpha$ \_A148G + IL-4R $\alpha$ \_T1432C und IL-4R $\alpha$ \_T1432C + IL-4R $\alpha$ \_A1652G wurde keine Assoziation mit den Phänotypen Asthma bronchiale, Heuschnupfen, positiver SPT oder erhöhtes Gesamt-IgE (Serum-IgE über 100 IU/ml) gefunden. In der nach Perzentilen stratifizierten Aufteilung hatten Träger des Haplotypen IL-4R $\alpha$ \_148G + IL-4R $\alpha$ \_A1652 häufiger einen über der 50. Perzentile liegenden Serum-IgE-Spiegel, also mehr als 60.5 IU/ml. Allerdings war dieses Ergebnis lediglich nach dem Trend-Regression-Modell von Zaykin und der Cutoff-Methode nach Cookson signifikant, bei der im Methodenteil geschilderten Methode nach Ober betrug der p-Wert 0.065 [Tabelle 4.12].

Der Haplotyp AA in dieser Tabelle ist im Trend-Regressions-Modell und in der Berechnung nach C. Ober signifikant protektiv, jedoch nicht nach der Methode nach W. Cookson [siehe auch Tabelle 4.17b, Seite 53].

Haplo- typ	Frequenz	50. Perzentile (60.4 IU/ml)	66. Perzentile (115 IU/ml)	90. Perzentile (457 IU/ml)
		OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
A148G + A1652G (n = 1067)		n = 474	n = 297	n = 78
AA	0.48	0.67 (0.47-0.96) 0.03	0.90 (0.61-1.32) 0.58	0.84 (0.43-1.64) 0.61
AG	0.10	0.89 (0.46-1.72) 0.74	0.71 (0.34-1.51) 0.38	0.55 (0.14-2.22) 0.41
GA	0.32	1.73 (1.17-2.54) 0.005	1.47 (0.97-2.24) 0.07	1.46 (0.72-2.96) 0.30
GG	0.11	0.91 (0.48-1.70) 0.76	0.65 (0.32-1.34) 0.25	1.01 (0.31-3.34) 0.99

[Tabelle 4.12] Zuordnung der IgE-Schwellen zu den paarweisen Haplotypen von *IL-4R $\alpha$ \_A148G* + *IL-4R $\alpha$ \_A1652G* mit dem jeweiligen Odds Ratio (OR) und den zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (CI) sowie den p-Werten. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002).

### 4.3.3. Gemeinsame Haplotypisierung der drei untersuchten SNPs in IL-4R $\alpha$

Entsprechend dem obigen Vorgehen wurden auch hier die Haplotypfrequenzen der Studienpopulation dargestellt und die Haplotypen  $\leq 5\%$  Auftreten aufgrund sehr niedriger Fallzahlen von weiteren Analysen exkludiert [Tabelle 4.13].

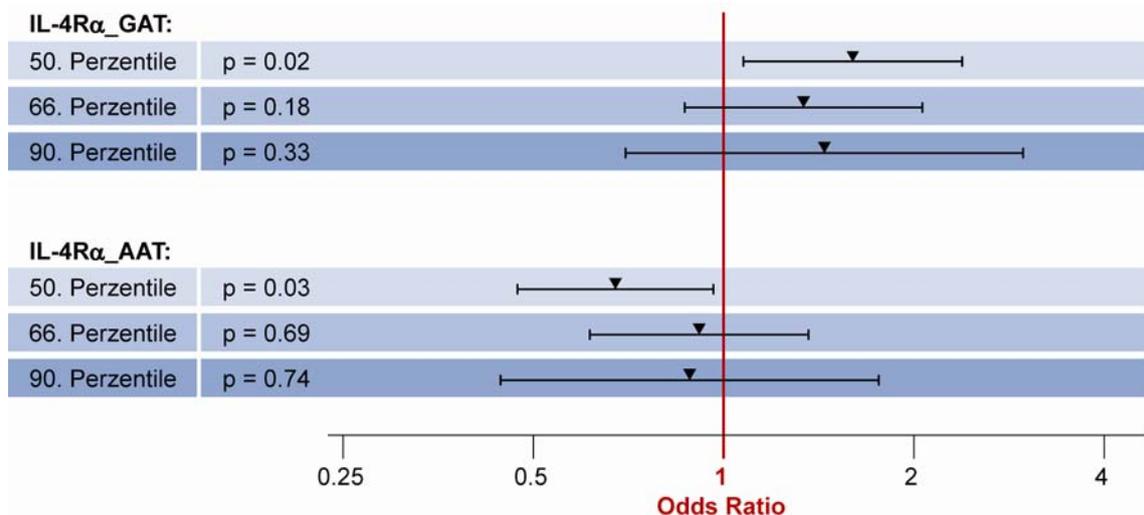
Haplotyp	Frequenz
AAC	0.01
AAT	0.47
AGC	0.05
AGT	0.05
GAC	0.01
GAT	0.31
GGC	0.07
GGT	0.04

[Tabelle 4.13] Haplotypfrequenzen in der untersuchten Gesamtpopulation für die SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G + IL-4R $\alpha$ \_A1652G + IL-4R $\alpha$ \_T1432C. Fünf Haplotypen wurden aufgrund niedriger Fallzahlen von den Analysen exkludiert.

Bei der Studie mit den aus allen drei untersuchten SNPs gebildeten Haplotypen konnte keine Assoziation zwischen den drei häufigeren (über 5 % Auftreten) Haplotypen der Population und den analysierten Phänotypen Asthma bronchiale, Heuschnupfen, positiver SPT oder erhöhtes Gesamt-IgE festgestellt werden. Die in der folgenden Tabelle ersichtlichen Assoziationen zwischen erhöhten respektive erniedrigten Odds Ratios für ein IgE über der 50. Perzentile und den Haplotypen AAT bzw. GAT waren jeweils nicht signifikant in der Berechnung nach Cookson [Tabelle 4.14 und Abbildung 4.1, siehe folgende Seite].

Haplo- typ	Frequenz	50. Perzentile (60.4 IU/ml)	66. Perzentile (115 IU/ml)	90. Perzentile (457 IU/ml)
		OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
A148G + A1652G + T1432C (n = 1043)		n = 459	n = 288	n = 76
AAT	0.47	0.68 (0.48-0.97) 0.03	0.92 (0.62-1.36) 0.69	0.89 (0.45-1.75) 0.74
GAT	0.31	1.60 (1.08-2.37) 0.02	1.34 (0.87-2.06) 0.18	1.44 (0.70-2.97) 0.32
GGC	0.07	0.97 (0.46-2.03) 0.93	0.71 (0.30-1.67) 0.43	0.99 (0.24-4.07) 0.99

[Tabelle 4.14] Zuordnung der IgE-Schwellen zu den Haplotypen der drei untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$  mit der jeweiligen Odds Ratio (OR) und den zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (CI) sowie den p-Werten. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002).



[Abbildung 4.1] Graphische Darstellung des OR und der 95 %-Konfidenzintervalle der gebildeten Haplotypen der untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$  mit ihrer Assoziation zu den stratifizierten IgE-Spiegeln. Die dargestellten Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell.

#### 4.4. Genüberschreitende Haplotypanalyse

##### 4.4.1. Paarweise Analyse der SNPs im IL-4R $\alpha$ und von IL-4\_C-589T im IL-4-Promotor

Bei der paarweisen SNP-Analyse zwischen den drei untersuchten Polymorphismen im IL-4R $\alpha$  und dem IL-4-Promotor-SNP C-589T konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden, welche die vorbeschriebenen Ergebnisse der einzelnen SNP-Analysen überstieg [Tabelle 4.15]. Die Ergebnisse blieben hinter den Einzelbeobachtungen zurück und erreichten in keinem Fall die erwarteten kombinierten Effekte.

Haplotyp aus IL-4R $\alpha$ + IL-4	Asthma OR (95 % CI)	Heuschnupfen OR (95 % CI)	Atopisch OR (95 % CI)	IgE > 100 IU/ml OR (95 % CI)
<b>Haplotyp IL-4R<math>\alpha</math>_A148G + IL-4_C-589T</b>				
AA + CC vs. AG_GG + CC	0.87 (0.38-1.97)	2.44 (1.12-5.32)*	1.06 (0.63-1.80)	0.96 (0.59-1.57)
AA + CC vs. AA + TC_TT	2.01 (0.98-4.12)	1.97 (0.83-4.68)	1.46 (0.85-2.52)	1.63 (0.99-2.70)
AA + CC vs. AG_GG + TC_TT	2.21 (0.94-5.18)	1.75 (0.59-5.16)	1.27 (0.64-2.52)	1.06 (0.55-2.05)
<b>Haplotyp IL-4R<math>\alpha</math>_A1652G + IL-4_C-589T</b>				
AA + CC vs. AG_GG + CC	0.94 (0.43-2.06)	1.19 (0.52-2.74)	0.92 (0.54-1.56)	1.20 (0.73-1.97)
AA + CC vs. AA + TC_TT	1.72 (0.65-4.54)	1.00 (0.29-3.40)	1.20 (0.58-2.48)	1.42 (0.72-2.82)
AA + CC vs. AG_GG + TC_TT	2.37 (1.04-5.42)*	1.67 (0.65-4.32)	1.60 (0.87-2.97)	1.93 (1.07-3.47)*
<b>Haplotyp IL-4R<math>\alpha</math>_T1432C + IL-4_C-589T</b>				
TT + CC vs. TC_CC + CC	0.82 (0.34-2.01)	1.28 (0.47-3.51)	0.84 (0.46-1.54)	0.95 (0.54-1.69)
TT + CC vs. TT + TC_TT	1.47 (0.43-5.02)	0.79 (0.14-4.28)	0.98 (0.39-2.47)	1.35 (0.57-3.15)
TT + CC vs. TC_CC + TC_TT	1.95 (0.77-4.92)	1.66 (0.56-4.94)	1.24 (0.63-2.44)	1.46 (0.77-2.77)

[Tabelle 4.15] Odds Ratios der Haplotypen aus SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen und dem SNP IL-4\_C-589T im Promotor des Interleukin-4-Gens mit Angabe der zugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle. (\*  $p \leq 0.05$ ).

Wie von Kabesch et al. 2000 berichtet, hatten Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko, die ärztlichen Kriterien für Asthma zu erfüllen, wenn sie den SNP im IL-4-Promotor -589T trugen (Kabesch, Baldini et al. 2000). Dieses Einzelergebnis blieb auch in jenen, zahlenmäßig veränderten Stichproben signifikant, welche für die gleichzeitige Berechnung des IL-4-Promotor-SNPs und die Polymorphismen im IL-4R $\alpha$  zur Verfügung standen. Bei der paarweisen Berechnung mit den drei SNPs im IL-4R $\alpha$  wurde diese Beobachtung jeweils abgeschwächt [Tabelle 4.16].

Asthma			
Einzelassoziation mit IL-4_C-589T <sub>n</sub> OR (95 % CI) (n)	Kombinationsergebnis mit SNP aus IL-4R $\alpha$ :	IL-R $\alpha$ _(WT/WT) OR (95 % CI)	IL-4R $\alpha$ _(WT/Pol.) OR (95 % CI)
2.18 (1.22-3.89) (342)	+ IL-R $\alpha$ _A148G	2.01 (0.98-4.12)	2.21 (0.94-5.18)
2.19 (1.23-3.93) (333)	+ IL-R $\alpha$ _A1652G	1.72 (0.65-4.54)	2.37 (1.04-5.42)
2.12 (1.19-3.80) (337)	+ IL-R $\alpha$ _T1432C	1.47 (0.43-5.02)	1.95 (0.77-4.92)

[Tabelle 4.16] Angabe des Odds Ratio für die ärztliche Diagnose „Asthma“, in Abhängigkeit von der Zahl der Proben (n) und den zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (CI) in Klammern, sowie die Kombinationsergebnisse mit den jeweiligen SNPs des IL-4R $\alpha$ .

#### 4.4.2. Kombinationsanalyse von SNPs im IL-4R $\alpha$ und im Gen von IL-4

Um Interaktionen zwischen mehreren SNPs in den Genen von IL-4R $\alpha$  und IL-4 zu detektieren, wurden die SNPs IL-R $\alpha$ \_A148G und IL-R $\alpha$ \_A1652G mit den SNPs

- a) IL-4\_C-589T (IL-4 Promotor-SNP, vorbeschrieben mit Asthma assoziiert)
- b) IL-4\_C-33T (IL-4-Promotor-SNP, hohes LD für 7 weitere SNPs im IL-4 Gen)
- c) IL-4\_VE6523 (Variables Element im IL-4-Gen, vorbeschrieben mit Serum-IgE-Spiegeln assoziiert – in der tabellarischen Darstellung bedeutet 1 = VE nicht vorhanden, 2 = VE vorhanden)

in einer Kombinationsanalyse untersucht. Wiederum wurden SNP-Kombinationen unter 5 %igem Auftreten von der Studie ausgeschlossen. Ein Haplotyp, AA1CC, war nach allen drei verwendeten Haplotyp-Berechnungsmodi grenzwertig signifikant mit dem Phänotyp Serum-IgE-Wert über der 50. Perzentile assoziiert, blieb jedoch hinter den erwarteten

Ergebnissen aus den Einzelberechnungen zurück [Tabellen 4.17a und b]. Eine Assoziation mit den Phänotypen Asthma, Heuschnupfen oder positivem Haut-Prick-Test wurde nicht beobachtet.

Haplotyp	Frequenz	50. Perzentile (60.4 IU/ml)	66. Perzentile (115 IU/ml)	90. Perzentile (457 IU/ml)
		OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
A148G + A1652G + VE6523 + C589T + C33T		n = 447	n = 282	n = 73
AA1CC	0.39	0.63 (0.43-0.92) 0.02	0.84 (0.55-1.29) 0.44	1.09 (0.53-2.26) 0.82
AA2TT	0.07	1.22 (0.55-2.67) 0.62	1.56 (0.67-3.62) 0.30	1.09 (0.25-4.83) 0.91
AG1CC	0.08	0.90 (0.42-1.91) 0.78	0.74 (0.32-1.75) 0.50	0.82 (0.18-3.64) 0.80
GA1CC	0.27	1.45 (0.95-2.24) 0.09	1.23 (0.76-1.97) 0.40	0.87 (0.38-2.03) 0.76
GG1CC	0.09	0.85 (0.40-1.78) 0.66	0.43 (0.18-1.04) 0.06	0.37 (0.07-1.90) 0.23

[Tabelle 4.17a] Zuordnung der IgE-Schwellen zu den Haplotypen der untersuchten SNPs im *IL-4R $\alpha$* - und *IL-4*-Gen mit dem jeweiligen Odds Ratio (OR) und den zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen (CI) sowie den p-Werten. 1 = VE nicht vorhanden, 2 = VE vorhanden. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002).

Haplotyp A148G + A1652G + VE6523 + C589T + C33T		Haplotype-Trend- Regression-Modell	”Cookson“-Methode ( $< 0.8$ )	“Ober“-Methode ( $< 0.0$ )
		OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
AA1CC	0.39	0.63 (0.43-0.92) 0.02	0.74 (0.57-0.94) 0.01	0.75 (0.56-1.00) 0.05
AA	0.48	0.67 (0.47-0.96) 0.03	0.82 (0.64-1.06) 0.13	0.71 (0.53-0.95) 0.02
1CC	0.83	0.74 (0.47-1.17) 0.20	0.96 (0.47-1.97) 0.90	0.96 (0.47-1.97) 0.90
Erwartet multiplikativ		0.50	0.79	0.68
Erwartet additiv		0.41	0.78	0.67

[Tabelle 4.17b] Haplotyp AA1CC mit den Ergebnissen zur Assoziation mit einem IgE über der 50. Perzentile, abhängig von der Wahl der inkulidierten Referenzhaplotypen (s.a. „Methoden“) sowie Darstellung der OR-Werte der ursprünglich gebildeten Haplotypen mit den hieraus erwarteten Odds Ratios. Die Frequenzen sind in den entsprechenden Zeilen hinter den Haplotypen angegeben.

#### 4.4.3. Paarweise Analyse der SNPs im IL-4R $\alpha$ und von IL-13\_G2044A

Haplotyp aus IL-4R $\alpha$ + IL-13	Asthma OR (95 % CI)	Heuschnupfen OR (95 % CI)	Atopisch OR (95 % CI)	IgE > 100 IU/ml OR (95 % CI)
Haplotyp IL-4R $\alpha$ _A148G + IL-13_G2044A				
AA + GG vs. AG_GG + GG	1.19 (0.59-2.40)	1.78 (0.81-3.90)	0.92 (0.53-1.60)	1.02 (0.61-1.70)
AA + GG vs. AA + GA_AA	0.84 (0.40-1.75)	1.23 (0.56-2.90)	1.10 (0.66-1.84)	1.68 (1.06-2.69)*
AA + GG vs. AG_GG + GA_AA	0.63 (0.23-1.72)	1.57 (0.61-4.10)	1.24 (0.67-2.30)	1.05 (0.57-1.91)
Haplotyp IL-4R $\alpha$ _A1652G + IL-13_G2044A				
AA + GG vs. AG_GG + GG	0.96 (0.48-1.92)	1.26 (0.55-2.91)	1.21 (0.70-2.10)	1.07 (0.64-1.78)
AA + GG vs. AA + GA_AA	0.58 (0.20-1.67)	1.00 (0.32-3.12)	1.67 (0.84-3.32)	1.24 (0.64-2.40)
AA + GG vs. AG_GG + GA_AA	0.77 (0.34-1.72)	1.39 (0.56-3.43)	1.37 (0.75-2.49)	1.74 (1.01-2.99)*
Haplotyp IL-4R $\alpha$ _T1432C + IL-13_G2044A				
TT + GG vs. TC_CC + GG	0.80 (0.37-1.73)	1.34 (0.49-3.67)	1.01 (0.54-1.90)	0.82 (0.46-1.46)
TT + GG vs. TT + GA_AA	0.48 (0.12-1.86)	1.05 (0.24-4.66)	1.42 (0.59-3.41)	1.03 (0.45-2.37)
TT + GG vs. TC_CC + GA_AA	0.64 (0.27-1.51)	1.53 (0.53-4.41)	1.23 (0.63-2.39)	1.36 (0.74-2.48)

[Tabelle 4.18] Odds Ratios der Kombinationen aus SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen und dem SNP IL-13\_G2044A. (\*  $p \leq 0.05$ ).

Eine Assoziation zwischen den dargestellten Haplotypen und den Erkrankungen Asthma, Heuschnupfen oder Atopie wurde nicht beobachtet. Bei der paarweisen Analyse der beschriebenen SNPs aus IL-4R $\alpha$  und IL-13 wurde zunächst eine Einzelanalyse für die einbezogenen SNPs hinsichtlich der Assoziationsergebnisse für IgE > 100 IU/ml durchgeführt. Hier konnte die von Graves et al. im Jahr 2000 publizierte Assoziation zwischen

IL-13\_G2044A und erhöhtem Gesamt-IgE im Serum der Probanden unabhängig von der Gesamtzahl n der Studienpopulation bestätigt werden. In der Kombination mit dem SNP IL-4R $\alpha$ \_A1652G ließ sich eine Assoziation mit erhöhtem Gesamt-IgE der Probanden nachweisen, welche jedoch im Rahmen der erwarteten additiven bzw. multiplikativen zuschreibbaren Risiken (OR) der Einzelassoziationen blieb. Für die Kombination mit dem SNP wurde dann ein signifikant hohes OR für ein erhöhtes Serum-IgE beobachtet, wenn dieser in der homozygoten Wildtypform vorlag (AA). Daher musste zur Berechnung des erwarteten OR der Kehrwert für IL-4R $\alpha$ \_A148G bei Vorkommen von mindestens einem Polymorphismus (1/AG oder GG) eingesetzt werden.

Auch in diesem Fall blieb der beobachtete Effekt der Haplotypanalyse im Rahmen der erwarteten zuschreibbaren Risiken (OR) [Tabelle 4.19].

Gebildete Haplotypen aus IL-4R $\alpha$ + IL-13 vs. IgE > 100 IU/ml	Beobachtetes OR (95 % CI)	erwartet multiplikativ	erwartet additiv
IL-4R $\alpha$ _A148G + IL-13_G2044A AA + GG vs. AA + GA_AA	1.68 (1.06-2.69)	1.72	1.63
IL-4R $\alpha$ _A1652G + IL-13_G2044A AA + GG vs. AG_GG + GA_AA	1.74 (1.01-2.99)	1.76	1.67

[Tabelle 4.19] Beobachtete Odds Ratios für die Assoziationen zwischen den SNP-Kombinationen aus IL-4R $\alpha$  und IL-13 für IgE >100 IU/ml mit den erwarteten multiplikativen und additiven Ergebnissen.

4.4.4. Kombinationsanalyse aus SNPs im IL-4R $\alpha$  (A148G und A1652G) und von IL-13\_G2044A

Um Effekte aller drei mit IgE-Spiegeln assoziierten SNPs im IL-4R $\alpha$  und dem IL-13\_G2044A zu studieren (Tabelle 4.12, siehe Seite 47 und Graves et al. 2000), wurde nach der paarweisen Berechnung die Kombinationsanalyse der SNPs durchgeführt [Tabelle 4.20]. Wieder wurden zunächst die Haplotypfrequenzen bestimmt und alle Kombinationen unter 5 %-Repräsentation ausgeschlossen.

Haplotyp	Frequenz	50. Perzentile (60.4 IU/ml)	66. Perzentile (115 IU/ml)	90. Perzentile (457 IU/ml)
		OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
A148G + A1652G + G2044A		n = 473	n = 296	n = 78
AAG	0.37	0.51 (0.35-0.75) 0.001	0.70 (0.46-1.08) 0.11	0.72 (0.34-1.52) 0.39
AAG n. Cookson		0.70 (0.55-0.90) 0.005	n.s.	n.s.
AAG n. Ober		0.65 (0.49-0.86) 0.002	n.s.	n.s.
AAA	0.10	1.81 (0.94-3.46) 0.07	1.88 (0.94-3.76) 0.07	1.40 (0.43-4.55) 0.56
AGG	0.08	0.74 (0.35-1.57) 0.43	0.54 (0.22-1.31) 0.17	0.57 (0.12-2.74) 0.48
GAG	0.24	1.28 (0.82-1.98) 0.28	1.06 (0.65-1.72) 0.82	1.29 (0.57-2.91) 0.55
GAA	0.08	3.89 (1.78-8.49) 0.001	3.34 (1.51-7.38) 0.003	1.92 (0.52-7.09) 0.32
GAA n. Cookson		2.21 (1.36-3.59) 0.001	1.92 (1.19-3.11) 0.007	n.s.
GAA n. Ober		1.52 (1.15-2.00) 0.003	1.53 (1.13-2.06) 0.005	n.s.
GGG	0.08	0.86 (0.40-1.82) 0.69	0.46 (0.19-1.12) 0.09	0.92 (0.22-3.91) 0.91

[Tabelle 4.20] Zuordnung der IgE-Schwellen zu den Haplotypen der untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$ - und im IL-13-Gen mit dem jeweiligen Odds Ratio (OR) und den zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen sowie den p-Werten. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002), die hier signifikanten Ergebnisse wurden mittels der Methode nach W. Cookson bzw. C. Ober verifiziert (s. a. Methoden).

Der Haplotyp AAG war in dieser Untersuchung signifikant mit einem erniedrigten zuschreibbaren Risiko für ein Serum-IgE über der 50. Perzentile vergesellschaftet. Ebenso war der Haplotyp GAA in allen Methoden stabil mit einem erhöhten Odds Ratio für ein IgE über der 50. und 66. Perzentile assoziiert.

Ausprägung SNPs/Haplotypen	50. Perzentile (60.4 IU/ml)	66. Perzentile (115 IU/ml)	90. Perzentile (457 IU/ml)
IL-4R $\alpha$ + IL-13	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
IL-4R $\alpha$ _AA-Haplotyp	0.67 (0.47-0.96) 0.03	0.90 (0.61-1.32) 0.58	0.84 (0.43-1.64) 0.61
IL-13_G2044-SNP	0.69	0.71	0.75
Beobachtet: IL-4R $\alpha$ + IL-13_AAG	0.51 (0.35-0.75) 0.001	0.70 (0.46-1.08) 0.11	0.72 (0.34-1.52) 0.39
Erwartet multiplikativ	0.46	0.64	0.63
Erwartet additiv	0.36	0.61	0.59
IL-4R $\alpha$ _GA-Haplotyp	1.73 (1.17-2.54) 0.005	1.47 (0.97-2.24) 0.07	1.46 (0.72-2.96) 0.30
IL-13_2044A-SNP	1.44 (1.13-1.83) 0.003	1.40 (1.08-1.83) 0.01	1.33 (0.85-2.09) 0.21
Beobachtet: IL-4R $\alpha$ + IL-13_GAA	3.89 (1.78-8.49) 0.001	3.34 (1.51-7.38) 0.003	1.92 (0.52-7.09) 0.32
Erwartet multiplikativ	2.49	2.06	1.94
Erwartet additiv	2.17	1.87	1.79

[Tabelle 4.21] Darstellung der signifikant mit IgE-Spiegeln assoziierten Haplotypen aus Tabelle 4.20 mit den OR- und CI-Werten aus den Einzelassoziationen, aus denen der Haplotyp besteht, abhängig von den zugeordneten IgE-Schwellen. Jeweils darunter die erwarteten OR-Werte zum Vergleich. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002).

Die beobachtete Assoziation mit einem erhöhten zuschreibbaren Risiko für einen IgE-Wert über der 50. respektive 66. Perzentile konnte im Falle des Haplotypen GAA nicht mit den additiven oder multiplikativen Erwartungen aus den Einzelassoziationen erklärt werden [Tabelle 4.21].

4.4.5. Kombinationsanalyse aus SNPs im IL-4R $\alpha$  (A148G und A1652G) und dem STAT6-Gen (C2892T und T12888C)

Aufgrund der Ergebnisse für den Haplotypen IL-4R $\alpha$ \_A148G + A1652G aus dieser Arbeit sowie der berichteten Ergebnisse von Schedel et al. zur Assoziation der SNPs C2892T und T12888C im STAT6-Gen mit Gesamt-IgE-Spiegeln wurde eine Kombinationsanalyse mit diesen SNPs durchgeführt (Schedel, Carr et al. 2004). Hierfür wurden zunächst die Haplotypfrequenzen bestimmt und anschließend die Assoziationen der Haplotypen mit über 5 %igem Auftreten mit dem Phänotypen Gesamt-IgE über 50., 66. und 90. Perzentile bestimmt [Tabelle 4.22].

Haplotyp	Frequenz	50. Perzentile (60.4 IU/ml)	66. Perzentile (115 IU/ml)	90. Perzentile (457 IU/ml)
		OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
C2892T + T12888C + A148G + A1652G		n = 406	n = 256	n = 70
CTAA	0.18	1.12 (0.64-1.96) 0.67	1.72 (0.94-3.13) 0.08	4.62 (1.93-11.11) 0.001
CTGA	0.13	2.92 (1.49-5.71) 0.002	3.06 (1.52-6.14) 0.002	2.91 (1.0-8.47) 0.05
TTAA	0.25	0.58 (0.36-0.94) 0.03	0.69 (0.40-1.18) 0.17	0.23 (0.08-0.69) 0.01
TTGA	0.16	1.28 (0.72-2.28) 0.39	0.89 (0.46-1.69) 0.72	0.91 (0.30-2.73) 0.86
TTGG	0.07	1.28 (0.48-3.41) 0.62	0.78 (0.26-2.40) 0.67	0.52 (0.07-4.04) 0.53
TCAA	0.05	0.23 (0.12-0.88) 0.03	0.32 (0.10-1.03) 0.06	0.30 (0.03-2.60) 0.27

[Tabelle 4.22] Zuordnung der IgE-Schwellen zu den Haplotypen der untersuchten SNPs im STAT6- und IL-4R $\alpha$ -Gen mit dem jeweiligen Odds Ratio (OR) und den 95 %-Konfidenzintervallen (CI) sowie den p-Werten. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotyp-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002).

Der Haplotyp CTGA in dieser Untersuchung war signifikant mit Serum-IgE-Spiegeln über der 50. Perzentile assoziiert. Die Assoziation mit IgE-Werten über der 66., beziehungsweise der 90. Perzentile war in den Berechnungen nach Cookson und Zaykin deutlich, in der Methode nach Ober jedoch mit  $p = 0.065$  für Serum-IgE > 115 IU/ml respektive  $p = 0.09$  für Serum-IgE > 457 IU/ml nicht signifikant und wurde daher nicht gewertet.

Haplotyp	Frequenz	50. Perzentile (60.4 IU/ml)	66. Perzentile (115 IU/ml)	90. Perzentile (457 IU/ml)
		OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert	OR (95 % CI) p-Wert
C2892T + T12888C + A148G + A1652G		n = 406	n = 256	n = 70
CTGA	0.13	2.92 (1.49-5.71) 0.002	3.06 (1.52-6.14) 0.002	2.91 (1.0-8.47) 0.05
C2892T + T12888C				
CT	0.37	1.51 (1.04-2.20) 0.03	1.77 (1.17-2.67) 0.007	3.56 (1.80-7.09) 0.003
A148G + A1652G				
GA	0.32	1.73 (1.17-2.54) 0.005	1.47 (0.97-2.24) 0.07	1.46 (0.72-2.96) 0.30
Erwartet additiv		2.24	2.24	4.02
Erwartet multiplikativ		2.61	2.60	5.20

[Tabelle 4.23] Zuordnung der IgE-Schwellen zu den Haplotypen der untersuchten SNPs im STAT6- und im IL-4R $\alpha$ -Gen mit dem jeweiligen Odds Ratio (OR) und den 95 %-Konfidenzintervallen sowie den p-Werten. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002). Berechnung der additiven und multiplikativen erwarteten OR-Werte.

Wie aus Tabelle 4.23 zu ersehen ist, übersteigt der Haplotyp CTGA deutlich die erwarteten zuschreibbaren Risiken seiner ihn begründenden Haplotypen für die 50. und 66. Perzentile des Serum-IgE-Wertes. Allerdings sind sowohl der STAT6-Haplotyp CT wie auch der IL-4-Rezeptor-Haplotyp GA nur in der Methode nach Zaykin et al. signifikant mit IgE-Spiegeln über dem Median (60.4 IU/ml) vergesellschaftet.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Einleitung und Limitationen

Die IgE-vermittelte Immunreaktion spielt eine wesentliche Rolle in der Entstehung der atopischen Erkrankungen Asthma bronchiale, Heuschnupfen und atopischer Dermatitis. Nach dem heutigen Verständnis haben bei der Krankheitsentstehung sowohl genetische wie auch umweltbedingte Faktoren Einfluss auf die beteiligten immunologischen Signalprozesse.

Der IL-4-Rezeptorkomplex spielt durch die Justierung der zellvermittelten Immunität sowie durch seinen Einfluss auf die humorale Immunität eine wesentliche Rolle bei der IgE-gewichteten Immunantwort. Er bot daher, im Kontext der Umweltbedingungen der Probanden, eine vielversprechende Studienmöglichkeit von Kandidatengenomen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Ausprägung eines IgE-vermittelten Phänotyps.

Die vorliegende Arbeit konnte DNS von 1120 Kindern untersuchen und ist damit eine der bisher größten Assoziationsstudien zu genetischen Veränderungen im Interleukin-4-Rezeptor bezüglich atopischer Erkrankungen im Kindesalter.

Basierend auf einer Arbeit von C. Ober et al. konnten fünf kodierende SNPs mittels einer Genotypisierung von drei SNPs unter Nutzung einer hohen Kopplung (eines hohen LD) von IL-4R $\alpha$ \_T1432C mit IL-4R $\alpha$ \_A1124G und IL-4R $\alpha$ \_T1216C in der Studienpopulation erfasst werden (Ober, Leavitt et al. 2000). Es kann hierbei nicht zweifelsfrei unterschieden werden, ob die beobachteten Effekte in den SNP- und Haplotypanalysen dem stellvertretenden SNP IL-4R $\alpha$ \_T1432C (dem „tagging“-SNP) oder den repräsentierten Variationen im Gen zuzuordnen sind. Neben einer SNP-spezifischen Assoziationsstudie wie dieser können funktionelle Studien eine definitive Aussage über einen regulatorischen Einfluss des jeweiligen SNPs liefern und der tatsächliche Zusammenhang zwischen beobachtetem Effekt und genetischer Veränderung validiert werden. Die extrazelluläre Lage der veränderlichen Aminosäure im Protein sowie die vorliegenden funktionellen Studien sprechen jedoch dafür, dass die bisher gefundenen Assoziationen mit allergischen Phänotypen dem SNP IL-4R $\alpha$ \_A148G, und nicht den durch ihn repräsentierten Polymorphismen zuzuschreiben sind (Mitsuyasu, Izuhara et al. 1998; Howard, Koppelman et al. 2002).

Die Überlegungen bezüglich der beobachteten Effekte von IL-4R $\alpha$ \_T1432C können auch für die übrigen Polymorphismen dieser Arbeit angestellt werden, da ein hohes Kopplungsungleichgewicht (LD) eines untersuchten SNPs mit weiteren genetischen Veränderungen innerhalb oder außerhalb des IL-4-Rezeptor-Gens denkbar ist. Damit ist es möglich, dass die beobachteten Effekte genetischen Veränderungen zuzuschreiben sind, welche durch die hier studierten SNPs lediglich repräsentiert werden. In dieser Arbeit wurden drei in der internationalen Literatur vorbeschrieben mit atopischen Krankheiten assoziierte SNPs im Gen der IL-4-Rezeptor-alpha-Kette untersucht. Wu et al. konnte anhand eines vollständigen Screenings des Exons 12 und der angrenzenden Regionen (Intron 11 und 3'-UTR) des IL-4-Rezeptor- $\alpha$ -Gens 24 SNPs detektieren, von welchen 9 kodierend waren. Er stellte eine hohe interethnische und -individuelle Variabilität der SNPs in diesem Exons fest und interpretierte seine Ergebnisse hinsichtlich der evolutionären Bedeutung dieser Region in der Immunmodulation in unterschiedlichen Umweltbedingungen (Wu, Di Rienzo et al. 2001). Bezogen auf die vorliegende Arbeit könnte dies bedeuten, dass wesentliche Veränderungen im IL-4-Rezeptor- $\alpha$ -Gen unentdeckt sind, zumal die steuernde Rolle der nicht-kodierenden Abschnitte des Gens letztlich ungeklärt sind (Mattick 1994; Fedorova and Fedorov 2003).

Allerdings sind bisher nur wenige Beispiele einer signifikanten Beeinflussung von nicht-kodierenden SNPs auf Phänotypen bekannt, obwohl Assoziationsstudien mit allergischen Phänotypen auch hierzu durchgeführt wurden (Donfack, Schneider et al. 2005). Gegen die Möglichkeit einer Fehlidentifikation der entscheidenden Polymorphismen spricht auch, dass trotz der von Wu et al. beschriebenen Variabilität im Gen des IL-4R $\alpha$  die in den untersuchten Ethnien vorherrschenden SNPs mit den aus ihnen gebildeten Haplotypen bekannt sind. Damit ist es unwahrscheinlich, dass entscheidende wechselseitige Einflussnahmen zwischen den SNPs unbeobachtet geblieben sind.

Das Ziel dieser Arbeit war es, bei widersprüchlichen Aussagen in der Literatur, eine aussagekräftige Studie zur Assoziation der bekannten SNPs im IL-4-Rezeptor mit den Phänotypen Asthma bronchiale, atopische Dermatitis und Heuschnupfen in einer westeuropäischen Population zu erstellen. Nachdem die Studienpopulation weitgehend jener von Kabesch, Schedel und Graves entsprach, konnte erstmalig auch eine genübergreifende Interaktionsstudie zwischen genetischen Variationen der zwei Liganden des IL-4-Rezeptorkomplexes sowie dem intrazellulären Bindeglied STAT6 durchgeführt werden.

Trotz der großen Probandenzahl sind die Fallzahlen, gerade in den Haplotypanalysen, teils nicht ausreichend für eine endgültige Aussage. Es wurden daher nur Haplotypen in die Analysen aufgenommen, welche in der Population mit über 5 % vertreten waren.

Eine typische Schwachstelle einer Assoziationsstudie ist die Zuordnung der Probanden zu den Phänotypgruppen mittels Fragebogen, da diese zwar standardisiert erstellt und ausgewertet werden, jedoch die Subjektivität der ausfüllenden Eltern oder sonstigen Mitarbeiter oft nur unzureichend eliminiert werden kann. Um derartige Ungenauigkeiten auszuschließen, wurde in den ISAAC-Fragebogen bei den Probanden beispielsweise die Diagnose Asthma bronchiale dann gewertet, wenn Sie von einem Arzt eindeutig gestellt bzw. die Diagnose „asthmatische, spastische oder obstruktive Bronchitis“ mehr als einmal ärztlich dokumentiert wurde. Abgefragte Beobachtungen betroffener Eltern konnten zum Beispiel standardisiert werden, indem zur Verdeutlichung ein Asthmaanfall per Video demonstriert wurde. Die Angaben in den Fragebogen wurden mit den klinischen Untersuchungsdaten abgeglichen. Es konnte gezeigt werden, dass in der Lungenfunktion dokumentierte bronchiale Hyperreaktivität als verlässlicher Parameter für eine Asthma-Erkrankung angesehen werden kann (Nicolai, Mutius et al. 1993). Bei Phänotyp-Zuordnung zeigte sich in der Zusammenfassung aus elterlichen Angaben, ärztlichen Diagnosen und den klinischen Untersuchungsdaten eine hohe Zuverlässigkeit. Daher dürfen die in dieser Arbeit für die Assoziation verwendeten Phänotypen als valide angesehen werden.

Die Gesamt-Serum-IgE-Spiegel unterliegen einer ausgeprägten Variabilität, welche unter anderem vom Lebensalter, sowie von Umweltbedingungen wie Parasiten- und Tabakrauchexposition abhängig ist, wohingegen geschlechtlichen Unterschieden eher untergeordnete Bedeutung zukommt. IgE ist auch in gesunden Kindern der Antikörper mit der höchsten interindividuellen Schwankungsbreite (Berciano, Crespo et al. 1987). Die Referenzwerte der pädiatrischen Standardliteratur sind dementsprechend, mit einem Normbereich von 0-230 IU/ml, weit gefasst (Behrman, Kliegman et al. 2004). Der übliche Verlauf der mittleren Gesamt-IgE-Serumwerte wird mit 0-10 IU/ml beim Neugeborenen und Säugling in den ersten Lebensmonaten beschrieben, die meisten Autoren gehen davon aus, dass im Alter von 6-7 Jahren die mittleren Erwachsenen-Referenzwerte erreicht werden, welche im Bereich von 60-200 IU/ml liegen können (Klennert, Nelson et al. 2001; Hamburger 2005). Um eine detailliertere Aussage zu ermöglichen, wurden für die vorliegende Studie der Median sowie die Perzentilen für die Gesamtpopulation bestimmt und die Unterteilung dem-

entsprechend stratifiziert vorgenommen. Bei der Haplotypisierung bzw. zur Vereinfachung der Darstellung wurde teilweise eine Grenze von 100 IU/ml als „erhöhtes IgE“ angenommen, was einer konservativen Einordnung entspricht und in vielen internationalen Studien als Schwellenwert angesetzt wurde. Wie die Normalverteilung im Bereich über der 66. Perzentile jedoch zeigt, kann im Alter der Studienkinder ein hohes IgE im Bereich von 100-200 IU/ml ohne erkennbares klinisches Korrelat sein. Nachdem die Daten für diese Arbeit alle bei 9 bis 11-jährigen Kindern erfasst wurden, ist ein systematischer Fehler aufgrund der Altersverteilung unwahrscheinlich.

## 5.2. Einflüsse der Studienpopulation aus Ost- und Westdeutschland

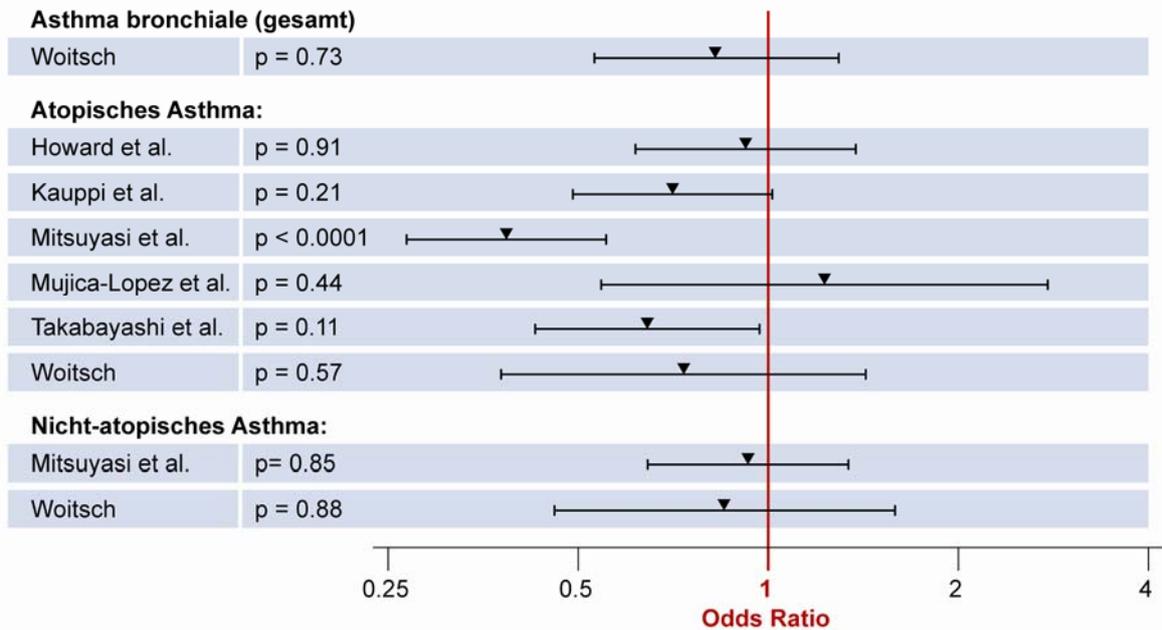
In vorliegenden Arbeiten zu IL-4 und IL-13 konnten in der gleichen Studienpopulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen der ost- und westdeutschen Kinder festgestellt werden. Daher können die in dieser Arbeit beobachteten Differenzen zwischen den Kindern aus den ehemals getrennten Teilen Deutschlands eher nicht durch einen grundlegenden genetischen Unterschied der Probanden erklärt werden (Graves, Kabesch et al. 2000; Kabesch, Peters et al. 2003). Nachdem die Probengewinnung und alle Daten im betreffenden Studienabschnitt aus den Jahren 1995 und 1996 stammen, waren die hier 9 bis 11-jährigen Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Wiedervereinigung Deutschlands mindestens 3 Jahre alt. Es müssen daher die Einflüsse von unterschiedlichen Umweltbedingungen in der frühen Kindheit der Probanden bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, da es deutliche Hinweise darauf gibt, dass diesen in den ersten Lebensjahren in der Interaktion mit der genetischen Prädisposition eine wichtige Funktion in der Immunmodulation der Kinder zukommt (Kabesch 2001; Hoffjan, Nicolae et al. 2005). Mutius et al. konnte bei der in dieser Arbeit studierten Leipziger Population 5 Jahre nach der Wiedervereinigung Deutschlands einen Anstieg der Prävalenz der Erkrankungen Heuschnupfen und positiver SPT auf die hier beschriebenen Allergene, nicht jedoch eine Zunahme der Asthma-Erkrankungsrate feststellen (von Mutius, Weiland et al. 1998; Weiland and von Mutius 1999).

In der vorliegenden Arbeit können solch zeitlich veränderliche Umwelteinflüsse nicht ausreichend ausgeschlossen werden. Nur wenn die Gen-Umwelt-Interaktion in den ersten Lebensjahren eine Festlegung des weiteren Phänotyps bedingt, sind durch Unterscheidung der Assoziationsergebnisse nach Herkunft der Kinder signifikante Beobachtungen zu erwarten.

Hiervon unabhängig spielt der individuelle Verlauf eine Rolle beim Erwerb (z. B. wie intensiv und fortgesetzt ist die Staub- oder Allergenbelastung des Individuums) und beim Zeitpunkt der zutreffenden Diagnosestellung. Die sichere Diagnose des Asthma bronchiale ist im Kleinkindalter noch schwierig – beispielsweise, da objektivierbare Messmethoden wie die Lungenfunktion in diesem Alter mitarbeitsbedingt keine sicheren Diagnosehilfen darstellen. Auch der klinische Verlauf der Erkrankung vom Kleinkind zum Schulkindalter ist unterschiedlich, und die Prädiktion des weiteren Verlaufs im Vorschulalter derzeit nicht sicher möglich (Lowe, Simpson et al. 2005; Morgan, Stern et al. 2005). Nachdem die untersuchten Kinder dieser Studie ca. 10 Jahre alt waren, dürfen die klinischen Testverfahren zur Erfassung von Asthma und Atopie jedoch als zuverlässig eingestuft werden (Nicolai, Mutius et al. 1993).

### 5.3. IL-4R $\alpha$ \_A148G

Als einziger bisher bekannter extrazellulär gelegener und kodierender SNP könnte der IL-4R $\alpha$ \_A148G durch Einflussnahme auf das Bindungsverhalten der Liganden eine bedeutsame Rolle bei der IgE-vermittelten Immunreaktion spielen. Trotz der großen Population lässt sich keine signifikante Assoziation des SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G mit den getesteten Phänotypen Asthma, Heuschnupfen oder Atopie feststellen. Der polymorphe SNP zeigt sowohl in der Gesamtpopulation wie auch in der Münchener und Leipziger Population einen protektiven Trend bezüglich der Entwicklung von Asthma bronchiale und Heuschnupfen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Berichten von Mitsuyasu, welcher in einer japanischen Population bei Kindern eine Assoziation zwischen dem polymorphen SNP und erhöhtem Gesamt-IgE sowie atopischem Asthma fand. In einer weiteren Studie konnte er eine gesteigerte Signalaktivität im STAT6-Signalweg bei Vorliegen des polymorphen Allels zeigen (Mitsuyasu, Izuhara et al. 1998; Mitsuyasu, Yanagihara et al. 1999). Takabayashi konnte in einer ebenfalls japanischen Population zeigen, dass der SNP mit atopischem Asthma assoziiert ist, insbesondere bei Patienten mit Beginn der Asthmasymptome im Kleinkindalter (Takabayashi, Ihara et al. 2000). Im Gegensatz zu diesen Studien konnten Gao, Mujica-Lopez und Howard et al. keine Assoziation zwischen diesem SNP und atopischem Asthma oder erhöhtem Gesamt-IgE in ihren Populationen nachweisen. (Gao 2000; Howard, Koppelman et al. 2002; Mujica-Lopez and Flores-Martinez 2002) [*Abbildung 5.1, siehe folgende Seite*].

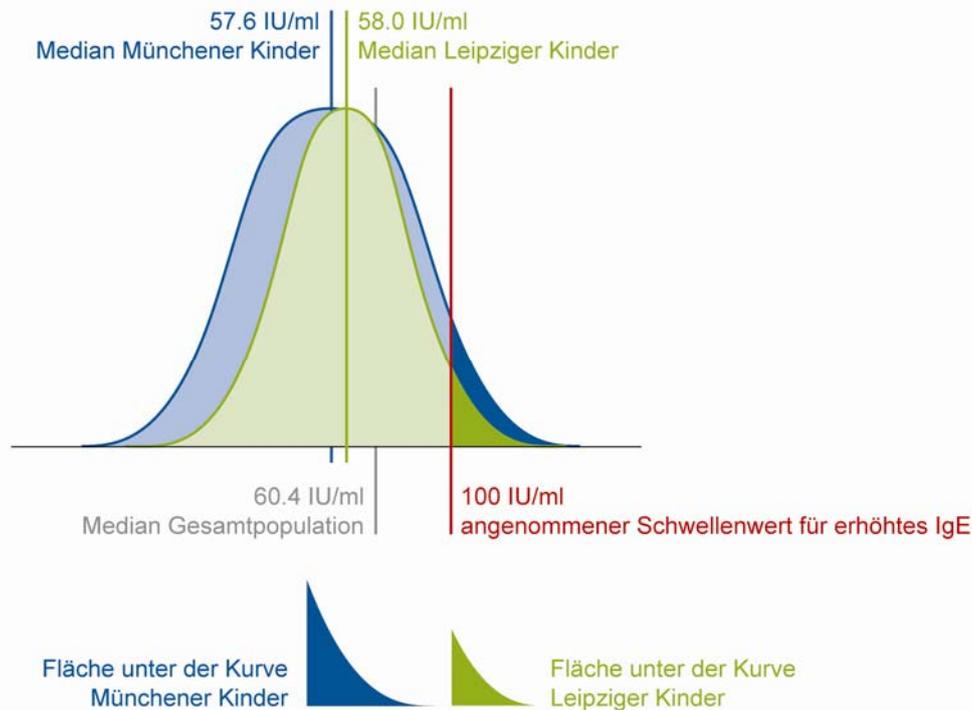
**IL-4R $\alpha$ \_A148G:**

[Abbildung 5.1] Ergebnisse aktueller Studien zur Assoziation des IL-4R $\alpha$ \_A148G mit Asthma (Diagnose gesamt), atopischem und nicht-atopischem Asthma. Das zuschreibbare Risiko (OR) sowie die 95 %-Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung der publizierten Allelfrequenzen berechnet und graphisch dargestellt.

Atemnot und bronchiale Hyperreaktivität wurden in den ISAAC-Fragebogen als Parameter für die Schwere eines vorliegenden Asthmas erfasst. Diese beiden Symptome waren in der Leipziger Population signifikant mit dem polymorphen Allel IL-4R $\alpha$ \_148G vergesellschaftet. Ebenso war in der Leipziger Population der Phänotyp IgE > 100 IU/ml signifikant mit diesem SNP assoziiert. Beide Ergebnisse zeigten in der Münchener Population den gleichen Trend, erreichten jedoch kein signifikantes Niveau. Da sich die Populationen hinsichtlich ihrer Größe nur unwesentlich unterscheiden, ist es unwahrscheinlich, dass die größere Population der Leipziger Kinder Effekte aufdeckt, die in der Münchener Population unzureichend abgebildet werden. Nachdem die Atopierate in der Münchener Population höher ist, ist es zudem unwahrscheinlich, dass die beschriebene signifikante Assoziation zwischen dem SNP und erhöhten IgE-Werten in der Leipziger Population Ausdruck eines systemischen Fehlers ist.

Als systemischer Fehler könnte auch die unabsichtliche Selektion von Studienpatienten nach atopischen Krankheiten in der Familie die durchschnittlich gemessenen IgE-Werte beeinflussen (Berciano, Crespo et al. 1987). Nachdem in dieser Arbeit jedoch genetische Effekte mittels einer Assoziationsanalyse untersucht werden sollen, ist eine Stratifizierung nach „Atopie in der Familie“, also einer genetischen Belastung, nicht sinnvoll. Zudem werden derartige unabsichtliche Selektionen mit zunehmender Größe der Studie unwahrscheinlicher.

Beide Populationen stellen eine Stadtbevölkerung dar. Es ist zu überlegen, ob unterschiedlich hohe IgE-Spiegel unabhängig von genetischem Einfluss mit uneinheitlichen Umweltbedingungen in Zusammenhang gebracht werden können. Der Serum-IgE-Normalverteilung in *Tabelle 3.2* (siehe Seite 23) ist zu entnehmen, dass die Leipziger Kinder mit 58.0 versus 57.6 IU/ml zwar eine minimal höhere 50. Perzentile haben, jedoch mit 106 versus 118 IU/ml und 406 versus 464 IU/ml deutlich niedrigere Schwellenwerte für die 66. beziehungsweise 90. Perzentile besitzen. Die Normalverteilung innerhalb der Leipziger Kinder besitzt also einen ähnlichen Median, die Glockenkurve der graphischen Darstellung ist jedoch schmaler. Damit sind systembedingt weniger Kinder aus Leipzig in der „Fläche unter der Kurve (= Area under the curve, AUC)“, wenn 100 IU/ml als Trennlinie festgelegt werden [*Abbildung 5.2, folgende Seite*]. Dieser Wert wird in der Literatur häufig als Schwelle für „erhöhtes“ IgE angesehen und wurde auch in dieser Arbeit in der kategorischen Phänotypzuordnung (hohes IgE: Ja oder Nein) eingesetzt.



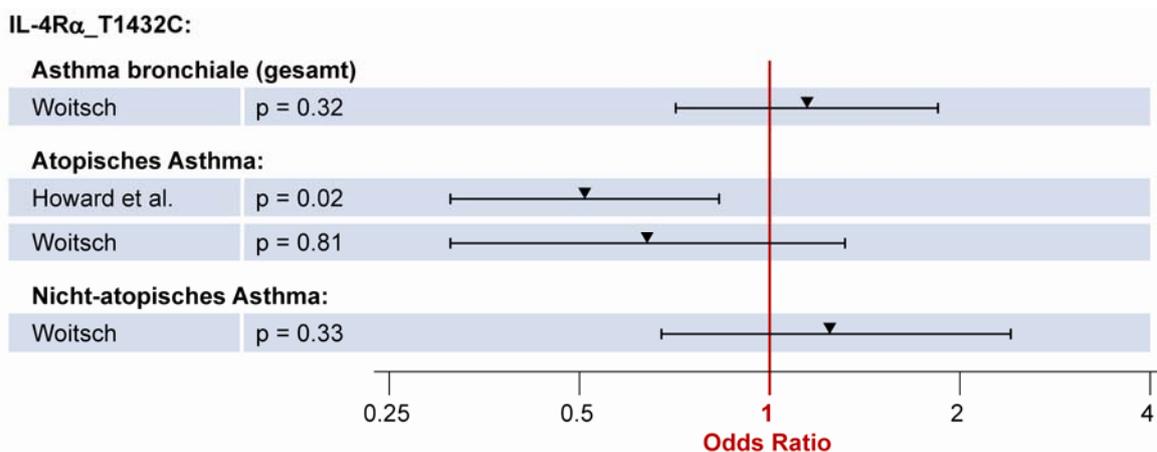
[Abbildung 5.2] Schematische Darstellung der Normalverteilungskurven der IgE-Werte in München, Leipzig sowie in der Gesamtpopulation. Bei einem Schwellenwert von 100 IU/ml ist die Fläche unter der Kurve, und damit die Anzahl der betroffenen Kinder, in der Leipziger Population kleiner als in der Münchener Population.

Dieser Effekt der uneinheitlichen Normalverteilungskurven könnte das unterschiedliche Signifikanzniveau der Ergebnisse von Leipzig und München erklären. Auch in der Analyse mit kontinuierlicher IgE-Messung war die beschriebene Assoziation zwischen dem polymorphen Allel von IL-4R $\alpha$ \_A148G und erhöhtem Gesamt-IgE in der Leipziger Population signifikant, bei den Münchener Kindern jedoch mit einem durchschnittlich niedrigerem IgE-Median vergesellschaftet [Tabelle 4.1, siehe Seite 40].

Zusammenfassend sind die in den Ergebnissen dieser Arbeit die beobachteten Effekte von IL-4R $\alpha$ \_A148G auf die Regulation des Gesamt-IgEs beziehungsweise bei der Entstehung von Asthma damit auch auf Umwelteinflüsse zurückzuführen und nicht durch genetische Veränderungen alleine zu erklären.

## 5.4. IL-4R $\alpha$ \_T1432C

In der vorliegenden Studie konnte keine Assoziation zwischen dem SNP IL-4R $\alpha$ \_T1432C und den Phänotypen Asthma bronchiale und erhöhtes Gesamt-IgE oder Atopie gefunden werden. Diese Aussage deckt sich mit den meisten bereits publizierten internationalen Assoziationsergebnissen, welche keine Assoziation mit zwischen diesem SNP und allergischen Erkrankungen beschreiben. Gleichwohl wurde in funktionellen Studien ein Einfluss dieses SNPs auf die Phosphorylierung von STAT6 und IRS beschrieben (Kruse, Japha et al. 1999; Bottini and Borgiani 2002; Liu, Beaty et al. 2003). Die von Wjst 2002 berichtete tendenzielle Assoziation mit erhöhtem IgE in einer schwedischen und deutschen Zwillingsstudie konnte nicht nachvollzogen werden (Wjst, Kruse et al. 2002). In einer finnischen Population konnte eine grenzwertig signifikante Assoziation zwischen diesem SNP und einer IgE-Erniedrigung beobachtet werden, jedoch war dieser Effekt aufgrund eines hohen Linkage-Disequilibriums mit dem SNP IL-4R $\alpha$ \_A1652G nicht eindeutig einem SNP zuzuordnen (Kauppi, Lindblad-Toh et al. 2001). Die von Howard et al. berichtete grenzwertige Assoziation mit atopischen Asthma bronchiale konnte in unserer Population nicht bestätigt werden (Howard, Koppelman et al. 2002) [Abbildung 5.3].

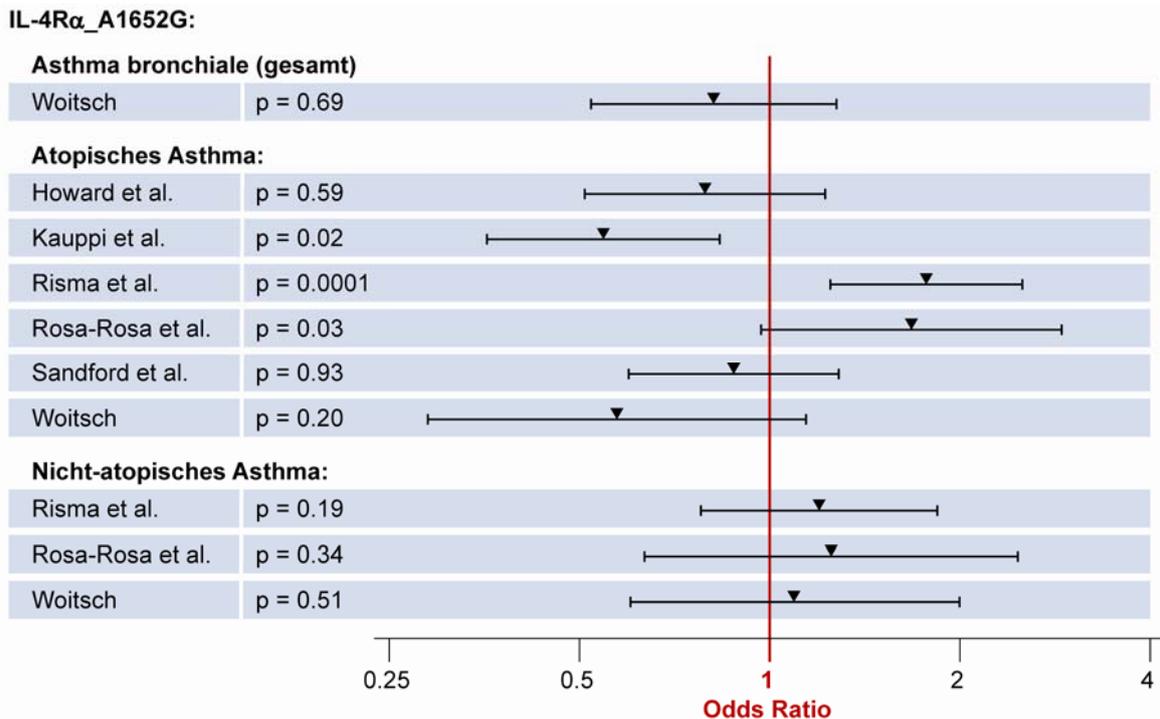


[Abbildung 5.3] Ergebnisse aktueller Studien zur Assoziation des IL-4R $\alpha$ \_T1432C mit Asthma (Diagnose gesamt), atopischem und nicht-atopischem Asthma. Das zuschreibbare Risiko (OR) sowie die 95 %-Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung der publizierten Allelfrequenzen berechnet und graphisch dargestellt.

In der Beurteilung des Schweregrades einer bereits diagnostizierten Asthma-Erkrankung gaben 3.6 % der homozygoten WT-Träger nächtliches Husten an, bei den Trägern des Allels T1432C waren es 10.1 % ( $p = 0.01$ ). Bei den Kindern mit atopischem Asthma aus Leipzig wurde ein Zusammenhang zwischen Vorliegen des SNPs und den Phänotyp Atemnot als Schwereparameter beobachtet, allerdings waren hier die Fallzahlen gering, in der Gesamtpopulation war dieser Trend nicht nachzuvollziehen. Zusammenfassend konnte keine Einzelassoziation dieses SNPs mit den hier untersuchten Phänotypen beobachtet werden.

### 5.5. IL-4R $\alpha$ \_A1652G

Für diesen SNP wurde in der Population des Erstbeschreibers (3 Erwachsene mit Hyper-IgE-Syndrom sowie 7 Erwachsene mit einer ausgeprägten atopischen Dermatitis als Indexpatienten versus 50 randomisierte erwachsene Probanden) eine deutliche Assoziation mit den Phänotypen Hyper-IgE-Syndrom und atopische Dermatitis festgestellt. Neben dieser klinischen Assoziation konnte eine erhöhte IL-4 induzierte Expression des niedrig-affinen IgE-Rezeptors (CD 23) bei Vorliegen des SNPs in in-vitro-Studien gezeigt werden. Dies würde eine erhöhte IgE-abhängige Reaktionsbereitschaft ermöglichen. Diese funktionellen Daten wurden mit der modifizierten Aktivierung von SHP-1 an der im Protein benachbarten Tyrosin-Domäne Y550 erklärt (Hershey, Friedrich et al. 1997). Zwei weitere Studien konnten eine Assoziation mit diesem SNP und sowohl der Asthma-Prävalenz wie auch als Triggerfaktor für die Schwere einer Asthma-Erkrankung berichten, dabei wurde der IL-4R $\alpha$ \_A1652G auch als potentieller klinischer Marker für den Schweregrad diskutiert (Rosa-Rosa, Zimmermann et al. 1999; Sandford, Chagani et al. 2000).



[Abbildung 5.4] Ergebnisse aktueller Studien zur Assoziation des IL-4R $\alpha$ \_A1652G mit Asthma (Diagnose gesamt), atopischem und nicht-atopischem Asthma. Das zuschreibbare Risiko (OR) sowie die 95 %-Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung der publizierten Allelfrequenzen berechnet und graphisch dargestellt.

In der Gesamtpopulation der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Einflüsse dieses intrazellulären SNPs auf die Phänotypen Asthma bronchiale, Schwere der Asthma-Erkrankung bei bestehender ärztlicher Diagnose Asthma, bronchiale Hyperreagibilität, Heuschnupfen oder erhöhtes Gesamt-IgE gefunden werden. Kauppi fand in einer finnischen Population mittels einer Fall-Kontroll-Studie einen tendenziell protektiven Effekt dieses SNPs auf die Entstehung von Asthma. Risma beschreibt in seiner nordamerikanischen Population eine Assoziation mit dem Polymorphismus IL-4R $\alpha$ \_1652G und atopischem Asthma (Kauppi, Lindblad-Toh et al. 2001; Risma, Wang et al. 2002). Beide Ergebnisse können in der Münchener und Leipziger Population nicht bestätigt werden [Abbildung 5.4].

In den Einzelanalysen der Leipziger Studienpopulation erhöhte sich das Risiko, an ein Bronchitis zu erkranken, wenn das Kind heterozygot oder homozygot für den Polymorphismus an der Stelle IL-4R $\alpha$ \_1652 war (OR 1.44, 95 %-Konfidenzintervall 1.00-2.08, p = 0.05). Dieses Risiko für Bronchitis war ebenso deutlich bei den atopischen Kindern (SPT  $\geq$  3 mm) dieser Population aus Leipzig zu beobachten (OR 3.03, 95 %-Konfidenz-

intervall 1.49-6.24,  $p = 0.002$ ). Nachdem im Gegensatz hierzu diese SNP-Ausprägung in der Münchener Population regelhaft protektiv für die abgefragten obstruktiven Episoden (pfeifende oder keuchende Atemgeräusche) sowohl bei atopischen wie auch bei nicht-atopischen Kindern war, erscheinen diese Ergebnisse jedoch als unplausibel. Bei Stratifizierung nach Herkunft (München-Leipzig) und Atopie ( $SPT \geq 3\text{mm}$  Hautreaktion) konnten tendenzielle protektive Assoziationen dieses SNPs mit dem Phänotyp Heuschnupfen und atopische Dermatitis beobachtet werden, jedoch erreichten diese Ergebnisse keine deutliche statistische Signifikanz. Betrachtet man weitere publizierte Studien, so ist ein herausragender Effekt dieses SNPs, alleine betrachtet, bei der Entstehung oder Agravierung atopischer Erkrankungen aufgrund der sehr inhomogenen Ergebnisse unwahrscheinlich (Risma, Wang et al. 2002; Hoesbee, Rietveld et al. 2003).

### 5.6. Analysen der Haplotypen innerhalb der IL-4R $\alpha$ -Kette

Auf Grundlage funktioneller Daten bereits publizierter Studien und der Überlegung, dass sich SNPs innerhalb eines Proteins durch Einflüsse auf das Bindungsverhalten von Liganden auch gegenseitig beeinflussen können, wurden paarweise Assoziationsstudien zwischen den atopischen Phänotypen und den drei Rezeptor-SNPs durchgeführt (Ober, Leavitt et al. 2000; Risma, Wang et al. 2002). Bei der Interpretation der Ergebnisse erschwert das mit 0.85 hohe Linkage Disequilibrium zwischen den untersuchten SNPs IL-4R $\alpha$ \_T1432C und A1652G die Zuordnung von Effekten zu den individuellen SNPs. Ebenso wie bei den hier untersuchten Kindern konnte dieses hohe LD auch in der Population von Ober et al. 2000 sowie in weiteren Studien gefunden werden (Kauppi, Lindblad-Toh et al. 2001).

In einer funktionellen Studie, bei der die Expression des niedrig-affinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ R<sub>II</sub> (*Cluster of Differentiation* CD23) in transfizierten B-Zellen gemessen wurde, konnte gezeigt werden, dass der Haplotyp IL-4R $\alpha$ \_A148G-A1652G Einfluss auf die Expression von Genprodukten nehmen kann, auch wenn durch Transfektion einzelner SNPs keine Effekte zu beobachten sind (Risma, Wang et al. 2002). In der gleichen Studie war der Haplotyp IL-4R $\alpha$ \_148G-1652G mit atopischem Asthma bronchiale assoziiert, dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Population nicht bestätigt werden (OR 1.15, 95 %-Konfidenzintervall 0.59-2.24,  $p$ -Wert 0.67).

Bei der paarweisen Betrachtung der SNPs des IL-4R $\alpha$  fällt auf, dass der Haplotyp IL-4R $\alpha$ \_148G + IL-4R $\alpha$ \_A1652 (GA) mit über die 50. Perzentile erhöhtem Gesamt-IgE assoziiert ist. Im Gegensatz hierzu ist der Haplotyp AA signifikant protektiv. Obwohl beide Ergebnisse nicht allen drei Berechnungsmethoden standhalten, führt dies zur Überlegung, ob bei gleicher Konformation des SNPs IL-4R $\alpha$ \_A1652G ein Effekt des SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G zu beobachten ist, welcher die Erwartungen der beiden Einzeleffekte übertrifft. Auch weitere Autoren fanden eine Assoziation dieses Haplotyps mit erhöhtem IgE (Bottini and Borgiani 2002). Da jedoch beide der genannten Allelausprägungen an Stelle 148 und 1652 in unserer Population auch einzeln tendenziell mit einem erhöhten IgE assoziiert waren, blieben diese Ergebnisse im Rahmen der erwarteten additiven bzw. multiplikativen Assoziationen. Zudem fehlen bei den untersuchten Kindern klinisch schlüssige Beobachtungen, da IgE-vermittelte Krankheiten wie Heuschnupfen oder Testverfahren wie ein positiver Haut-Prick-Test nicht oder in gegensätzlicher Weise von den gleichen Haplotypen beeinflusst werden. Dennoch ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Carol Ober interessant, welche in einer großen Studienpopulation die SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G, A1124G, T1216C, C1232T, T1432C und A1652G genotypisierte. Bei ihrer Auswertung fiel auf, dass die Konstellation IL-4R $\alpha$ \_148G nur dann eine signifikante Assoziation mit einem positiven Haut-Prick-Test (SPT) hatte, wenn die anderen untersuchten Allele jeweils die Wildtypausprägung hatten (Ober, Leavitt et al. 2000).

Eine Aussage, ob in unserer Population die Hinzunahme des SNPs IL-4R $\alpha$ \_T1432C ergänzende Informationen liefern könnte, ist aufgrund der sehr geringen Haplotypfrequenz mit der Ausprägung C an dieser Stelle nicht möglich gewesen.

Diese Ergebnisse können Indikatoren dafür sein, dass in funktionell wichtigen Rezeptorkomplexen wie dem IL-4-Rezeptor klinisch relevante Effekte nur bei gewissen SNP-Konstellationen zum Tragen kommen. Im Fall der hier untersuchten drei SNPs der IL-4R $\alpha$ -Kette konnte keine statistisch signifikante Assoziation mit den gebildeten Haplotypen gefunden werden, welche hinsichtlich der abgefragten klinischen Phänotypen plausibel ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer bereits veröffentlichten Studie der Gruppe von Ulrich Wahn (Liu, Beaty et al. 2003). Trotz der Anzahl der untersuchten Probanden in der vorliegenden Arbeit verhindern in einigen Subpopulationen, insbesondere beim Bilden von Haplotypen, niedrige Fallzahlen eine stabile Aussage. Nachdem jedoch in dieser und allen weiteren vorliegenden Studien wenige Haplotypen einen hohen Prozentsatz der Probanden

repräsentieren, und zudem die untersuchten atopischen Erkrankungen eine hohe Prävalenz aufweisen, ist die zusätzliche Aussagekraft von weiteren Studien schwer abschätzbar (Caggana, Walker et al. 1999).

## 5.7. Genüberschreitende Interaktionen der SNPs

Im Zusammenspiel der Proteine in einer Signalkaskade ist es ein nahe liegender Gedanke, dass sich SNP-bedingte Veränderungen gegenseitig beeinflussen können. Wie anhand des Beispiels von dem intrazellulär gelegenen SNP A1652G in der IL-4-Rezeptorkette bereits gezeigt, können SNPs offensichtlich auch dann Einfluss auf die Signalübermittlung nehmen, wenn der durch sie bedingte Aminosäure-Tausch in der Nähe von Bindungsstellen weiterer Proteine der Zellkommunikation liegen (Hershey, Friedrich et al. 1997). Durch Konformationsänderung kann die Aktivierung eines intrazellulären Signalübermittlers mittels Phosphorylierung erschwert oder erleichtert werden, was eine veränderte Genexpression zur Folge haben kann. Ebenso kann die Bindung eines Interleukins an den extrazellulären Rezeptoranteil durch SNP-bedingte Aminosäureänderungen modifiziert werden. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Assoziationsstudie zwischen allergischen Phänotypen und SNP-Kombinationen kann durchgeführt werden, obwohl die tatsächliche Art der Beeinflussung der Signalübermittlung durch SNPs auf Proteinebene im Falle des IL-4R $\alpha$  und seiner Liganden derzeit nicht ausreichend untersucht ist.

### 5.7.1. Analysen mit IL-4 und IL-4R $\alpha$

Vorliegende Studien beschreiben eine Assoziation mit Asthma bronchiale und dem Polymorphismus C-589T in der Promotorregion des Interleukin-4-Gens (Kabesch, Baldini et al. 2000; Sandford, Chagani et al. 2000). Sandford et al. untersuchte eine Assoziation zwischen Haplotypen aus diesem Promotorpolymorphismus und dem in dieser Studie untersuchten IL-4R $\alpha$ \_A1652G, konnte jedoch keine zusätzliche Information durch die Bildung von Haplotypen auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit finden. In der vorliegenden Studie variierte aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der erfolgreich genotypisierten Proben für die SNPs im IL-4R $\alpha$  auch die Zahl der Kinder, welche für eine gemeinsame Analyse aus IL-4R $\alpha$  und IL-4\_C-589T zur Verfügung standen. Die Einzelassoziation zwischen dem IL-4-Promotor-SNP und der Diagnose Asthma blieben, unabhängig von diesen veränderlichen Probenzahlen, signifikant. Dieses Ergebnis wurde jedoch in dieser Arbeit weder von

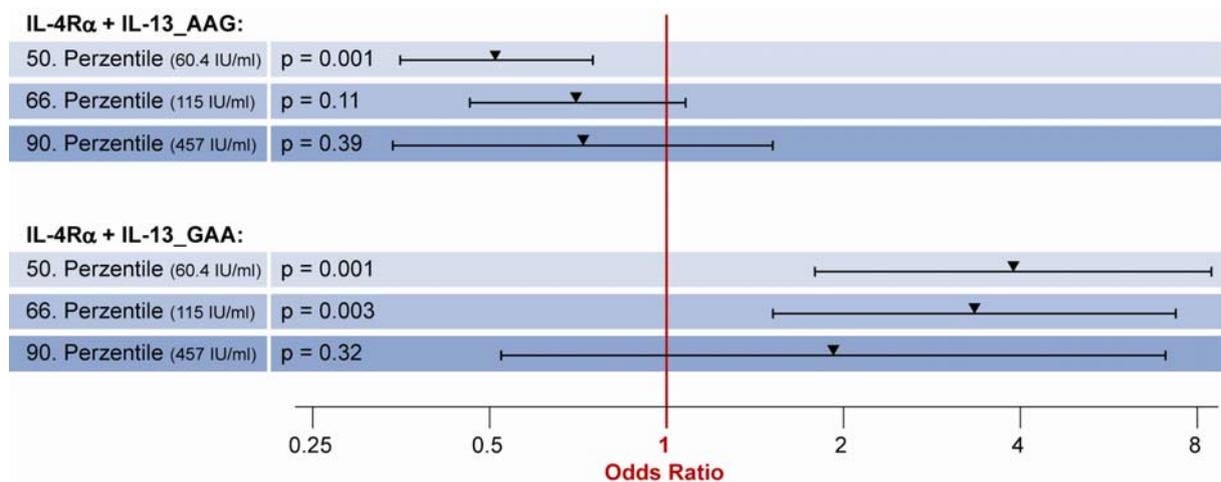
IL-4R $\alpha$ \_A148G beeinflusst, welcher als extrazellulär gelegener SNP eine mögliche Rolle im Bindungsverhalten von IL-4 an seinen Rezeptor spielen könnte, noch von den beiden intrazellulär gelegenen SNPs IL-4R $\alpha$ \_T1432C oder A1652G. Um auch erweiterte kombinierte Effekte zu erfassen, wurden in einer Analyse die SNPs A148G und A1652G im IL-4R $\alpha$  sowie C-33T und C-589T im IL-4-Promotor sowie das variable Element (VE) im IL-4-Gen VE6523 in Haplotypen dargestellt und auf ihre Assoziationen mit den atopischen Phänotypen getestet. In den 1120 Kindern der Studie repräsentierten 5 Haplotypen 90 Prozent der Population. Bei dieser Analyse war der häufigste Haplotyp, AA1CC, mit einem über die 50. Perzentile erhöhtem Serum-IgE assoziiert. Dieses Ergebnis war unabhängig von dem gewählten Berechnungsmodell signifikant. Nachdem die Assoziation von IL-4R $\alpha$ \_A148 und A1652 (IL-4R $\alpha$ \_AA) mit einem erniedrigten OR für ein erhöhtes IgE bereits bekannt war, wurde nun für den Haplotyp aus den drei weiteren SNPs des IL-4-Gens 1CC (IL-4\_1CC) die Assoziation mit der 50. IgE-Perzentile bestimmt und die erwarteten multiplikativen und additiven Ergebnisse mit den beobachteten Assoziationen verglichen. Nachdem die kombinierten Effekte von IL-4R $\alpha$ \_AA und IL-4\_1CC hinter den erwarteten Ergebnissen zurückblieben, kann keine zusätzliche Information aus diesen erweiterten Haplotypen gewonnen werden. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass eine entscheidende Interaktion der untersuchten IL-4-SNPs mit Veränderungen der variablen Genloci im IL-4R $\alpha$  bezüglich der getesteten Phänotypen unwahrscheinlich ist.

#### 5.7.2. Analysen mit IL-13 und IL-4R $\alpha$

Eine Haplotypanalyse mit SNPs im IL-13- und IL-4R $\alpha$ -Gen bezüglich ihrer Assoziation mit IgE wurde bisher in keiner anderen Population durchgeführt. Howard et al. berichtete von einem Haplotyp zwischen einem SNP im Promotor des IL-13-Gens (IL-13\_-1111) und IL-4R $\alpha$ \_T1432C, welcher mit einem deutlich erhöhtem Odds Ratio für Asthma bronchiale einherging (Howard, Koppelman et al. 2002). Graves et al. berichtete von einer deutlichen Assoziation zwischen dem kodierenden SNP G2044A, welcher zu einem Aminosäuretausch von Arginin zu Glutamin an Stelle 130 im Protein des Interleukin-13 führt, und erhöhten Serum-IgE-Spiegeln in der Population, welche auch für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stand (Graves, Kabesch et al. 2000). He et al. konnte in Haplotypanalysen mit einem Promotorpolymorphismus des IL-4-Gens und dem SNP IL-13\_G2044A eine signifikante Assoziation mit Atopie und atopischer Dermatitis nachweisen (He, Chan-Yeung et al. 2003). Daher wurde eine Haplotypanalyse zwischen dem SNP IL-13\_G2044A und den beiden mit

IgE-Spiegeln assoziierten SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen durchgeführt. Bei den paarweisen Analysen fiel auf, dass bei Vorhandensein des Polymorphismus an Stelle 1652 im IL-4R $\alpha$ - und an Stelle 2044 im IL-13-Gen ein signifikant höheres zuschreibbares Risiko für einen IgE-Spiegel über 100 IU/ml zu beobachten war. Dieses Ergebnis blieb jedoch im Rahmen der erwarteten Einzelloziationen. Signifikant assoziiert war auch die Kombination aus dem IL-4R $\alpha$ \_A148G und dem IL-13-Polymorphismus mit erhöhten IgE-Spiegeln, wenn der IL-4-Rezeptorpolymorphismus homozygot als Wildtyp vorlag. Dieses Ergebnis ist berichtenswert, da der IL-4R $\alpha$ \_AA148 in der untersuchten Population tendenziell protektiv vor hohem IgE war. Hier kann die funktionelle Überlegung angestellt werden, ob durch die Wildtypformation in der extrazellulären Rezeptorkomponente mit einem tendenziellen protektiven OR die Effekte eines SNPs im Liganden IL-13 verdeutlicht werden. Allerdings ist die Abweichung des beobachteten vom erwarteten Odds Ratio nur marginal, so dass diese These hier nicht gestützt werden kann.

Kombiniert man die tendenziell mit Serum-IgE-Spiegeln assoziierten SNPs im IL-4-Rezeptor A148G und A1652G mit dem SNP im IL-13 (G2044A), so kann ein deutlicher Einfluss zweier Haplotypen auf das Gesamt-IgE der Probanden beobachtet werden [*Abbildung 5.5, siehe folgende Seite*]. Die Zuordnung des Haplotypen AAG zu einem niedrigen zuschreibbaren Risiko, beziehungsweise die Assoziation des Haplotypen GAA zu hohem OR für ein über die 50. Perzentile erhöhtes IgE war in allen drei Berechnungsmethoden signifikant. Dieses Ergebnis ist nicht mit kleineren Fallzahlen zu erklären, da für die Berechnung dieser beiden häufigen Haplotypen mit 473 Individuen ähnlich große Subpopulationen gebildet werden konnten, wie für die paarweisen Assoziationen (n = 474).



[Abbildung 5.5] Zuordnung der IgE-Schwellen zu den Haplotypen der untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$ - und im IL-13-Gen mit dem jeweiligen Odds Ratio (OR) und den 95 %-Konfidenzintervallen sowie den p-Werten. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002).

Der in der Gesamtpopulation dieser Studie beobachtete signifikant protektive Effekt des Haplotyps AAG aus IL-4R $\alpha$  und IL-13 lag unter dem erwarteten multiplikativen und additiven Risiko der Einzelassoziationen. Hingegen kann das beobachtete, mit mindestens 3.3 deutlich erhöhte, Odds Ratio des Haplotyps GAA nicht mit den erwarteten kombinierten Ergebnissen der Einzelassoziationen erklärt werden. Träger dieses Haplotyps haben ein in allen Berechnungsmodellen signifikant erhöhtes Risiko, ein Serum-IgE über der 50. beziehungsweise 66. Perzentile zu besitzen. Dieser Haplotype repräsentiert in der vorgestellten Population 8 % der Kinder und sollte bei der Bildung von Risikohaplotypen erwogen werden. Zudem könnten funktionelle Studien hilfreich sein, die Bedeutung dieses Haplotyps hinsichtlich seines Einflusses auf die IgE-Produktion zu klären.

### 5.7.3. Analysen mit STAT6 und IL-4R $\alpha$

Schedel et al. genotypisierte die auch für die vorliegende Arbeit verwendete ISAAC-Studienpopulation auf 6 vorbeschriebene, nicht-kodierende SNPs im STAT6-Gen (Schedel, Carr et al. 2004). Hierbei zeigten zwei Polymorphismen eine stabile signifikante Assoziation mit erhöhten Serum-IgE-Spiegeln der Probanden. Neben dem in der 3'-UTR liegenden SNP T12888C war dies der in einem Intron befindliche SNP C2892T, welcher durch seine Lage in einer Bindungsstelle für den Nuklear-Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) eine funktionell schlüssige Rolle in der Genregulation von STAT6 spielen könnte. Ein Haplotype, bestehend aus diesen beiden und

vier weiteren SNPs im STAT6-Gen war signifikant assoziiert mit erhöhten IgE-Spiegeln der Probanden. In diesem von Schedel et al. beobachtetem „Risiko“-Haplotyp war die Ausprägung des Allels an Stelle 12888 der Wildtyp „T“ und an Stelle 2892 der Polymorphismus, also ebenfalls „T“. Nachdem STAT6 als einem der intrazellulären Signalübermittler des IL-4-Rezeptors eine entscheidende Rolle bei der IgE-Produktion der Zelle zukommt, wurden in dieser Arbeit Haplotypen aus IL-4R $\alpha$ \_A148G und dem intrazellulären A1652G mit den beiden IgE-assoziierten STAT6-SNPs gebildet und auf ihre Zuordnung zu den stratifizierten IgE-Spiegeln getestet. Dies war auch insofern interessant, als von Mitsuyasu 1999 eine Hochregulation der STAT6-Antwort bei Vorliegen des Wildtyps an Stelle 148 im IL-4R $\alpha$  in transfizierten B-Zellen gezeigt werden konnte (Mitsuyasu, Yanagihara et al. 1999).

In unserer Population war keine der mit dem STAT6-„Risiko“-Haplotypen „TT“ gebildeten Kombinationen signifikant mit erhöhtem IgE assoziiert. Der Haplotyp STAT6 + IL-4R $\alpha$ \_CTGA überstieg deutlich die erwarteten OR-Werte aus den multiplikativen und additiven Abschätzungen. Nachdem die grundlegenden Odds Ratios der Zweierhaplotypen CT und GA jedoch nur in der Methode nach Zaykin et al. eine signifikante Assoziation mit IgE-Spiegel zeigten, ist bei konservativer Betrachtung eine Schlussfolgerung aus diesen Daten nicht möglich. Auch bei funktionellen Überlegungen ist ein Zusammenhang zwischen stillen Polymorphismen im STAT6-Gen, welche Einfluss auf die Transkription haben mögen, und kodierenden SNPs, welche über Konformationsänderungen möglicherweise das Bindungsverhalten der Liganden regulieren, nicht ohne Weiteres herstellbar.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Atopische Erkrankungen und Asthma bronchiale beeinträchtigen einen Großteil der in den Industriestaaten lebenden Menschen und sind weltweit verbreitet. Es ist zunehmend Konsens, dass die Entstehung von Asthma bronchiale und atopischen Erkrankungen im Kontext einer Interaktion zwischen determinierter, aber modulationsfähiger genetischer Gegebenheit und Umweltbedingungen gesehen werden muss. Dabei wird immer häufiger die Beobachtung gemacht, dass bestimmte Zeitfenster in der immunologischen Reifung eines Individuums Einfluss auf die Entstehung der Erkrankungen haben können. Daher war die Untersuchung einer genetisch weitgehend homogenen, durch politische Umstände jedoch im Kleinkindalter deutlich differenten Umweltbedingungen ausgesetzten Population ein vielversprechender Ansatz zur Klärung der Einflüsse von Genveränderungen im Interleukin-4-Rezeptor- $\alpha$ -Gen und seiner unmittelbaren Liganden auf die Entstehung von Allergie-bedingten Erkrankungen. Hierfür wurde die DNS von 1120 Kindern der ISAAC-Studie aus Leipzig und München auf drei vorbeschriebene Single-Nukleotid-Polymorphismen genotypisiert, mit den Daten aus den Fragebogen korreliert und auf ihre Assoziation mit den Erkrankungen Asthma bronchiale, Heuschnupfen, atopische Dermatitis, positiver Haut-Prick-Test und IgE-Spiegel getestet. Keiner der untersuchten SNPs war in dieser Population mit Asthma, Heuschnupfen oder atopischer Dermatitis assoziiert. Der extrazelluläre SNP IL-4R $\alpha$ \_A148G zeigte eine tendenzielle Assoziation mit erhöhtem Gesamt-IgE der Studienkinder. Bei weitgehend gleichen Allelfrequenzen wurden keine deutlichen Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit gesehen, wenn nach den Herkunftsorten stratifiziert wurde. Bei der Haplotypanalyse innerhalb des IL-4R $\alpha$  beeinflussten die kombinierten SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G und A1652G die IgE-Spiegel der Population, jedoch nicht stabil in allen drei eingesetzten Verfahren der Berechnung. In der Haplotypanalyse mit vorbeschriebenen SNPs des Liganden IL-13 konnte ein Risiko-Haplotyp für erhöhtes IgE, IL-4R $\alpha$  + IL-13\_GAA, identifiziert werden, welcher die additiven und multiplikativen Erwartungen der Einzelassoziationen deutlich übersteigt. Dies macht eine weitere Analyse dieses Haplotyps in funktionellen Studien interessant.

Die weiteren untersuchten Haplotypen mit den Genen von IL-4 und dem intrazellulären Signalübermittler STAT6 konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielen, welche kritischen Betrachtungen hinsichtlich der klinischen Plausibilität und der Limitationen der Berechnungsmodi standhielten. Daher muss eine entscheidende Rolle der untersuchten SNPs

im IL-4R $\alpha$ -Protein auf die getesteten Phänotypen als unwahrscheinlich angesehen werden, wobei einzelne tendenzielle Effekte auf den Serum-IgE-Spiegel insbesondere in der Haplotypanalyse aufgrund der großen Studienpopulation herausgearbeitet werden konnten. Ein modulierender Einfluss der SNPs und der gebildeten Haplotypen in dieser Signalkaskade auf IgE-vermittelte Erkrankungen kann als wahrscheinlich angesehen werden, konnte jedoch in dieser Assoziationsstudie nicht zweifelsfrei verifiziert werden. Im Rahmen eines „Risikopanel“ für die Entwicklung eines hohen IgEs, beziehungsweise IgE-vermittelter Erkrankungen sind die SNPs IL-4R $\alpha$ \_A148G und A1652G somit weiterhin interessante Kandidaten.

## 7. ANHANG

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
µg	Mikro-Gramm
3'-UTR	3'-UTR steht für <i>untranslated region</i> . Dabei handelt es sich um Regionen eines Gens, die zwar bei der Transkription in mRNA transkribiert werden, bei der Translation jedoch nicht für eine Aminosäuresequenz codieren. In diesen Bereichen liegen wichtige Informationen für die Translation des offenen Leserahmens (ORF).
AD	Allergische Dermatitis
Allel	Eine Stelle der genomischen DNS mit mehreren möglichen Ausprägungen.
Alternatives Splicing	Das alternative Splicing (oder alternatives Spleißen) ist ein Vorgang im Rahmen der Transkription in der Proteinbiosynthese bei Eukaryoten. Aus ein und derselben DNS-Sequenz und dementsprechend ein und derselben prä-mRNS können mehrere verschiedene reife mRNS-Moleküle und durch deren Translation auch mehrere unterschiedliche Polypeptide gebildet werden. Die Regulation, welche DNS-Sequenz Intron oder Exon wird, erfolgt über Splice-Faktoren, welche Signale auf der RNS erkennen und die Auswahl der zu transkribierenden Abschnitte modulieren.
AR	Allergische Rhinitis, Heuschnupfen
<sup>as</sup> PCR	Allel-spezifische Polymerase-Kettenreaktion
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität
bp	Basenpaare
CD <sub>n</sub>	Cluster of Differentiation
CI	Konfidenzintervall (Confidence Interval), Vertrauensintervall
CSGA	Collaborative Study on the Genetics of Asthma
DC	Dendritische Zellen
FcεR <sub>I</sub>	Hochaffiner IgE-Rezeptor

Abkürzung	Erläuterung
FcεR <sub>II</sub>	Niedrigaffiner IgE-Rezeptor [CD 23]
FEV <sub>1</sub>	Forciertes Einsekundenvolumen; Volumen, welches vom Probanden bei maximaler Anstrengung nach maximaler Inspiration innerhalb einer Sekunde exhaliiert werden kann.
Haplotypen	Eigentlich <i>Haploide Genotypen</i> und damit der Gegensatz zur Diploidie; im engeren Sinne dieser Arbeit eine definierte Konstellation von Allelkombinationen.
IFN-γ	Interferon-gamma
IgE <sup>100</sup>	Serum-IgE über 100 IU/ml
Ig <sub>x</sub>	Immunglobulin <sub>Typ</sub>
IL-13Rα1	Interleukin-13-Rezeptor-alpha-Kette 1
IL-4Rα	Interleukin-4-Rezeptor-alpha-Kette
IL <sub>-N</sub>	Interleukin <sub>-Typ</sub>
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
ISAAC	International study of asthma and allergies in childhood
JAK <sub>n</sub>	Janus-Kinase <sub>-Typ</sub>
Kinase	Ein phosphorylisierendes Enzym
LD	Linkage Disequilibrium
MHC	Major Histocompatibility
mM	Mili-Molar
n.s.	Nicht signifikant, in dieser Arbeit: $p \geq 0.05$
OR	Odds Ratio
ORF	Offener Leserahmen (OLR) oder offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> , ORF), derjenige Bereich der DNS bzw. mRNS, dessen Leserahmen zwischen einem Start-Codon und einem Stopp-Codon liegt. Der offene Leserahmen kodiert potentiell für die Aminosäuresequenz eines Proteins.
POL	Polymorphismus
Restriktionsenzyme (Nukleasen)	Eine Nuklease katalysiert die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung in einem Polynukleotid.

Abkürzung	Erläuterung
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus; eine Methode zur Genotypisierung mittels eines Restriktionsenzym.
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus; in der Basenfolge der DNS ist eine Base polymorph veränderlich. Die in einer Population häufigere Base wird als Wildtyp, die weitere Base als Polymorphismus bezeichnet. Ändert sich hierdurch die Aminosäure-abfolge des zugehörigen Proteins, wird der SNP als <i>kodierend</i> bezeichnet.
SPT	Skin-Prick-Test oder Haut-Prick-Test
STAT6	Human signal transducer and activator of transcription 6
T <sub>H</sub> 0	Pluripotente/native T-Zelle
T <sub>H</sub> 1	T-Helferzellen Typ 1
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzellen Typ 2
TK	Tyrosin-Kinase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Transition	Tausch einer DNS-Base mit unterschiedlichen Wasserstoff-Brücken-Bindungen.
VE	Variables Element
WT	Wildtyp
γ-chain	Gamma-Kette eines Rezeptorenkomplexes

## 7.2. Verwendete Primer von Metabion, Neuried bei München

Forward-(5')-Primer Reverse-(3')-Primer	SNP im IL-4R $\alpha$	Produktlänge	Restriktionsenzym (Hersteller)/Sonstiges
ACTCCGCCCTGCTCACC TAGGCAGGTGTGAGGAGTATC	A148G	409 bp	Bci IV (NEB)
GCC TCC GTT GTT CTC AGG TA TGT GAG GAG CAT CCT TGG TAC	A148G	267 bp	Rsa I (Promega und NEB)
GCC TCC GTT GTT CTC AGG TAT GCC TCC GTT GTT CTC AGG TAC ATC CTT GGT GCA TGT GGT AAG GCT TAT ACC CCT CTT CCC CAC ACG CCC CTC GTC ATC GCA G	A148 G148	257 bp  439 bp	<sup>as</sup> PCR WT <sup>as</sup> PCR POL <sup>as</sup> PCR reverse gemeinsam Control-5'-Primer Control-3'-Primer
GAC ACG GTG ACT GGC TCG AGG GCA TCG CCT GAG AGC AGC AG	T1432C	373 bp	Bse R I (NEB)
GCT CTC TGG GAC ACG GTG ACT GGC TCT CGG ATG GGG GAG TCA TGC CTT CTT CCA CCC TCG G	T1432C	259 bp	Ava I (NEB)
GCT TAT ACC CCT CTT CCC CAC ACG CCC CTC GTC ATC GCA G CAC CGC ATG TAC AAA CTC CC CCC CCA CCA GTG GCT ATC A	A1652G	439 bp  288 bp 189 bp	<sup>as</sup> PCR out fwd <sup>as</sup> PCR out rev <sup>as</sup> PCR fwd POL <sup>as</sup> PCR rev WT
CAA AGG TGA ACA AGG GGA CAG GGA CTC G GTC TCG GCC CCC ACC AGT GGC TCT C	A1652G	265 bp	Ava I (NEB)

(Die unterstrichenen Basen stellen von der cDNS abweichende „missmatches“ dar, um die Erkennungssequenz für ein Restriktions-Enzym zu bilden oder die Bindungsstärke zur genomischen DNS herabzusetzen.)

7.3. Darstellung der Schmelztemperatur und des Anteils der GC-Basen beim Primer für die Allel-spezifische PCR des SNPs IL4-R $\alpha$ \_A1652G

Name	Primer	Tm (°Celsius)	GC %
il4r_551_aspcr_out_fwd	GCTTATACCCCTCTTCCCCAC	60	57
Il4r_551_aspcr_out_rev	ACGCCCCTCGTCATCGCAG	67	68
il4r_551_aspcr_in_fwd POL	CACCGCATGTACAAACTCCC	59	55
il4r_551_aspcr_in_rev WT	CCCCACCAGTGGCTATCA	62	63

7.4. Puffer für Restriktionsenzyme und sonstige Materialien von New England Biolabs

NE-Puffer 1:

10 mM Bis Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (pH 7.0 bei 25 °Celsius).

NE-Puffer 2:

10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (pH 7.9 bei 25 °Celsius).

NE-Puffer 3:

50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM DTT (pH 7.9 bei 25 °Celsius).

NE-Puffer 4:

20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT (pH 7.9 bei 25 °Celsius).

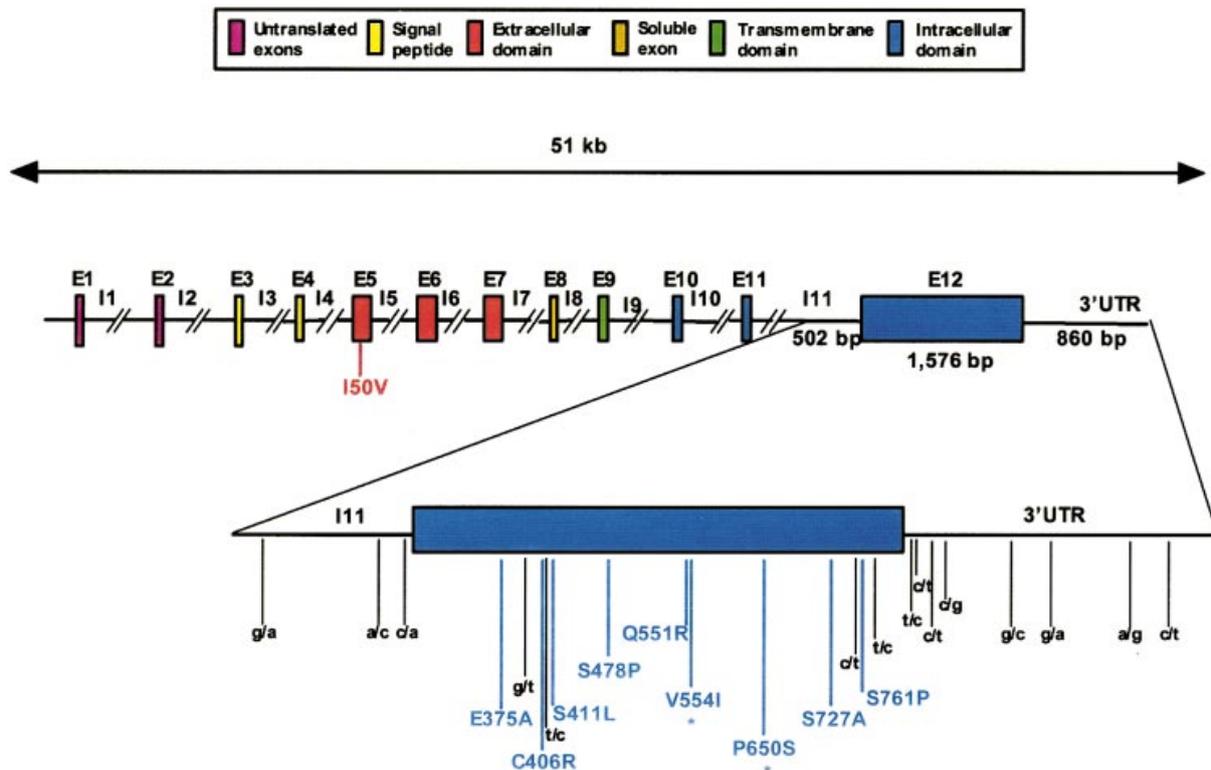
100 Basenpaar-DNS-Leiter von New England Biolabs

Bestell-Nummer #N3231L, 250  $\mu$ g

## 7.5. Puffer für die DNS-Extraktion

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	510 g Tris
10 x Ansatz:	275 g Borsäure
	37.2 g EDTA
	ad 5000 ml H <sub>2</sub> O
Tris EDTA-Puffer (TE-Puffer), pH 8.0	5 ml 1 molares Tris
	1 ml 0.5 molares EDTA
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Proteinase-K-Puffer	5 ml Tris einmolar, pH 7.5
	2 ml EDTA 0.5 molar, pH 8.0
	3 ml NaCl 5 molar
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Erylyse-Puffer	41.45 g 155 mM NH <sub>4</sub> CL (= isotonisch)
	5 g 10 mM KHCO <sub>3</sub>
	0.17 g 0.1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
	ad 5000 ml H <sub>2</sub> O
	mit HCl auf pH 7.4 einstellen

7.6. Graphische Übersicht der Exons und Introns sowie der im Jahr 2001 bekannten SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen



[Abbildung 7.1] Schematische Darstellung der 2001 bekannten SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen, blau geschrieben die kodierenden SNPs mit dem jeweiligen, durch sie bedingtem Aminosäuretausch. Die nicht-kodierenden SNPs sind mit schwarzen Buchstaben kleingeschrieben dargestellt. (E = Exon, I = Intron) entnommen aus (Wu, Di Rienzo et al. 2001).

## 7.7. Komplementäre DNS (cDNS) des humanen Chromosom 16, Darstellung der Exons 12 und 5

```

3'-UTR  actctcttcc tcaaaggaaa agggccatta ggagcacagc tttcaccctg ttcggccctg
   61  aggtcccccac aactagctcc accaggatgg ggttaccttg gtccccattt catagatgag
  121  aaaaccatgg cttctcaagg ctagaagcag agagacttgc ccaagtccac cgagtgagga
  181  aggcgcgtgg ccgggttttg acctggcagg ttttccccga ctccaccatg tgcttctgaa
   .../
   /...
38581  tcctttactt tcctcattaa cttgctttca ctgactctat ggactcgtc tgaattcttt
38641  cttgcatgag attcaagaac cctcttttgg ggtctgcatc tggaccctt tcaagtaaca
38701  ctttcttggg ttgtgtcctt ccctgcctca gttcccact accttagcag ggtttcccgg
38761  gattacttcc taaatcaact atttgaatcc ttgtatgggg aaccctaaacc cagacggcaa
38821  gtttcttaac ctcttgcatc ctggttctctc tggatgggtg aattccagga gttaacagag
38881  acacagcatc cacagcagtg tctggaggtg tgtttgggta atacataaaa aataaagaga Exon 12
38941  caaagaaact ttatttatac aaaactccac cccttctggt ccactctctc cagcaaacac
39001  agataacagg tgatgaaact aaaacacaca gacgagcatt actcaaccce aggttcccgc
39061  cttccctagc acctgaggtc tgggccaaca tgcagggtaa ctgggtcctt atgcctgctg
39121  tctggattgc ccggcccaca ggggtggctga gcatatttat tctgggggtt ccatgcatac
39181  gaggagcccc cagccataca gctgggcatg ggtgtttggc agcaaattgt ccctgcttta
39241  gtcacagcaa tttttcatgt cctctgttgc tcccctaac tgaacacccc ttgacagccg
39301  ggattctgcc tccagcatca acctaaggaa gctctgttaa atgaatgagc acctctaggc
39361  aatgaccacc ctccctgaag ttcaatttct catcgatttc ccaaggccgc ccaagtcat
39421  cccttgatgg ctgtgttagt ttctaggctc ggcttctagt tcagtgagac agaggcaggt
39481  gggcctccat gtgggcatg atctggtggg caaacatgc ctggggcagt tacaacaggg
39541  acagtctgct gcagaagctg tggaggagc agccaacaac tctgtcaca gtcgaggtgc
39601  ccaagggcct cagttttcct gcaggggct gcccgtgggc acggcgacc agtgccctct
39661  actctcatgg gatgtggcga gcccagccc atgctggggg ggggtccagt tctgcagccc
39721  agtgttaggc caactgcagt ggggccaate accttcatac catggttctt caagtctttt
39781  ggaaatctgc cagcctggct gccttccagg aggtggcatt tcccaggcat ggataagccc
39841  tagtctcat ctgcagactc agcaacaaga ggacatgac ctaagagacc ctcatgtatg
39901  tgggtcccac ggagacaaag ttcacgattt tgggggtctg gcttgagctc tgagcattgc
39961  caggggcagg atggaaggat gatgaggatt tactcttctc tgaagatgcc gagggtgcca 761
40021  gggaggcccg acacagactg gcctccagtg gaaccccacc tggagagggg tctggggccc
40081  tcaggggggt tgtagggggc gaggacctgt ctccacagca gcagccacag caaggctgg 727
40141  ccatgacagg ggtctggcca ccctctctc ggccatgaca ctgtttcagg tggccgaca
40201  ggtggcagg aagggctgag tagacaatgc cactgcccag gctgtccaca agggggtctg
40261  tggcctgctc ctggggaagt gggggctttg gcatgtctc taccttttcc cccggctcca
40321  gaccaggtg ctctggggag ctgcttggga gatgtgagct ctgaggactg cgaggtggct
40381  ccctgtccag tccaaagggt aacaagggga cagggactgg ggcagggtcc ccagggcagc
40441  caggaatgag gtcttgaaa ggcttatac cctcttccc actgctagcc caaacccac
40501  atttctctgg ggacacagca ctgctgcaaa gcaggcttga gaaggcctt taaccagcct
40561  ctctggggg acccaagccc accaccgac tggcctgggt gccaccctgc tccaccgat
40621  gtacaaactc ctgatagcca ctgggtgggg ccgagacggg ggctgcagct gccccatgct 551
40681  ggaggacatt tcggcggagg atctgctccc aggtttctgg ctgaggttgg ggcacagtgg
40741  ttggctcaga gagctggggg acacagggca tctcgggttc tacttctctc aggtgtctgg
40801  ccagcagtgg gtctggaccc agctctctgg gacacgggtg ctggctcagg gaggttgctg 478
40861  agctgcggta agcagggtt cctgcgatga cgagggcgt ctctgtgcaa gtcaggttgt
40921  ctggactctg ggtcgggctg gcaggaggac ttggctccag gtggagaggc tgctccttgc
40981  ccagggagg tgctctctg ggccctgcac ttgggaactc atcccagggc atgtgagcac
41041  tcgtacttcc cgaaggtgga agaaggcatg actccccat gtctgtctgg caaaagccc 411/406
41101  cattctctc tccagcagg tccaggaaca ggctctctgt tagccgggcc acaatgccc 375
41161  cccttctctc ctggaagtca tccctgctg tctcaggcga tgacacagaag ctccctttt
41221  ctctctctac ctctctctc tctctcacat ccaccggggc ctcaaacac tccacacatc
41281  gcaccagct gatgtctct ggccagagga ctgtcttgt gatctccact gggcaccatg
41341  ctgattttcc agagccctgg aaaggcatct ctttggcagc cttgtgagga tcttcatccc
41401  ttttcatggt gtgctccaga aaacagggca agagcttggg aagacaattc ttccagtgtc
41461  tgcaaaagca aaggttggtc agggttcagt ttcgacctt gaaaaactcc tattcattct
41521  tcaaagcca gcctgaaatc accatgtcct gatggctgtc tacttcagac atgccttcta
41581  acgttataat cagtaattga tcagtctatg ttgctagaat gagaaatccc tgagggtagg
   .../

```

```

/...
58501 tccgtttcaa aggtgggagg actgaggccc aggcaggggc aggaatccca tcagatttgg
58561 gaaaatacag gcggcttctt cctgctgttg ctatgacccc acctcctccc ctgcccaccc
58621 caccctcagc ccaggcagct gtgggaacac acccagccac ccctgccgca ctccgcctg
58681 ctaccatgc tcgctgggct tgaaggagcc cttccacagc agctgctgcc cagcccacag Exon 5
58741 gtccagtgtg tagttatccg cactgaccac gtcattccatg agcaggtggc acacgcaccc
58801 cgcgccctcg ttgttctcag ggatacacgt gtgggctctg cagacacagg ggctgggta 148
58861 ggctggtcac ctgtaggctg gctgggcccc acagctgtgt ccgggacatg cctccaggaa
58921 ccgcatcaga ctcttcagc ttcccgatca cggatgtgag gacagatctg ggggcttggg
58981 agcggccagg gtgtgctggg gcagccgact agggttgcct ctcttgctgg ccacagcctc
59041 ttaccacatg caccaaggat gctcctcaca cctgcctagc tgccggcctt ggtcctggga
.../
/...
94321 aaatcagaaa gtatgtagtc tcttaatact gacttctttt acttagcaat atgcttttca
94381 ggttcctcaa tgtcttttcc aggcctcaca cctcatttcc ttttgtggct gaatagtgcc
94441 ctattgtatg gatgtaccac agtttatcca ttctacctat tgaagacat ctttgttgc
94501 tccaattttt ggcaattatg aataaagctg ctatcaacac tcatgtgcaa gtttttgggt
94561 ggacataagc tt

```

*[Abbildung 7.2] Darstellung der Exons 12 und 5 sowie der anschließenden Intronbereiche der cDNS des humanen Chromosom 16, Stand 2001. (Markierung der Exons (grau) sowie der SNPs (gelb), Introns und nicht dargestellte Exons gekürzt mit ...//...)*

## 7.8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Abbildungstext	Seite
[Abbildung 2.1]	Die Rolle von IL-4 und IL-13 bei der T-Zell-Differenzierung und IgE-Produktion.	7
[Abbildung 2.2]	IL-4R $\alpha$ als gemeinsame Komponente des IL-4- und IL-13-Rezeptors.	8
[Abbildung 2.3]	Schematische Darstellung der acht im Jahr 2000 bekannten kodierenden SNPs im Gen des IL-4R $\alpha$ (Ober, Leavitt et al. 2000).	12
[Abbildung 2.4]	Darstellung des Linkage Disequilibrium der Aminosäuren in den jeweiligen Positionen des Proteins in der von C. Ober 2000 untersuchten Population, entnommen aus (Ober, Leavitt et al. 2000).	13
[Abbildung 2.5]	Darstellung der Exon (E)- und Intron (I)-Struktur des IL-4R $\alpha$ -Gens in der Region p11.2-p12.1 auf Chromosom 16. Rechts sind die mit den untersuchten Polymorphismen korrespondierenden Aminosäureveränderungen im transmembranen Rezeptorprotein dargestellt.	14
[Abbildung 2.6]	Übersicht über die in die Haplotypanalyse involvierten Proteine mit den entsprechenden Genloci.	16
[Abbildung 3.1]	Methodischer Aufbau einer Allel-spezifischen PCR-Reaktion. Zur Verdeutlichung wird in diesem Beispiel für jedes Allel eine Bande auf der rechten Gel-Darstellung abgebildet. Wenn die amplifizierten Stücke keine verwechselbare Länge aufweisen, ist dies im tatsächlichen Versuch nicht nötig.	27

Abbildung	Abbildungstext	Seite
[Abbildung 3.2]	Auswertung der <sup>as</sup> PCR für IL-4R $\alpha$ _A148G. Pro Individuum wird die PCR-Reaktion zuerst mit dem Wildtyp-Primer, dann in der zweiten Gelbahn mit dem Polymorphismus-Primer durchgeführt. Bindet der Primer nur in der ersten Bahn, liegt ein homozygoter WT (TT) vor, bindet er in der zweiten Bahn, liegt der SNP vor. Bei heterozygoten Individuen binden beide Primer, es kommt in jeder Bahn zu einem Produkt von 257 bp Länge (TC). Eine Bahn wird nur ausgewertet, wenn die Kontrollamplifikation mit 439 bp Länge vorliegt. Nachdem die komplementäre DNS amplifiziert wurde, entspricht T = A und C = G.	30
[Abbildung 3.3]	Darstellung der Auswertung eines AvaI-Verdau zur Detektion des SNPs IL-4R $\alpha$ _T1432C. Das ungeschnittene PCR-Produkt besitzt eine Länge von 259 bp, zur Kontrolle der Enzymfunktion wird das Produkt um 30 bp auf 229 bp gekürzt. Bei Auftreten des Polymorphismus werden weitere 26 bp abgeschnitten, es erscheint eine Bande bei 203 bp Länge. Beim homozygoten SNP fehlt die 229 bp-Bande, es erscheint nur eine Bande bei 203 bp (hier nicht dargestellt).	31
[Abbildung 3.4]	Darstellung der Primerwahl für die Allel-spezifische PCR für IL-4R $\alpha$ _A1652G. Der SNP ist gelb hervorgehoben.	32
[Abbildung 3.5]	Vergleich zweier homozygoter DNS-Proben, oben Wildtyp IL-4R $\alpha$ _AA1652 (entsprechend der komplementären cDNS, welche amplifiziert und sequenziert wurde), unten der Polymorphismus IL-4R $\alpha$ _1652GG. Die entsprechende Base ist mit dem vertikalen Strich markiert.	33

Abbildung	Abbildungstext	Seite
[Abbildung 4.1]	Graphische Darstellung des OR und der 95 %-Konfidenzintervalle der gebildeten Haplotypen der untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$ mit ihrer Assoziation zu den stratifizierten IgE-Spiegeln. Die dargestellten Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell.	49
[Abbildung 5.1]	Ergebnisse aktueller Studien zur Assoziation des IL-4R $\alpha$ _A148G mit Asthma (Diagnose gesamt), atopischem und nicht-atopischem Asthma. Das zuschreibbare Risiko (OR) sowie die 95 %-Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung der publizierten Allelfrequenzen berechnet und graphisch dargestellt.	65
[Abbildung 5.2]	Schematische Darstellung der Normalverteilungskurven der IgE-Werte in München, Leipzig sowie in der Gesamtpopulation. Bei einem Schwellenwert von 100 IU/ml ist die Fläche unter der Kurve und damit die Anzahl der betroffenen Kinder in der Leipziger Population kleiner, als in der Münchener Population.	67
[Abbildung 5.3]	Ergebnisse aktueller Studien zur Assoziation des IL-4R $\alpha$ _T1432C mit Asthma (Diagnose gesamt), atopischem und nicht-atopischem Asthma. Das zuschreibbare Risiko (OR) sowie die 95 %-Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung der publizierten Allelfrequenzen berechnet und graphisch dargestellt.	68
[Abbildung 5.4]	Ergebnisse aktueller Studien zur Assoziation des IL-4R $\alpha$ _A1652G mit Asthma (Diagnose gesamt), atopischem und nicht-atopischem Asthma. Das zuschreibbare Risiko (OR) sowie die 95 %-Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung der publizierten Allelfrequenzen berechnet und graphisch dargestellt.	70
[Abbildung 5.5]	Zuordnung der IgE-Schwellen zu den Haplotypen der untersuchten SNPs im IL-4R $\alpha$ - und im IL-13-Gen mit dem jeweiligen Odds Ratio (OR) und den 95 %-Konfidenzintervallen sowie den p-Werten. Die dargestellten p-Werte entsprechen dem Haplotype-Trend-Regression-Modell (Zaykin, Westfall et al. 2002).	76

Abbildung	Abbildungstext	Seite
[Abbildung 7.1]	Schematische Darstellung der 2001 bekannten SNPs im IL-4R $\alpha$ -Gen, blau geschrieben die kodierenden SNPs mit dem jeweiligen, durch sie bedingtem Aminosäuretausch. Die nicht-kodierenden SNPs sind mit schwarzen Buchstaben kleingeschrieben dargestellt. (E = Exon, I = Intron) entnommen aus (Wu, Di Rienzo et al. 2001).	86
[Abbildung 7.2]	Darstellung der Exons 12 und 5 sowie der anschließenden Intronbereiche der cDNS des humanen Chromosom 16. (Markierung der Exons (grau) sowie der SNPs (gelb), Introns und nicht dargestellte Exons gekürzt mit ...//...)	87

## 7.9. Literaturverzeichnis

- Akimoto, T., F. Numata, et al. (1998). "Abrogation of Bronchial Eosinophilic Inflammation and Airway Hyperreactivity in Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)6-deficient Mice." J. Exp. Med. **187**(9): 1537-1542.
- Asher, M. I., U. Keil, et al. (1995). "International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods." Eur Respir J **8**(3): 483-91.
- Basehore, M. J., T. D. Howard, et al. (2004). "A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects." J Allergy Clin Immunol **114**(1): 80-7.
- Bazaraal, M., H. A. Orgel, et al. (1971). IgE levels in normal infants and mothers and an inheritance hypothesis. **107**: 794.
- Behrman, R., R. Kliegman, et al. (2004). "Nelson Textbook of Pediatrics - 17th ed."
- Berciano, F. A., M. Crespo, et al. (1987). "Serum levels of total IgE in non-allergic children. Influence of genetic and environmental factors." Allergy **42**(4): 276-83.
- Berdel, D. R., D., Kabesch, M., von Berg, A. (2002). "Asthmatherapie bei Kindern und Jugendlichen." UNI-MED SCIENCE Verlag AG, D-28323 Bremen **1. Auflage**.
- Bottini, N. and P. Borgiani (2002). "IL-4 receptor alpha chain genetic polymorphism and total IgE levels in the English population: two-locus haplotypes are more informative than individual SNPs." Clinical Genetics **Volume 61**( Issue 4 Page 288): Page 288.
- Botto, L. D. and M. J. Khoury (2001). "Commentary: Facing the Challenge of Gene-Environment Interaction: The Two-by-Four Table and Beyond." Am. J. Epidemiol. **153**(10): 1016-1020.
- Burchard, E., E. Silverman, et al. (1999). "Association Between a Sequence Variant in the IL-4 Gene Promoter and FEV1 in Asthma." Am. J. Respir. Crit. Care Med. **160**(3): 919-922.
- Caggana, M., K. Walker, et al. (1999). "Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups." Genet Med **1**(6): 267-71.
- Cohn, L., L. Whittaker, et al. (2002). "Cytokine regulation of mucus production in a model of allergic asthma." Novartis Found Symp **248**: 201-13; discussion 213-20, 277-82.
- Cookson, W. O. and M. F. Moffatt (2000). "Genetics of asthma and allergic disease." Hum Mol Genet **9**(16): 2359-64.

- Cooms, R. and P. Gell (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. Clinical aspects of immunology. R. Coombs and P. Gell. Philadelphia, Davis.
- Corry, D. B. and F. Kheradmand (1999). "Induction and regulation of the IgE response." Nature **402**(6760 Suppl): B18-23.
- Cosman, D. (1993). "The hematopoietin receptor superfamily." Cytokine **5**(2): 95-106.
- Daniels, S. E., S. Bhattacharyya, et al. (1996). "A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma." Nature **383**(6597): 247-50.
- de Vries, J. E. (1998). "The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses." J Allergy Clin Immunol **102**(2): 165-9.
- de Vries, J. E. and G. Zurawski (1995). "Immunoregulatory properties of IL-13: its potential role in atopic disease." Int Arch Allergy Immunol **106**(3): 175-9.
- Deichmann, Heinzmann, et al. (1998). "Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL4-receptor gene." Clin Exp Allergy **28**(2): 151-155.
- Deichmann, K., J. Bardutzky, et al. (1997). "Common Polymorphisms in the Coding Part of the IL4-Receptor Gene." Biochemical and Biophysical Research Communications **231**(3): 696-697.
- Donfack, J., D. H. Schneider, et al. (2005). "Variation in conserved non-coding sequences on chromosome 5q and susceptibility to asthma and atopy." Respir Res **6**(145): 145.
- Doull, I. J., S. Lawrence, et al. (1996). "Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness." Am J Respir Crit Care Med **153**(4 Pt 1): 1280-4.
- Duetsch, G., T. Illig, et al. (2002). "STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study." Hum. Mol. Genet. **11**(6): 613-621.
- Duffy, D. L., N. G. Martin, et al. (1990). "Genetics of asthma and hay fever in Australian twins." Am Rev Respir Dis **142**(6 Pt 1): 1351-8.
- Edfors-Lubs, M. L. (1971). "Allergy in 7000 twin pairs." Acta Allergol **26**(4): 249-85.
- Fedorova, L. and A. Fedorov (2003). "Introns in gene evolution." Genetica **118**: 123-131.
- Feijen, M., J. Gerritsen, et al. (2000). "Genetics of allergic disease." Br Med Bull **56**(4): 894-907.
- Forrest, S., K. Dunn, et al. (1999). "Identifying genes predisposing to atopic eczema." J Allergy Clin Immunol **104**(5): 1066-70.

- Gao, P.-S., Mao, X.-Q., Hopkin, J. M., Adra, C. N., Yang, X. & Shirakawa, T. (2000). "Functional significance of polymorphisms of the interleukin-4 and interleukin-13 receptors in allergic disease." Clinical & Experimental Allergy **30**(12): 1672-1675.
- Gessner, A. and M. Rollinghoff (2000). "Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes." Immunobiology **201**(3-4): 285-307.
- Graves, P. E., M. Kabesch, et al. (2000). "A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children." J Allergy Clin Immunol **105**(3): 506-13.
- Grimbacher, B., S. M. Holland, et al. (1998). "The interleukin-4 receptor variant Q576R in hyper-IgE syndrome." N Engl J Med **338**(15): 1073-4.
- Grünig, G., M. Warnock, et al. (1998). "Requirement for IL-13 Independently of IL-4 in Experimental Asthma." Science **282**(5397): 2261-2263.
- Grunewald, S. M., M. Teufel, et al. (2001). "Upon Prolonged Allergen Exposure IL-4 and IL-4Ra Knockout Mice Produce Specific IgE Leading to Anaphylaxis." International Archives of Allergy and Immunology **125**(4): 322-328.
- Haagerup, A., T. Bjerke, et al. (2001). "No linkage and association of atopy to chromosome 16 including the interleukin-4 receptor gene." Allergy **56**(8): 775-779.
- Haagerup, A., T. Bjerke, et al. (2002). "Asthma and atopy - a total genome scan for susceptibility genes." Allergy **57**(8): 680-6.
- Hackstein, H., M. Hecker, et al. (2001). "A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels." Immunogenetics **53**(4): 264-9.
- Hackstein, H., H. Hofmann, et al. (1999). "Definition of human interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers." Human Immunology **60**(11): 1119-1127.
- Hamburger, R. N. (1971). "Current Status of Immunoglobulin E (IgE)." Cal. Med. **115**: 46.
- Hamburger, R. N. (2005). Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis with Normal Serum IgE in a Child with Cystic Fibrosis. **18**: 46-47.
- Harad, N., B. Castle, et al. (1990). "Expression Cloning of a cDNA Encoding the Murine Interleukin 4 Receptor Based on Ligand Binding." PNAS **87**(3): 857-861.
- He, J. Q., M. Chan-Yeung, et al. (2003). "Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children." Genes Immun **4**(5): 385-9.

- Heinzmann, A., X. Q. Mao, et al. (2000). "Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy." Hum Mol Genet **9**(4): 549-59.
- Hershey, G. K., M. F. Friedrich, et al. (1997). "The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor [see comments]." N Engl J Med **337**(24): 1720-5.
- Hoebee, B., E. Rietveld, et al. (2003). "Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms." J Infect Dis **187**(1): 2-11.
- Hoffjan, S., D. Nicolae, et al. (2005). "Gene-Environment Interaction Effects on the Development of Immune Response in the 1st Year of Life." Am. J. Hum. Genet. **76**: 696-704.
- Hopp, R. J., A. K. Bewtra, et al. (1984). "Genetic analysis of allergic disease in twins." J Allergy Clin Immunol **73**(2): 265-70.
- Howard, T. D., G. H. Koppelman, et al. (2002). "Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma." Am J Hum Genet **70**(1): 230-6.
- Idzerda, R., C. March, et al. (1990). "Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily." J. Exp. Med. **171**(3): 861-873.
- ISAAC Steering Committee (Writing Committee: Beasley R, K. U., von Mutius E, Pearce N) (1998). "Worldwide variations in the prevalence of atopic diseases: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." Lancet **351**: 1225-32.
- Izuhara, K. and T. Shirakawa (1999). "Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy." Int J Mol Med **3**(1): 3-10.
- Izuhara, K., Y. Yanagihara, et al. (2000). "Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain." J Allergy Clin Immunol **106**(1 Pt 2): S65-71.
- Janeway, C. A., Travers, Walport, Shlomchik, et al. (2005). "Immunobiology, the immune system in health and disease." **6th edition**.
- Jung, T., N. Schrader, et al. (1999). "Soluble human interleukin-4 receptor is produced by activated T cells under the control of metalloproteinases." Int Arch Allergy Immunol **119**(1): 23-30.
- Kabesch, M. (2001). "Asthma und Allergie: Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren." Monatsschr Kinderheilkd **149**(2): 94-105.
- Kabesch, M., M. Baldini, et al. (2000). "Complete Screening Of The IL-4 Gene And Its Flanking Region For Novel Polymorphisms." Am J Respir Crit Care Med **161**: A929.

- Kabesch, M., W. Peters, et al. (2003). "Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 813-7.
- Kabesch, M., W. Schaal, et al. (1999). "Lower prevalence of asthma and atopy in Turkish children living in Germany." Eur Respir J **13**(3): 577-82.
- Kabesch, M., I. Tzotcheva, et al. (2003). "A complete screening of the IL4 gene: Novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood." J Allergy Clin Immunol **112**(5): 893-8.
- Kaplan, M. H., A. L. Wurster, et al. (1999). "Stat6-dependent and -independent pathways for IL-4 production." J Immunol **163**(12): 6536-40.
- Kauppi, P., K. Lindblad-Toh, et al. (2001). "A second-generation association study of the 5q31 cytokine gene cluster and the interleukin-4 receptor in asthma." Genomics **77** (1-2): 35-42.
- Kelly-Welch, A. E., E. M. Hanson, et al. (2003). "Interleukin-4 and Interleukin-13 Signaling Connections Maps." Science **300**(5625): 1527-1528.
- Klennert, M. D., H. S. Nelson, et al. (2001). Onset and Persistence of Childhood Asthma: Predictors From Infancy. **108**: e69-.
- Kondo, M., T. Takeshita, et al. (1993). "Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4." Science **262**(5141): 1874-7.
- Koppelman, G. H., H. Los, et al. (1999). "Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies." Eur Respir J **13**(1): 2-4.
- Kruse, S., S. Braun, et al. (2002). "Distinct signal transduction processes by IL-4 and IL-13 and influences from the Q551R variant of the human IL-4 receptor alpha chain." Respir Res **3**(1): 24.
- Kruse, S., J. Forster, et al. (1999). "Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor {alpha} produced by alternative splicing." Int. Immunol. **11**(12): 1965-1970.
- Kruse, S., T. Japha, et al. (1999). "The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction." Immunology **96**(3): 365-71.
- Kuperman, D., B. Schofield, et al. (1998). "Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 6 (Stat6)-deficient Mice Are Protected from Antigen-induced Airway Hyperresponsiveness and Mucus Production." J. Exp. Med. **187**(6): 939-948.

- Lewontin, R. and K. Kojima (1960). "The evolutionary dynamics of complex polymorphisms." Evolution . **14**: 458-472.
- Liu, X., T. H. Beaty, et al. (2003). "Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study." J Allergy Clin Immunol **112**(2): 382-8.
- Loftus, B. J., U.-J. Kim, et al. (1999). "Genome Duplications and Other Features in 12 Mb of DNA Sequence from Human Chromosome 16p and 16q." Genomics **60**(3): 295-308.
- Lowe, L. A., A. Simpson, et al. (2005). Wheeze Phenotypes and Lung Function in Preschool Children. **171**: 231-237.
- Malerba, G., E. Trabetti, et al. (1999). "Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children." Clin Exp Allergy **29**(Suppl 4): 27-30.
- Martinez, F. D., S. Solomon, et al. (1998). "Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q." Am J Respir Crit Care Med **158**(6): 1739-44.
- Mattick, J. (1994). "Introns: evolution and function." Curr Opin Genet Dev **4**: 823-831.
- Meyers, D. A., D. S. Postma, et al. (1994). "Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5." Genomics **23**(2): 464-70.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acid Res **16**(3): 1215.
- Mitsuyasu, H., K. Izuhara, et al. (1998). "Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma [letter]." Nature Genetics **19**(2): 119-20.
- Mitsuyasu, H., Y. Yanagihara, et al. (1999). "Cutting edge: Dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis." J Immunol **162**(3): 1227-31.
- Miyata and Matsuyama (1999). "STAT6 deficiency in a mouse model of allergen-induced airways inflammation abolishes eosinophilia but induces infiltration of CD8+ T cells." Clin Exp Allergy **29**(1): 114-123.
- Moffatt, M. F., A. James, et al. (1999). "Extended tumour necrosis factor/HLA-DR haplotypes and asthma in an Australian population sample." Thorax **54**(9): 757-61.
- Morgan, W. J., D. A. Stern, et al. (2005). "Outcome of Asthma and Wheezing in the First 6 Years of Life: Follow-up through Adolescence." Am J Respir Crit Care Med **172**(10): 1253-8.

- Mujica-Lopez, K. and S. Flores-Martinez (2002). "Association analysis of polymorphisms in the interleukin-4 receptor (alpha) gene with atopic asthma in patients from western Mexico." Eur J Immunogenet **29**(5): 375-8.
- Nicolai, T., E. V. Mutius, et al. (1993). "Reactivity to cold-air hyperventilation in normal and in asthmatic children in a survey of 5,697 schoolchildren in southern Bavaria." Am Rev Respir Dis **147**(3): 565-72.
- Noguchi, E. and M. Shibasaki (1999). "No Association between Atopy/Asthma and the Ile50val Polymorphism of IL-4 Receptor." Am. J. Respir. Crit. Care Med. **160**(1): 342-345.
- Ober, C., S. A. Leavitt, et al. (2000). "Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations." Am J Hum Genet **66**(2): 517-26.
- Oiso, N. and K. Fukai (2000). "Interleukin 4 receptor chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan." British Journal of Dermatology **Volume 142**(Issue 5): Page 1003.
- Or, R., H. Renz, et al. (1994). "Regulation of B-Cell Immune Responses: Predominant Role of Interleukin-4 in Triggering Cell Proliferation and Ig Production in Competent B Cells." Clinical Immunology and Immunopathology **72**(1): 141-149.
- Palmer, L. and W. Cookson (2001). "Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma." Respir Res **2**(2): 102 - 112.
- Palmer, L. J. and W. O. Cookson (2000). "Genomic approaches to understanding asthma." Genome Res **10**(9): 1280-7.
- Parronchi, P., M. De Carli, et al. (1992). "IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones." J Immunol **149**(9): 2977-83.
- Patuzzo, C., E. Trabetti, et al. (2000). "No linkage or association of the IL-4Ralpha gene Q576R mutation with atopic asthma in Italian families." J Med Genet **37**(5): 382-4.
- Pfaundler, M. (1933). "Kinderärztliche Fragen im Lichte der Genetik." Monatsschr Kinderheilkd **56**: 1-3.
- Pritchard, M. A., E. Baker, et al. (1991). "The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7." Genomics **10**(3): 801-6.
- Punnonen, J., H. Yssel, et al. (1997). "The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells." J Allergy Clin Immunol **100**(6 Pt 1): 792-801.

- Risma, K. A., N. Wang, et al. (2002). "V75R576 IL-4 Receptor {alpha} Is Associated with Allergic Asthma and Enhanced IL-4 Receptor Function." J Immunol **169**(3): 1604-1610.
- Rolling, C., D. Treton, et al. (1996). "IL4 and IL13 receptors share the [gamma]c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells." FEBS Letters **393**(1): 53-56.
- Rosa-Rosa, L., N. Zimmermann, et al. (1999). "The R576 IL-4 receptor [alpha] allele correlates with asthma severity." Journal of Allergy and Clinical Immunology **104**(5): 1008-1014.
- Russell, G. (1993). "Asthma and growth." Arch Dis Child **69**(6): 695-8.
- Russell, S. M., A. D. Keegan, et al. (1993). "Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor." Science **262**(5141): 1880-3.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandford, A. J., T. Chagani, et al. (2000). "Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity." J Allergy Clin Immunol **106**(1 Pt 1): 135-40.
- Sasieni, P. D. (1997). "From genotypes to genes: doubling the sample size." Biometrics **53**(4): 1253-61.
- Schedel, M., D. Carr, et al. (2004). "A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels." J Allergy Clin Immunol **114**(5): 1100-5.
- Shimoda, K., J. van Deursen, et al. (1996). "Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene." Nature **380**(6575): 630-3.
- Shirakawa, I., K. A. Deichmann, et al. (2000). "Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling." Immunol Today **21**(2): 60-4.
- Takabayashi, A., K. Ihara, et al. (2000). "Childhood Atopic Asthma: Positive Association with a Polymorphism of IL-4 Receptor a Gene but Not with That of IL-4 Promoter or Fc epsilon Receptor I b Gene." Experimental and Clinical Immunogenetics **17**(2): 63-70.
- Takeda, K., T. Tanaka, et al. (1996). "Essential role of Stat6 in IL-4 signalling." Nature **380**(6575): 627-30.
- Tamura, K., H. Arakawa, et al. (2001). "Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases." Clin Exp Allergy **31**(10): 1509-1514.

- Tan, E., B. Lee, et al. (1999). "Interleukin-4 receptor variant Q576R: ethnic differences and association with atopy." Clin Genet **56**(4): 333-334.
- Tan, E. C., B. W. Lee, et al. (1999). "IL4R gene Ile50Val polymorphism." Allergy **54**(9): 1005-1007.
- Tanaka, K., H. Sugiura, et al. (2001). "Lack of association between atopic eczema and the genetic variants of interleukin-4 and the interleukin-4 receptor chain gene: heterogeneity of genetic backgrounds on immunoglobulin E production in atopic eczema patients." Clin Exp Allergy **31**(10): 1522-1527.
- Tippmann, H. F. (2004). "Analysis for free: comparing programs for sequence analysis." Brief Bioinform **5**(1): 82-7.
- Van Der Pouw Kraan, T. C., M. Kucukaycan, et al. (2002). "Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism." Genes Immun **3**(7): 436-9.
- van der Pouw Kraan, T. C. T. M., A. Van Veen, et al. (1999). "An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma." Genes Immunol **1**: 61-65.
- Vercelli, D. (1995). "Regulation of IgE synthesis in humans." J Biol Regul Homeost Agents **9**(1): 1-6.
- Vercelli, D. (2002). "Genetics of IL-13 and functional relevance of IL-13 variants." Curr Opin Allergy Clin Immunol **2**(5): 389-93.
- von Mutius, E., S. K. Weiland, et al. (1998). "Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany." Lancet **351**: 862-6.
- Walley, A. J. and W. O. Cookson (1996). "Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy." J Med Genet **33**(8): 689-92.
- Wang, H. Y., C. P. Shelburne, et al. (1999). "Cutting Edge: Effects of an Allergy-Associated Mutation in the Human IL-4R $\alpha$  (Q576R) on Human IL-4-Induced Signal Transduction." J Immunol **162**(8): 4385-4389.
- Wang, M., Z. M. Xing, et al. (2003). "A common IL-13 Arg130Gln single nucleotide polymorphism among Chinese atopy patients with allergic rhinitis." Hum Genet **20**: 20.
- Weidinger, S., N. Klopp, et al. (2004). "Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults." J Med Genet **41**(9): 658-63.

- Weiland, S. K. and E. von Mutius (1999). "Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification." Eur Respir J **14**(4): 862-70.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, et al. (1998). "Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma." Science **282**(5397): 2258-2261.
- Wjst, M., S. Kruse, et al. (2002). "Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants." Eur J Immunogenet **29**(3): 263-268.
- Wu, X., A. Di Rienzo, et al. (2001). "A population genetics study of single nucleotide polymorphisms in the interleukin 4 receptor alpha (IL4RA) gene." Genes Immun **2**(3): 128-34.
- Xu, J., D. A. Meyers, et al. (2001). "Genomewide screen and identification of gene-gene interactions for asthma-susceptibility loci in three U.S. populations: collaborative study on the genetics of asthma." Am J Hum Genet **68**(6): 1437-46.
- Youn, J., S. H. Hwang, et al. (2000). "Association of the interleukin-4 receptor alpha variant Q576R with Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease." Immunogenetics **51** (8-9): 743-6.
- Zaykin, D. V., P. H. Westfall, et al. (2002). "Testing Association of Statistically Inferred Haplotypes with Discrete and Continuous Traits in Samples of Unrelated Individuals." Human Heredity **53**(2): 79-91.

## 7.10. Danksagung

Für die Übernahme der vorliegenden Dissertation an der medizinischen Fakultät der LMU, die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung bedanke ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. Michael Kabesch. Ich fühle mich glücklich, meine ersten wissenschaftlichen Bemühungen unter den Fittichen eines so außergewöhnlichen Menschen und hervorragenden Arztes gemacht haben zu dürfen. Er wird mir, ebenso wie die großartige Asthma- und Allergie-Lehrerin Frau Prof. Dr. Erika von Mutius, bei der ich „über die Schulter“ sehen durfte, stets ein Vorbild sein.

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Forschungszentrum Kubus und seine stetige Unterstützung der Forschung, auch der jungen Ärzte, am Dr. von Haunerschen Kinderspital danke ich Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt.

Besonderer Dank für viele fruchtbare Diskussionen sowie die Hilfe bei der statistischen Auswertung gebührt Herrn David Carr und Herrn Martin Depner.

Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe Allergogenetik meinen Dank für die freundschaftliche Hilfe und Kollegialität aussprechen. An dieser Stelle sind insbesondere Frau Dr. Michaela Schedel, Herr Dr. Michael Kormann und Herr Dr. Wilfried Peters für ihre zuverlässige Unterstützung zu nennen. Für die immer tatkräftige Hilfe bei der technischen Durchführung danke ich Frau Ilona Dahmen und Frau Anja Pleiss.

Ein großer Dank gilt natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich bis zum Schluss der Arbeit auf vielerlei Weise unterstützend begleitet haben.

Für die liebevolle Kraft und vielgestaltige Unterstützung, die mir meine Frau Barbara bei der Durchführung dieser Arbeit hat zukommen lassen, will ich an dieser Stelle nur ein Wort finden: Huba.

## 7.11. Lebenslauf

Name: Bernd Martin Woitsch

Geburtsdatum, -ort: 25.11.1971, München

Nationalität: deutsch

Adresse: Lackerbauerstraße 28, 81241 München

Schulische Ausbildung: 1978-1982 Grundschule München-Pasing  
1982-1986 Carl-Spitzweg-Realschule München  
1986-1988 Friedrich-Oberlin-Fachoberschule München

Berufliche Ausbildung: 1992 Anerkennung zum Rettungsassistenten

Studium der Sozialpädagogik: 1991-1996 Fachhochschule München  
Abschlussnote 1.3

Diplomarbeit: 1996 „Organisationsformen im Non-Profit-Bereich“

Studium der Humanmedizin: 1998-2004 Ludwig-Maximilians-Universität München  
15.06.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
01.10.2004 Approbation als Arzt  
seit Oktober Assistenzarzt am Dr. von Haunerschen  
2004 Kinderspital der Universität München