

Analyse von Asthma-Kandidatengenenen in der humanen chromosomalen Region 12q

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Gabriele Dütsch
aus München
September 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 16. September 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Februar 2009

Die Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. Thomas Illig, Institut für Epidemiologie, Helmholtz-Zentrum München.

Prüfungsausschuss:	Vorsitz:	Prof. Dr. Charlotte Förster, Universität Regensburg
	1. Prüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly, Universität Regensburg
	2. Prüfer:	PD Dr. Thomas Illig, Helmholtz-Zentrum München
	3. Prüfer:	Prof. Dr. Gernot Längst, Universität Regensburg

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 1999 bis Juni 2002 am Institut für Epidemiologie des Helmholtz-Zentrums München unter Anleitung von PD Dr. Thomas Illig durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	5
ABSTRACT	7
1. EINLEITUNG	9
1.1 <i>Asthma bronchiale</i> – Epidemie des 21. Jahrhunderts	9
1.2 Definition von <i>Asthma bronchiale</i>	10
1.3 Klassifizierung von <i>Asthma bronchiale</i>	11
1.3.1 Ätiologie	11
1.3.2 Klinische Schweregrade	12
1.4 Mechanismen des allergischen (atopischen) <i>Asthma bronchiale</i>	14
1.4.1 Sensibilisierung	14
1.4.2 Frühe Phase der allergischen Reaktion (Sofortreaktion)	15
1.4.3 Späte Phase der allergischen Reaktion	16
1.4.4 Das Th1/Th2 - Gleichgewicht	19
1.5 Genetik von <i>Asthma bronchiale</i>	21
1.5.1 <i>Asthma bronchiale</i> als komplexe (multifaktorielle) Erkrankung	21
1.5.2 Methoden zur Identifizierung prädisponierender Gene für Asthma	24
1.5.2.1 Kandidatengenanalyse	24
1.5.2.2 Genomweite Suchen	25
1.5.2.2.1 Genomweite Kopplungsstudien	25
1.5.2.2.2 Genomweite Assoziationsstudien	27
1.5.3 Die chromosomale Kopplungsregion 12q	28
1.5.4 Asthma-Kandidatengene in der chromosomalen Region 12q13-q24	31
1.5.4.1 <i>NOS1</i> als Asthma-Kandidatengen	31
1.5.4.2 <i>STAT6</i> als Asthma-Kandidatengen	32
1.5.4.3 <i>NAB2</i> als Asthma-Kandidatengen	33
1.5.4.4 <i>IGF1</i> als Asthma-Kandidatengen	34
1.5.4.5 <i>LTA4H</i> als Asthma-Kandidatengen	35
1.6 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	37
2. PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN	38
2.1 Probanden	38
2.1.1 ECRHS-Studie	38
2.1.2 KORA S4-Studie	38
2.1.3 Asthma-Familienstudie	39
2.1.3.1 Studiendesign und Auswahlkriterien	39
2.1.3.2 Phänotypisierung der Studienteilnehmer	40
2.2 Material	41
2.2.1 Geräte	41
2.2.2 Oligonukleotide (Primer)	42
2.2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	42
2.2.4 Reagentien, Lösungen und Puffer	42
2.2.4.1 Reagentien, Lösungen und Puffer für die PCR	42
2.2.4.2 Reagentien, Lösungen und Puffer für die Sequenzierung bzw. Fragmentanalyse	43
2.2.4.3 Reagentien, Lösungen und Puffer für MALDI-TOF Massenspektrometrie	43

2.2.4.4 Reagentien, Lösungen und Puffer für RFLP-Analysen (Restriktionsverdau)	43
2.2.4.5 Reagentien, Lösungen und Puffer für die DNA Gelelektrophorese	44
2.2.5 Längenstandards für DNA Agarosegele	44
2.2.6 Längenstandards für die Fragmentanalyse (Genescan)	44
2.2.7 Reaktionskits	44
2.2.7.1 Reaktionskits für die Gewinnung von DNA aus Vollblut	44
2.2.7.2 PCR-Aufreinigungskits	44
2.2.7.3 Sequenzierkits	44
2.2.7.4 Reaktionskits für MALDI-TOF Massenspektrometrie	45
2.2.7.5 Reaktionskits für die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	45
2.2.8 Enzyme	45
2.2.8.1 Polymerasen	45
2.2.8.2 Restriktionsenzyme für RFLP-Analysen	45
2.2.8.3 Enzyme für MALDI-TOF Massenspektrometrie	45
2.2.9 Verwendete Computerprogramme	45
2.2.9.1 Computerprogramme für Pipettierroboter	45
2.2.9.2 Computerprogramme für MALDI-TOF Massenspektrometrie	46
2.2.9.3 Computerprogramme für Sequenzierung und Fragmentanalyse	46
2.2.9.4 Computerprogramme für Primerkonstruktion, Analyse genomischer DNA-Sequenzen, Sequenzalignments	46
2.2.9.5 Computerprogramme für Datenverwaltung und statistische Analysen	46
2.2.10 Verwendete Internet-Datenbanken	47
2.3 Methoden	47
2.3.1 Molekularbiologische Methoden	47
2.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut	47
2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung genomischer DNA	47
2.3.1.3 Pooling genomischer DNA aus der KORA S4-Studie	48
2.3.1.4 Konstruktion von Primern (Oligonukleotide)	49
2.3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
2.3.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Fragmenten mit Agarosegelen	50
2.3.1.7 Aufreinigung von PCR-Fragmenten	51
2.3.1.8 Extraktion von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen	51
2.3.1.9 Enzymatischer Verdau von PCR-Fragmenten (Restriktionsverdau)	51
2.3.1.9.1 <i>Dra</i> III-Restriktionsverdau	52
2.3.1.9.2 <i>Ava</i> I-Restriktionsverdau	52
2.3.1.10 Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Fragmenten	53
2.3.1.10.1 Sequenzierung mit dem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	53
2.3.1.10.2 Sequenzierung mit dem CEQ 2000 Sequenzierer	54
2.3.1.11 Sequenzalignment zum Auffinden von SNPs	54
2.3.1.12 Fragmentanalyse	55
2.3.1.13 Genotypisierung von SNPs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	56
2.3.1.13.1 Prinzip der MALDI-TOF Massenspektrometrie	57
2.3.1.13.2 Primer-Verlängerungs-Reaktion (Primer-Extension)	58
2.3.1.13.2.1. PROBE TM -Reaktion („primer oligo base extension reaction“)	59
2.3.1.13.2.2. hME- („homogeneous MassEXTEND TM “) Methode	63
2.3.1.13.3 Assay-Design - Konstruktion von PCR- und Extensions-Primern	65
2.3.2 Statistische Methoden	65
2.3.2.1 Überprüfung der Genotypenkonformität innerhalb der Familien - Mendel-Check	65
2.3.2.2 Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)	65
2.3.2.3 Reconstruction-Combined TDT (RC-TDT)	66
2.3.2.4 Quantitativer TDT	67
2.3.2.5 Bestimmung von Haplotypen	68
2.3.2.6 Assoziation von Haplotypen mit den quantitativen Merkmalen	68
2.3.2.7 Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts zwischen SNPs („pairwise linkage disequilibrium“; pairwise LD)	69
3. ERGEBNISSE	70
3.1 Analyse des humanen <i>NOS1</i>-Gens	70
3.1.1 Validierung der <i>NOS1</i> -SNPs in der Asthma-Familienstudie	70
3.1.2 Genotypisierung der <i>NOS1</i> -SNPs in der Asthma-Familienstudie	71

3.1.3 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen	73
3.2 Analyse des humanen <i>STAT6</i>-Gens	76
3.2.1 Identifizierung von SNPs im humanen <i>STAT6</i> -Gen	76
3.2.2 Genotypisierung der <i>STAT6</i> -SNPs in der Asthma-Familienstudie	77
3.2.3 Statistische Auswertung der SNPs des humanen <i>STAT6</i> -Gens.....	83
3.2.3.1 Kopplungs- und Assoziationsanalysen	83
3.2.3.2 Haplotypenanalyse.....	86
3.2.4 Analyse des GT-Repeats in Exon 1 des humanen <i>STAT6</i> -Gens	87
3.2.4.1 Genotypisierung des GT-Repeats in der Asthma-Familienstudie	87
3.2.4.2 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen.....	88
3.3 Analyse des humanen <i>NAB2</i>-Gens	92
3.3.1 Genotypisierung von <i>NAB2</i> -SNPs in der Asthma-Familienstudie.....	92
3.3.2 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen	94
3.4 Analyse des humanen <i>IGF1</i>-Gens	99
3.4.1 Validierung von <i>IGF1</i> -SNPs in der KORA S4-Studie	99
3.4.2 Genotypisierung der <i>IGF1</i> -SNPs in der Asthma-Familienstudie	100
3.4.3 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen	104
3.5 Analyse des humanen <i>LTA4H</i>-Gens	107
3.5.1 Validierung von SNPs des humanen <i>LTA4H</i> -Gens	107
3.5.2 Genotypisierung der <i>LTA4H</i> -SNPs in der Asthma-Familienstudie	108
3.5.3 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen	111
4. DISKUSSION	114
4.1 Analyse des humanen <i>NOS1</i>-Gens	114
4.1.1 <i>NOS1</i> -SNPs zeigen keine Assoziation mit Asthma und Asthma-assoziierten Phänotypen	114
4.2 Analyse des humanen <i>STAT6</i>-Gens	116
4.2.1 Die kodierende Region des humanen <i>STAT6</i> -Gens ist hoch konserviert.....	116
4.2.2 SNPs in der 3'UTR von <i>STAT6</i> zeigen eine schwache Assoziation mit Asthma-assoziierten Phänotypen	118
4.2.3 Verschiedene Studien zeigen unterschiedliche Assoziationsergebnisse - eine Analyse am Beispiel zweier SNPs in der 3'UTR von <i>STAT6</i>	119
4.2.4 Ein SNP in der 3'UTR von <i>STAT6</i> zeigt eine schwache Assoziation mit einem erhöhten SLOPE	122
4.2.5 Polymorphismen in der 3'UTR von Genen können die Regulation der Genexpression beeinflussen....	122
4.2.6 Intronsche <i>STAT6</i> -SNPs sind mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel assoziiert	123
4.2.7 <i>STAT6</i> In2SNP3 ist inmitten einer NF-κB-Bindestelle lokalisiert.....	125
4.2.8 <i>STAT6</i> -Haplotypen zeigen keine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel.....	126
4.2.9 <i>STAT6</i> -Haplotypen in anderen Assoziationsstudien.....	128
4.2.10 Ein GT-Repeat in Exon 1 des humanen <i>STAT6</i> -Gens ist hoch polymorph.....	130
4.2.11 Die Assoziationsergebnisse des <i>STAT6</i> -Dinukleotidrepeats im Vergleich zu anderen Studien	131
4.2.12 Der GT-Repeat in Exon 1 beeinflusst die Promotoraktivität von <i>STAT6</i>	133
4.3 Analyse des humanen <i>NAB2</i>-Gens	135
4.3.1 <i>NAB2</i> als unmittelbarer Nachbar von <i>STAT6</i> - ein Interpretationsversuch der <i>NAB2</i> -Assoziationsergebnisse	135
4.4 Analyse des humanen <i>IGF1</i>-Gens	137
4.4.1 Ein SNP in Intron 5 des humanen <i>IGF1</i> -Gens ist mit Asthma assoziiert	137
4.4.2 <i>IGF1</i> -Polymorphismen und IGF1-Spiegel	138
4.5 Analyse des humanen <i>LTA4H</i>-Gens	140
4.5.1 Die kodierende Region des humanen <i>LTA4H</i> -Gens ist hoch konserviert.....	140
4.5.2 Ein SNP in Intron 3 von <i>LTA4H</i> ist mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel assoziiert.....	141
4.5.3 <i>LTA4H</i> -Polymorphismen beeinflussen den Gesamt-IgE-Spiegel - ein möglicher Mechanismus.....	143
4.6 Abschlussbetrachtung	145

5. LITERATURVERZEICHNIS	146
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	167
7. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	169
8. DANKSAGUNG	170
9. ERKLÄRUNG	171
10. ANHANG.....	172
10.1 NOS1-Primer	172
10.1.1 PCR-Primer	172
10.1.2 Sequenzierprimer	172
10.2 STAT6-Primer.....	173
10.2.1 PCR-Primer für die Suche nach Polymorphismen.....	173
10.2.2 Sequenzierprimer	175
10.2.3 Primer für die Analyse des GT-Repeats	177
10.2.3.1 PCR-Primer.....	177
10.2.3.2 Sequenzierprimer	177
10.3 MALDI-TOF-Primer	178
10.3.1 PCR-Primer für die PROBE TM -Reaktion.....	178
10.3.2 Extensions-Primer.....	180
10.3.3 PCR-Primer für die hME-Methode.....	182

Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der unteren Atemwege und stellt in den Industrienationen mittlerweile eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter dar. Neben Umweltfaktoren, Alter, Geschlecht und Lebensstil, spielen auch genetische Faktoren in der Asthma-Pathogenese eine Rolle, weshalb es in die Kategorie der komplexen (multifaktoriellen) Erkrankungen eingeordnet wird. Genetische Kopplungsstudien identifizierten die chromosomale Region 12q13-q24 als eine der häufigsten Kopplungsregionen für Asthma und Asthma-assoziierte Phänotypen in verschiedenen ethnischen Populationen. Auch in der, dieser Arbeit zugrunde liegenden, deutschen Asthma-Familienstudie („affected sib-pair“-Design) konnten in einer genomweiten Suche (Grobkartierung) mit anschließender Feinkartierung für mehrere Mikrosatellitenmarker in der Region 12q13-q24 Kopplung mit Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen wie erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und bronchiale Hyperreaktivität (BHR) nachgewiesen werden. Die chromosomale Region 12q13-q24 beherbergt eine ganze Reihe von Genen, die aufgrund ihrer biologischen Funktion als Asthma-Kandidatengene in Frage kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun Polymorphismen in fünf dieser Kandidatengene in der deutschen Asthma-Familienstudie auf Assoziation mit Asthma und Asthma-assoziierten Phänotypen untersucht. Sowohl aufgrund ihrer biologischen Funktion als auch basierend auf den Ergebnissen der Grob- und Feinkartierung der deutschen Asthma-Familienstudie fiel die Wahl auf die Asthma-Kandidatengene *NOS1* (neuronale Stickstoffmonoxidsynthase), *STAT6* („signal transducer and activator of transcription 6“), *NAB2* (NGFI-A-Bindeprotein 2), *IGF1* („insulin-like growth factor 1“, insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1) und *LTA4H* (Leukotrien A4-Hydrolase).

Im Rahmen der *NOS1*-Analyse wurden dabei insgesamt zwei SNPs („single-nucleotide polymorphisms“) analysiert, die jedoch mit keinem der untersuchten Phänotypen assoziiert waren.

Die Analyse des humanen *STAT6*-Gens hingegen, umfaßte 13 SNPs und einen GT-Dinukleotidrepeat in der 5'UTR. Dabei konnte für drei intronische SNPs und einen SNP in der 3'UTR in den Einzelanalysen eine schwache bzw. moderate Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel nachgewiesen werden ($p=0,0200$; $p=0,0260$; $p=0,0280$ und $p=0,0070$). Ein zweiter SNP in der 3'UTR zeigte eine schwache Assoziation mit dem Lungenfunktionsparameter SLOPE ($p=0,0370$). Die stärkste Assoziation wurde jedoch zwischen Allel 4 (16xGT) des GT-Repeats und einer erhöhten Eosinophilenzellzahl beobachtet ($p=0,0010$). Für das Merkmal Asthma dagegen wurden keine Assoziationen

gefunden. Auch war keiner der insgesamt fünf, getesteten *STAT6*-Haplotypen mit einem der untersuchten Merkmale assoziiert.

Für das humane *NAB2*-Gen konnten insgesamt vier SNPs in der Asthma-Familienstudie validiert werden, von denen ein intronischer eine schwache Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel zeigte ($p=0,0390$ bzw. $p=0,0300$). Eine schwache Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel zeigte auch ein intronischer *LTA4H*-SNP ($p=0,0220$ bzw. $p=0,0210$). Weitere Assoziationen konnten für diese beiden Gene jedoch nicht gefunden werden.

Im Gegensatz dazu zeigte von insgesamt fünf, analysierten *IGF1*-SNPs in der Asthma-Familienstudie keiner eine Assoziation mit den Asthma-assoziierten Phänotypen. Für das Merkmal Asthma dagegen konnte eine signifikante Assoziation mit einem SNP in Intron 5 von *IGF1* beobachtet werden ($p=0,0363$ bzw. $p=0,0046$).

Aufgrund der, in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann nun spekuliert werden, dass die Produkte der Gene *STAT6*, *NAB2* und *LTA4H* in Mechanismen involviert sind, die zu einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel bzw. einer Eosinophilie führen, IGF1 dagegen eher eine Rolle in dem als „airway remodeling“ bezeichneten Prozeß zu spielen scheint, einem Merkmal von chronischem Asthma.

Abstract

Bronchial asthma is a chronic inflammation of the lower airways and represents one of the most common chronic childhood diseases in developed nations. Besides environmental factors, age, gender and life-style, genetic factors are also involved in the pathogenesis of the disease. Therefore, asthma is considered to be a complex (multifactorial) disease. Many genetic linkage-studies have identified the chromosomal region 12q13-q24 as one of the most common regions linked to asthma and asthma-related phenotypes. Using a genome-wide scan following a fine-mapping study, linkage of this chromosomal region to asthma and asthma-related phenotypes like increased total serum IgE-levels, increased eosinophil cell count or bronchial hyperresponsiveness (BHR) has also been found in a German asthma-family-study ("affected sib-pair"-design). The chromosomal region 12q13-q24 harbours a lot of candidate genes for asthma. As part of this thesis, polymorphisms in five of these genes have been analysed for association with asthma and asthma-related phenotypes in the German asthma-family-study. Both, due to their biological function and the data from the genome-wide scan and the fine-mapping of the German asthma-family-study, the following candidate genes have been selected: *NOS1* (neuronal nitric oxide synthase), *STAT6* (signal transducer and activator of transcription 6), *NAB2* (NGFI-A binding protein 2), *IGF1* (insulin-like growth factor 1) and *LTA4H* (leukotriene A4 hydrolase).

In the context of the *NOS1*-analysis, two SNPs (single-nucleotide polymorphisms) were analysed which did not show any association with one of the examined phenotypes.

For the *STAT6*-gene, a total of 13 SNPs as well as a GT-dinucleotide repeat in the 5'UTR were analysed. Three intronic SNPs and one SNP in the 3'UTR of the gene showed a weak or moderate association to increased total serum IgE-levels ($p=0.0200$; $p=0.0260$; $p=0.0280$ and $p=0.0070$). A second SNP in the 3'UTR showed a weak association to the lung function parameter SLOPE ($p=0.0370$). However, the strongest association was found between allele 4 (16xGT) of the GT-repeat and an increase in eosinophil cell count ($p=0.0010$). For asthma, no associations could be detected. Additionally, none of the five tested *STAT6*-haplotypes was associated with one of the examined phenotypes.

For the human *NAB2*-gene, four SNPs could be validated in the German asthma-family-study. One of these SNPs, an intronic one, was weakly associated to increased total serum IgE-levels ($p=0.0390$; $p=0.0300$). A weak association to increased total serum IgE-levels was also found for an intronic *LTA4H*-SNP ($p=0.0220$; $p=0.0210$). Other associations were not found for these two genes.

In contrast to these findings, none of the five validated *IGF1*-SNPs, was associated with any of the asthma-associated phenotypes. However, a significant association was found between a SNP in intron 5 of *IGF1* and asthma ($p=0.0363$; $p=0.0046$).

Due to these results it can be speculated that the products of the genes *STAT6*, *NAB2* and *LTA4H* are involved in mechanisms leading to an increase of the total serum IgE-level or eosinophilie, whereas IGF1 seems to play a role in the process of so-called "airway remodeling", a feature of persistent asthma.

1. Einleitung

Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegserkrankung, an deren Entstehung genetische Faktoren (genetische Prädisposition) ebenso beteiligt sind wie Umwelteinflüsse, weshalb es in die Kategorie der komplexen (multifaktoriellen) Erkrankungen eingeordnet wird (Barnes und Marsh, 1998; Barnes K.C., 1999; Cookson, 1999).

Durch die steigende Anzahl an Asthmaerkrankungen (vgl. Abschnitt 1.1) hat die Ursachenerforschung dieser Krankheit in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen. Bis vor wenigen Jahren beschränkte sich die Asthmaforschung im Wesentlichen auf die Untersuchung der, an der Entstehung der Krankheit, beteiligten Umweltfaktoren. Neue molekularbiologische Hochdurchsatz-Technologien („High-Throughput“-Techniken), die eine schnelle und effiziente Genotypisierung von DNA-Polymorphismen in epidemiologischen Studien ermöglichen, in Verbindung mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Venter et al., 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) haben nun auch die Aufklärung der genetischen Ursachen von Asthma in Reichweite gebracht.

Die Identifizierung von genetischen Risikofaktoren könnte nicht nur zu einem besseren Verständnis der komplexen Ätiologie und Pathophysiologie von *Asthma bronchiale* führen. Sie bietet auch die Möglichkeit für die Entwicklung neuer Präventiv- und Therapiemaßnahmen.

1.1 *Asthma bronchiale* – Epidemie des 21. Jahrhunderts

Epidemiologische Studien konnten in den letzten Jahrzehnten einen weltweiten Anstieg der Asthma-Prävalenzen (Zahl der diagnostizierten Erkrankungen) verzeichnen (Jarvis und Burney, 1998; Anderson und Cookson, 1999). Mit mehr als 155 Millionen betroffener Menschen hat diese Krankheit in den Industrienationen bereits epidemiologische Ausmaße erreicht (Cookson, 1999). Zwar kann sich Asthma in jedem Lebensalter manifestieren, am häufigsten tritt es jedoch im Kindesalter auf (Dodge und Burrows, 1980; Burr, 1993). Mit einer Prävalenz von 10% ist Asthma in dieser Altersklasse mittlerweile die häufigste chronische Erkrankung (Asher et al., 1995; Anderson und Cookson, 1999) und damit eine der Hauptursachen für Klinikaufenthalte und Schulversäumnisse.

Asthma und andere allergische Erkrankungen treten dabei keineswegs dort besonders häufig auf, wo die Luft erkennbar verschmutzt ist, wie in verschiedenen, nach der Grenzöffnung durchgeführten, deutsch-deutschen Vergleichsstudien festgestellt werden konnte (von Mutius et al., 1992 und 1994; Nowak et al., 1996; Heinrich et al., 1998; Filipiak et al., 2001). Die Ergebnisse dieser und anderer Studien (Bjorksten et al., 1998) lassen vermuten, dass der

Anstieg der Prävalenzen von Asthma und anderen allergischen Erkrankungen auf Faktoren zurückzuführen sind, die mit einem „westlichen Lebensstil“ verbunden sind (von Mutius et al., 1992; Wichmann, 1996). Als mögliche Ursachen werden unter anderem eine gesteigerte Exposition gegenüber Innenraumallergenen, insbesondere der Hausstaubmilbe, sowie eine Verminderung an bakteriellen und parasitären Infekten aufgrund übertriebener Hygiene („Urwaldhypothese“) kontrovers diskutiert (Cookson und Moffatt, 1997; Ring, 1997; Shirakawa et al., 1997; Rückblick zur Urwaldhypothese in: von Mutius, 2007).

1.2 Definition von *Asthma bronchiale*

Für genetische Studien ist eine genaue Definition des asthmatischen Phänotyps von höchster Wichtigkeit. Allerdings existiert bis heute keine klar umrissene, allgemein akzeptierte Definition von *Asthma bronchiale* (Holgate et al., 1991; Wjst et al., 1997; Wjst, 1999b). Dies liegt mitunter an den verschiedenen klinischen Erscheinungsformen (Phänotypen) und variablen Schweregraden mit denen diese Krankheit auftritt (Wjst, 1999b). Die Anamnese kann stark von Patient zu Patient variieren und die Symptome können vorübergehend sein, periodisch (in bestimmten Abständen) auftreten oder persistieren (dauerhaft anhalten) (Fireman, 2003). Daher stellen die gängigen „Definitionen“ eher Syndrombeschreibungen dar. Die globale Initiative für Asthma, kurz GINA, und das „National Heart, Lung and Blood Institute“ beschreiben Asthma demnach wie folgt¹:

Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der unteren Atemwege bei der eine Vielzahl von Zellen und zellulären Faktoren eine Rolle spielen, insbesondere Mastzellen, Eosinophile, T-Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophile und epitheliale Zellen. Bei anfälligen Personen verursacht diese Entzündung rezidivierende (wiederkehrende) Asthmaanfälle, die durch Symptome wie Keuchen, Husten, Atemnot, pfeifende und rasselnde Atemgeräusche, Aushusten von zähem Schleim sowie einem Engegefühl im Brustkorb, gekennzeichnet sind und vor allem nachts und in den frühen Morgenstunden auftreten. Diese Asthmaanfälle gehen üblicherweise einher mit einer ausgedehnten, aber variablen Atemwegsobstruktion (Verengung der Atemwege), die oftmals reversibel ist, entweder spontan oder infolge einer Medikation. Die Entzündung bewirkt auch eine assoziierte Zunahme einer bestehenden bronchialen Hyperreaktivität („bronchial hyperresponsiveness“, kurz BHR) gegenüber einer Reihe von exogenen und endogenen Stimuli.

¹ aus „Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma“, National Heart, Lung and Blood Institute, 1997 und „GINA Workshop Report“, Kapitel 1; GINA, 2002

1.3 Klassifizierung von *Asthma bronchiale*

Eine Klassifizierung von *Asthma bronchiale* kann sowohl nach ätiologischen Gesichtspunkten als auch nach klinischen Schweregraden erfolgen.

1.3.1 Ätiologie

Aus ätiologischer Sicht wird im Allgemeinen zwischen dem allergischen (atopischen) und dem nicht-allergischen Asthma sowie Mischformen (gemischtes Asthma) unterschieden (Gemsa et al., 1997).

Das rein allergische Asthma, auch als rein atopisches Asthma bezeichnet, beruht zumeist auf einer Sensibilisierung gegenüber luftgetragenen Allergenen und wird in der Regel durch eine in den Bronchien ablaufende IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I (Soforttyp) ausgelöst (Janeway und Travers, 1997; Kapitel 11). Es tritt normalerweise in Zusammenhang mit einer Allergenexposition auf (Gemsa et al., 1997). Die Symptome können dabei saisonal sein, wenn es sich bei dem Allergen um z. B. Pollen handelt, oder ganzjährig auftreten, wenn es sich um häusliche Allergene handelt (z.B. Hausstaubmilben, Schimmelpilze etc.) (Gemsa et al., 1997). Allergisches (atopisches) Asthma manifestiert sich am häufigsten im Kindes- und Jugendlichenalter, wobei die Betroffenen oft noch weitere atopische Erkrankungen wie atopisches Ekzem oder Rhinitis aufweisen (Ukena und Sybrecht, 1999; Johansson et al., 2001). Auch findet sich häufig eine positive Familienanamnese für atopische Krankheiten (Gemsa, 1997; Ukena und Sybrecht, 1999).

Unter dem Begriff Atopie (griech. „atopos“ = ungewöhnlich) werden dabei alle Krankheiten allergischen Charakters zusammengefaßt, bei denen ein Individuum aufgrund einer genetischen Prädisposition dazu neigt, auf minimale Konzentrationen natürlicher Allergene mit einer IgE-vermittelten Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I zu reagieren (Wahn und Wahn, 2000). Neben spezifischen IgE-Antikörpern kann im Serum atopischer Menschen in der Regel auch ein erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel sowie eine stark erhöhte Konzentration von Eosinophilen gemessen werden (Gemsa et al., 1997; Cookson, 2004). Der Gesamt-IgE-Spiegel unterliegt dabei nicht nur temporären Schwankungen, sondern wird auch von Faktoren wie Alter und Geschlecht beeinflusst (Burrows et al., 1981; Dewar und Wheatley, 1996; Sandford et al., 1996). So weisen männliche Individuen in jedem Alter höhere Gesamt-IgE-Spiegel auf als Frauen (Barbee et al., 1981; Jarvis und Burney, 1998). Des Weiteren nimmt der Gesamt-IgE-Spiegel in beiden Geschlechtern ab der Pubertät mit zunehmendem Alter kontinuierlich ab (Barbee et al., 1981; Sandford et al., 1996). Da die Normalwerte für alle Altersklassen < 100 U/ml betragen, ist ein Gesamt-IgE-Spiegel von > 100 U/ml bereits

ein Hinweis auf das Vorhandensein einer Atopie (Spitz et al., 1972). Um festzustellen, ob eine allergische Komponente vorhanden ist, wird in epidemiologischen Studien deshalb neben der Diagnose von Asthma auch der Gesamt-IgE-Spiegel im Serum, die Eosinophilenkonzentration sowie allergen-spezifische IgE-Spiegel bestimmt. Auf die Mechanismen des allergischen (atopischen) Asthmas wird in Abschnitt 1.4 näher eingegangen.

Unter die Kategorie nicht-allergisches Asthma fallen alle Asthmaformen, die keine allergische Komponente aufweisen (Gemsa et al., 1997). Dementsprechend finden sich im Serum betroffener Individuen auch keine allergen-spezifischen IgE-Antikörper; der Gesamt-IgE-Spiegel ist ebenfalls nicht erhöht (Gemsa et al., 1997; Ukena und Sybrecht, 1999). Dagegen ist die Konzentration von Eosinophilen im Blut und Sputum deutlich höher gegenüber derjenigen von allergischen Asthmatikern und unterliegt keinen saisonalen Schwankungen (Ukena und Sybrecht, 1999). Im Gegensatz zum allergischen Asthma manifestiert sich die nicht-allergische Form meistens im Erwachsenenalter und geht häufig mit viralen Atemwegsinfektionen einher (Gemsa et al., 1997). Andere Faktoren wie z. B. Kaltluft, körperliche Anstrengung (Belastungsasthma) oder psychische Faktoren können ebenfalls einen Asthmaanfall auslösen (Gemsa et al., 1997).

Die Mechanismen, die zu einem nicht-allergischen Asthma führen, sind noch weitestgehend unverstanden, obgleich die pathologischen Merkmale und das Wesen der Atemwegsentszündung denjenigen des allergischen Asthmas sehr ähneln (Humbert et al., 1996; Humbert, 2000; Bousquet et al., 2000).

Aufgrund dieser Ähnlichkeiten und des häufigen Auftretens von Mischformen (gemischtes Asthma) wird in neuerer Zeit der Sinn der klassischen Einteilung von Asthma in eine allergische und eine nicht-allergische Form kontrovers diskutiert. Zwar konnte bei über 80% der asthmatischen Kinder eine allergische Komponente nachgewiesen werden, doch nur bei ca. 15%-20% sind Allergien die ausschließliche Ursache der Symptome (Reinhardt, 2000; Gemsa et al., 1997). Der Rest weist eine Mischform aus allergischem und nicht-allergischem Asthma auf.

1.3.2 Klinische Schweregrade

Asthma kann in sehr unterschiedlichen Schweregraden verlaufen. Einzelne Personen können wechselnde Phasen von hoher Krankheitsaktivität und völlig anfallsfreier Zeit aufweisen (Wjst, 1999b). Basierend auf den klinischen Merkmalen, die vor einer Medikation zu beobachten sind, wird Asthma im Allgemeinen in vier klinische Schweregrade eingeteilt, die

in Tabelle 1.1 wiedergegeben sind (GINA, 2002). Die Einteilung erfolgt dabei unabhängig davon, ob eine allergische Komponente vorhanden ist oder nicht und richtet sich im Wesentlichen nach der Anzahl der Asthmaanfälle.

Stufe 1: intermittierendes, periodisch auftretendes Asthma

- Symptome < 1x die Woche; nächtliche Symptome \leq 2x im Monat
- FEV₁ oder PEF \geq 80% des Sollwerts, Variabilität < 20%

Stufe 2: geringer Schweregrad

- Symptome > 1x die Woche, aber < 1x am Tag; nächtliche Symptome > 2x im Monat
- FEV₁ oder PEF \geq 80% des Sollwerts, Variabilität 20%-30%

Stufe 3: mittlerer Schweregrad

- tägliche Symptome, nächtliche Symptome > 1x die Woche
- täglicher Gebrauch von β 2-Sympathomimetikum
- FEV₁ oder PEF 60%-80% des Sollwerts, Variabilität < 30%

Stufe 4: hoher Schweregrad

- tägliche Symptome; regelmäßig nächtliche Symptome
- körperliche Aktivitäten stark eingeschränkt
- FEV₁ oder PEF \leq 60% des Sollwerts, Variabilität > 30%

Tabelle 1.1: Klassifizierung von Asthma nach klinischen Schweregraden (nach GINA, 2002, in vereinfachter Form). FEV₁: „forced expiratory volume in 1 second“; PEF: „peak expiratory flow“. Erklärungen der beiden Parameter siehe Text.

Bei FEV₁ und PEF handelt es sich um Parameter aus dem Bereich der Lungenfunktionstests, die auch in epidemiologischen Studien Anwendung finden. FEV₁ („forced expiratory volume in 1 second“) bezeichnet dabei das nach maximaler Inspiration (Einatmung) ausgeatmete Lungenvolumen in der ersten Sekunde bei forcierter Expiration (Ausatmung) (Boenisch et al., 2003). Dagegen stellt der PEF („peak expiratory flow“, auch Peak-Flow oder expiratorischer Spitzenfluß genannt) die maximale expiratorische Atemstromstärke dar, die nach maximaler Inspiration bei forcierter Expiration erreicht wird (Petro, 1998; Boenisch et al., 2003). Bei einer Atemwegsobstruktion, wie sie für *Asthma bronchiale* charakteristisch ist, sind sowohl die Strömung in den Atemwegen als auch das Lungenvolumen vermindert. Ein Abfall der FEV₁- und PEF-Werte sowie starke tageszeitliche Schwankungen derselben sind demnach ein Hinweis auf das Vorhandensein einer Atemwegsobstruktion bzw. bronchialen Hyperreaktivität (BHR) (Petro, 1998; GINA, 2002). Beide Parameter sind abhängig von Alter, Körpergröße und Geschlecht (Petro, 1998; GINA, 2002; Boenisch et al., 2003).

1.4 Mechanismen des allergischen (atopischen) *Asthma bronchiale*

Untersuchungen ergaben, daß die, bei einem *Asthma bronchiale* auftretende, Atemwegsobstruktion auf vier Arten entsteht. Diese sind: akute Bronchokonstriktion, Anschwellen der Atemwegswände, chronische Bildung von Schleimpfropfen und ein charakteristischer Umbau der Atemwege, ein allgemein als „airway remodeling“ bezeichneter Prozeß (GINA, 2002). Die, diesen pathologischen Veränderungen zugrunde liegenden, Vorgänge sind sehr komplex und umfassen sowohl humorale als auch zelluläre Mechanismen. Da es sich bei den meisten, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Probanden um Kinder mit einer diagnostizierten allergischen Komponente handelt, wird im Folgenden kurz auf die wichtigsten Mechanismen des allergischen *Asthma bronchiale* eingegangen.

1.4.1 Sensibilisierung

Damit luftgetragene Allergene (Aeroallergene) bei atopischen Asthmatikern in den Bronchien eine allergische Reaktion hervorrufen können, bedarf es einer anfänglichen Sensibilisierung gegenüber diesen Allergenen (Janeway und Travers, 1997, Kapitel 11; Holt et al., 1999). Diese entwickelt sich bei einem ersten Kontakt mit dem jeweiligen Allergen (Holgate, 1999; Forster et al., 1999). In sensibilisierten Individuen führt dann ein erneuter Kontakt mit demselben Allergen zu einer allergischen Reaktion (Janeway und Travers, 1997; Kapitel 11). Einer Subgruppe von T-Helferlymphozyten, den sog. Th2-Lymphozyten, und den von ihnen sezernierten Zytokinen kommt dabei eine Schlüsselrolle bei der Lenkung der immunologischen Vorgänge zu (Corry und Kheradmand, 1999; Holt et al., 1999), wie im Folgenden kurz dargestellt.

Aeroallergene werden zunächst einmal von Antigen-präsentierenden Zellen (kurz APCs von „antigen-presenting cells“) in der bronchialen Mucosa (Schleimhaut) aufgenommen, prozessiert und die so entstandenen Peptidfragmente mittels MHC-Klasse II- (MHC II-) Molekülen naiven Th0-Lymphozyten präsentiert (Stirling und Chung, 2000; Abb. 1.1). Bei den APCs handelt es sich primär um dendritische Zellen (Maggi, 1998; Holgate, 1999; GINA, 2002). Durch die Bindung des Antigen-MHC II-Komplexes an den T-Zellrezeptor, in Verbindung mit einem zusätzlichen ko-stimulierenden Signal, welches durch die Interaktion zwischen B7-2 auf der Zelloberfläche der APCs und CD28 auf der Zelloberfläche der Th0-Lymphozyten vermittelt wird, werden die Th0-Lymphozyten aktiviert und differenzieren sich selektiv zu reifen Th2-Gedächtniszellen („klonale Expansion“) (Holt et al., 1999; Stirling und Chung, 2000; Abb. 1.1). Dieser als „priming“ bezeichnete Vorgang hängt maßgeblich von dem Zytokinmilieu ab, in dem er statt findet (Holt et al., 1999). So ist das Vorhandensein des

Zytokins Interleukin 4, IL-4, essentiell für die selektive Differenzierung zu Th2-Lymphozyten und deren Proliferation (Corry und Kheradmand, 1999; Stirling und Chung, 2000; vgl. Abschnitt 1.4.4 und Abb. 1.3). IL-13 scheint diesen Prozess ebenfalls zu begünstigen (Marone, 1998; McKenzie, 2000).

Aktiviert Th2-Lymphozyten sezernieren eine Reihe von Zytokinen wie die Interleukine IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 sowie den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor, kurz GM-CSF (Marone, 1998; Maggi, 1998; Holgate, 1999; Holt et al., 1999; Abb. 1.1 und 1.3). Die wichtigsten Zytokine stellen in diesem Zusammenhang IL-4 und IL-13 dar, die viele biologische Funktionen teilen (McKenzie, 2000). Neben dem bereits erwähnten positiven Einfluss auf die Differenzierung von Th0-Lymphozyten zu Th2-Lymphozyten (vgl. Abschnitt 1.4.4 und Abb. 1.3) ist der wichtigste Effekt dieser Interleukine, in aktivierten B-Zellen (B-Lymphozyten) einen Klassenwechsel („*class-switching*“) zu IgE zu induzieren, was in einer vermehrten Produktion Allergen-spezifischer IgE-Antikörper resultiert (Punnonen et al., 1993; Marone, 1998; Corry und Kheradmand, 1999; Abb. 1.1). Die IgE-Antikörper binden an hoch-affine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von alveolaren Mastzellen (Abb. 1.1), wodurch diese gegenüber dem jeweiligen Aeroallergen sensibilisiert werden (Janeway und Travers, 1997, Kapitel 11; Sly, 2000).

1.4.2 Frühe Phase der allergischen Reaktion (Sofortreaktion)

In sensibilisierten Individuen führt die Inhalation von Aeroallergenen innerhalb weniger Sekunden zu einer allergischen Sofortreaktion (frühe Phase der allergischen Reaktion), der sich in den meisten Fällen eine Spätreaktion (späte Phase der allergischen Reaktion) anschließt (Bousquet et al., 2000; GINA, 2002).

Die allergische Sofortreaktion wird ausgelöst, wenn Aeroallergene allergen-spezifische IgE-Antikörper, welche an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von Mastzellen gebunden sind, quervernetzen (Cookson, 1999; Holt et al., 1999; GINA, 2002; Abb. 1.1). Die so aktivierten Mastzellen schütten eine Reihe vorgefertigter und neu produzierter proinflammatorischer Mediatoren aus wie Histamine, Prostaglandine, Leukotriene (Lipidmediatoren), reaktive Sauerstoffderivate, Heparin sowie eine Reihe proteolytischer und glykolytischer Enzyme wie z. B. die Mastzell-Tryptase (Holgate, 1993 und 1999; GINA, 2002; Abb. 1.1). Die ausgeschütteten Mediatoren induzieren eine schnelle Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur (akute Bronchokonstriktion), welche das charakteristische Symptom der Sofortreaktion darstellt (Holgate, 1993; Bousquet et al., 2000; Abb. 1.1). Dadurch kommt es zu einer Atemwegsobstruktion (Verengung der Atemwege). Die

freigesetzten Mediatoren tragen jedoch auch direkt zu einigen Symptomen der späten Phase der allergischen Reaktion bei, wie verstärkte Schleimproduktion, Erweiterung der Blutgefäße (Vasodilatation) und mikrovaskuläre Lecks (Vignola et al., 1997; Holt et al., 1999; GINA, 2002; Abb. 1.1).

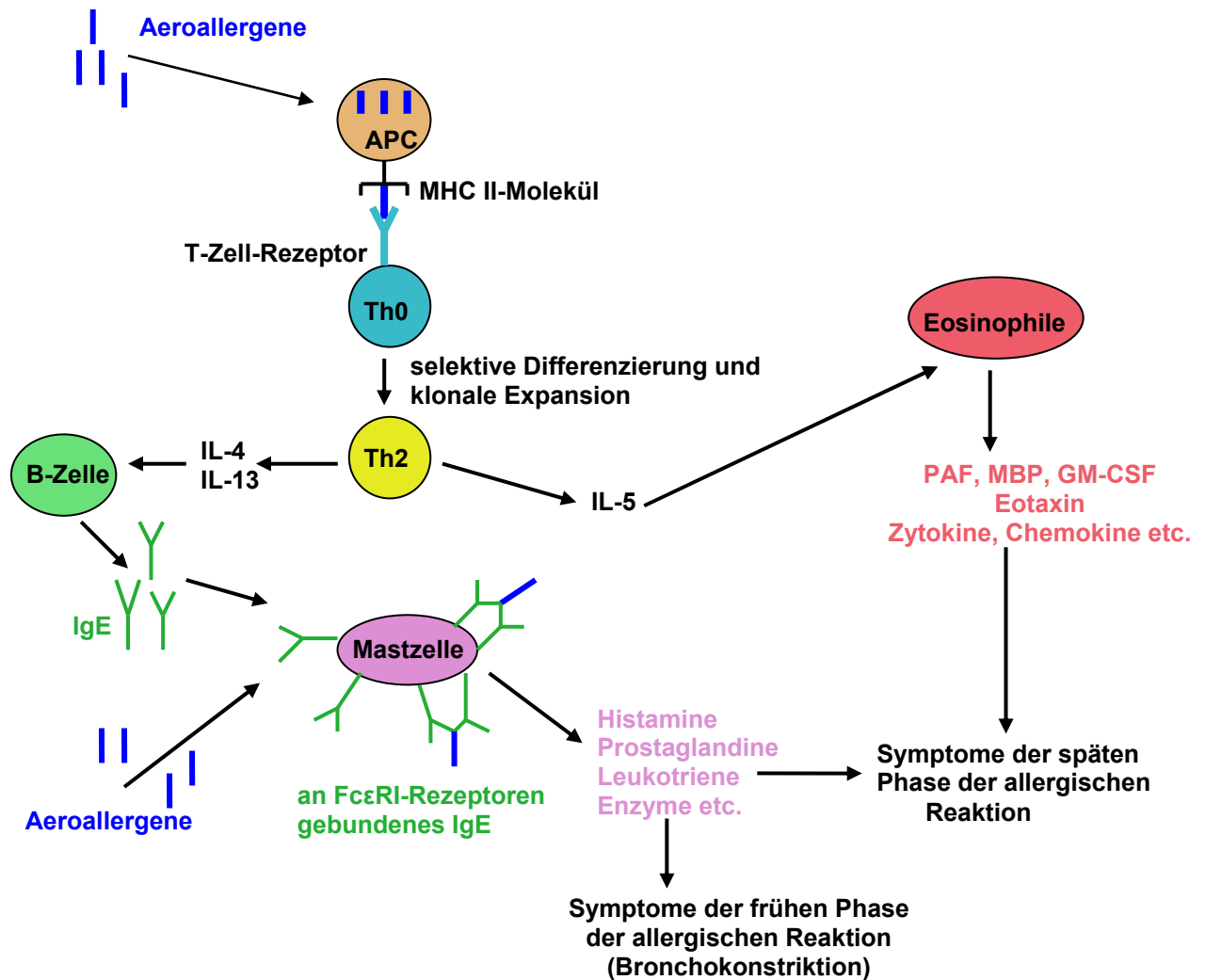


Abbildung 1.1: Mechanismen des allergischen Asthma (nach Holt et al., 1999, in abgewandelter Form). Erklärungen siehe Text, Abschnitt 1.4.1, 1.4.2 und 1.4.3. APC: antigen-präsentierende Zelle. Th0: Th0-Vorläuferzelle, Th0-Lymphozyt. Th2: Th2-Lymphozyt. FcεRI: hochaffiner IgE-Rezeptor auf der Oberfläche von alveolären Mastzellen.

1.4.3 Späte Phase der allergischen Reaktion

Der allergischen Sofortreaktion schließt sich in den meisten Fällen eine allergische Spätreaktion an, die zwischen sechs und neun Stunden nach Allergenprovokation einsetzt (Bousquet et al., 2000; GINA, 2002).

Das charakteristische Merkmal dieser späten Phase der allergischen Reaktion ist die Rekrutierung inflammatorischer Effektorzellen - insbesondere Eosinophile (De Monchy et al., 1985; Holt et al., 1999) und Th2-Lymphozyten (Robinson et al., 1993; Bousquet et al., 2000), aber auch Basophile (Guo et al., 1994), Neutrophile und Makrophagen (Bousquet et al., 2000) - aus dem Blutkreislauf in die Atemwege und deren Aktivierung. Den anfänglichen Trigger für diese frühe Rekrutierung stellt möglicherweise die Ausschüttung spezifischer Mediatoren durch die aktivierten Mastzellen dar (Bradding et al., 1994; Bousquet et al., 2000). Zum Beispiel aktiviert die Mastzell-Tryptase spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von bronchialen Endothel- und Epithelzellen, was zu einer verstärkten Produktion bestimmter Zytokine und der Expression von Adhäsionsmolekülen führt und in der selektiven Rekrutierung von Eosinophilen und Basophilen resultiert (Holgate, 1999).

Eosinophile gelten dabei als Haupt-Effektorzellen, da auch nicht-allergische Asthmatiker eine bronchiale Eosinophilie (erhöhte Eosinophilenzellzahl) aufweisen (Ukena und Sybrecht, 1999; Bousquet et al., 2000; vgl. Abschnitt 1.3.1). Eine erhöhte Anzahl an aktivierten Eosinophilen konnte sowohl in der bronchoalveolaren Lavage-Flüssigkeit (kurz BAL-Flüssigkeit) von Asthmatikern als auch in, aus Bronchoskopen gewonnenem, Lungengewebe nachgewiesen werden. Die Zellzahl korrelierte dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung (Bousquet et al., 1992; Walker et al., 1991).

Aktivierte Eosinophile schütten ein großes Spektrum an Mediatoren aus wie z.B. freie Sauerstoffradikale, Leukotriene, PAF („platelet-activating factor“), MBP („major basic protein“), GM-CSF, Eotaxin, eosinophile Peroxidase aber auch Th2-Zytokine wie IL-4, IL-13 und IL-5 sowie einige Wachstumsfaktoren (GINA, 2002; Fireman, 2003; Cohn et al., 2004; Abb. 1.1). Die Folgen dieser, zunächst akuten, Entzündung sind Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur (Rabe et al., 1994), Beschädigung und Ablösung der bronchialen Epithelzellen (GINA, 2002; Cohn et al., 2004), verstärkte Schleimbildung (GINA, 2002; Cohn et al., 2004), bronchiale Hyperreaktivität (BHR) (Leff, 1994; Fireman, 2003), erhöhte vaskuläre Permeabilität (Collins et al., 1993; GINA, 2002) und Bildung mikrovaskulärer Lecks (GINA, 2002). Eine erhöhte vaskuläre Permeabilität in Verbindung mit mikrovaskulären Lecks führt zu einem Schleimhautödem, was wiederum eine Verdickung der Atemwegswand zur Folge hat (GINA, 2002).

Bei einer länger andauernden, schweren oder chronischen Entzündung kommt es zu charakteristischen strukturellen Veränderungen, die mit einem Umbau der Atemwege, allgemein bekannt als „airway remodeling“, einhergehen. Pathologische Merkmale sind Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen, Vergrößerung der Schleimdrüsen, eine erhöhte Anzahl an Becherzellen sowie eine Verdickung der subepithelialen

Basalmembran (Bousquet et al., 2000; GINA, 2002; Vignola et al., 2003). Letztere wird durch eine massive Ablagerung verschiedener Kollagentypen, Fibronectin und Tenascin in die *lamina reticularis* verursacht, die von dort ansässigen aktivierten Fibroblasten sezerniert werden (Roche et al., 1989; Brewster et al., 1990). Es wird vermutet, daß diese strukturellen Veränderungen eine Ursache für die Entwicklung bzw. Verstärkung einer BHR sind (Holt et al., 1999; Vignola et al., 2003). Ein möglicher Mechanismus könnte eine Veränderung der neuronalen Regulation der glatten Atemwegsmuskulatur infolge des Umbaus sein (Holt et al., 1999).

Neben Eosinophilen spielen aktivierte Th2-Lymphozyten und die von ihnen sezernierten Zytokine eine Schlüsselrolle in der Initiierung, Instrumentation und Aufrechterhaltung der Entzündung (GINA, 2002; Cohn et al., 2004). Als wichtigstes Th2-Zytokin gilt dabei IL-5. Es fördert die Differenzierung und das Wachstum von Eosinophilen, erhöht ihre Überlebenszeit und beschleunigt ihre Rekrutierung in die Atemwege sowie die Expression ihrer Adhäsionsmoleküle (Lopez et al., 1988; Sur et al., 1995; Stirling und Chung, 2000; siehe Abb.1.1).

Die genauen Mechanismen, die zu einer Aufrechterhaltung bzw. Chronifizierung der Entzündung führen sind noch weitestgehend unklar. Es wird postuliert, dass eine repetitive Aktivierung von Th2-Lymphozyten durch eine mehrmalige bzw. ständige Allergenexposition das zentrale Ereignis für die Entwicklung einer chronischen Entzündung darstellt (Holt et al., 1999). Einmal initiiert scheint eine Art „Selbsterhaltungsprozeß“ einzutreten, da auch aktivierte Eosinophile IL-5 sezernieren (Bousquet et al., 2000). Erkenntnissen zufolge sind auch beschädigte Epithelzellen und mucosale Zellen in der Aufrechterhaltung der Entzündung involviert. Sie sezernieren eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren, die ebenfalls zur Rekrutierung und Verlängerung der Lebenszeit der inflammatorischen Effektorzellen beitragen (Levine, 1995; Fireman, 2003).

Eine Übersicht über die komplexen Mechanismen der asthmatischen Entzündung ist in Abbildung 1.2 wiedergegeben.

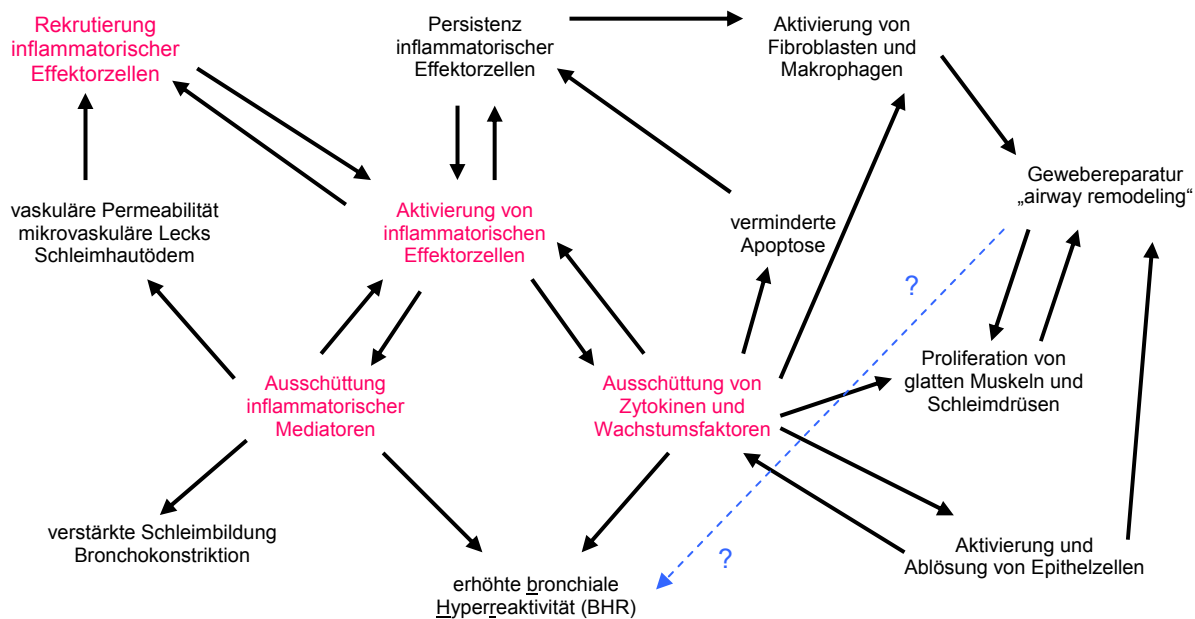


Abbildung 1.2: Mechanismen der akuten und chronischen Entzündung bei Asthma (nach Bousquet, 2000 und GINA, 2002, in abgewandelter Form). Rot: Die Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Effektorzellen als zentrales Merkmal der Entzündung der Atemwege. Blau: „airway remodeling“ als mögliche Ursache für die Entwicklung bzw. Verstärkung einer bronchialen Hyperreaktivität (BHR).

1.4.4 Das Th1/Th2 - Gleichgewicht

Entsprechend ihrer Funktion und des Zytokinprofils, welches sie sezernieren, lassen sich T-Helferlymphozyten in zwei Subtypen von Effektorzellen einteilen: Th1- und Th2-Lymphozyten (Constant und Bottomly, 1997). Th2-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas (vgl. Abschnitt 1.4.1 und 1.4.2) und bei der Bekämpfung extrazellulärer Parasiten (z.B. Helminthen; Locksley, 1994). Dagegen sind Th1-Lymphozyten maßgeblich an der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene (z. B. *Leishmania*) beteiligt (Corry und Kheradmand, 1999; Rengarajan et al., 2000).

Beide Th-Subtypen gehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem Th0-Lymphozyten, hervor (Mosman und Sad, 1996; Romagnani, 1997; Abb. 1.3; siehe auch Abschnitt 1.4.1). Zu welchem Th-Subtyp sich Th0-Vorläuferzellen letztendlich entwickeln, hängt ganz entscheidend von dem Zytokinmilieu ab, das in der unmittelbaren Umgebung der Th0-Lymphozyten zum Zeitpunkt der erstmaligen Präsentation eines Antigens herrscht (Romagnani, 1997; vgl. Abschnitt 1.4.1). So fördert das Vorhandensein von IL-4 die Differenzierung zu Th2-Lymphozyten (Mosmann und Sad, 1996; Romagnani, 1997) und hemmt gleichzeitig die Bildung von Th1-Lymphozyten (Mosmann und Sad, 1996; Romagnani, 1997; Rengarajan et al., 2000; Abb. 1.3). Umgekehrt begünstigen IL-12 und Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) die Differenzierung zu Th1-Lymphozyten und hemmen die Bildung

von Th2-Lymphozyten (Mosmann und Sad, 1996; Romagnani, 1997; Rengarajan et al., 2000; Abb. 1.3). Art und Menge des Antigens, dessen Eintrittsort, die Stärke des Signals durch den T-Zell-Rezeptor (TCR), die Art des ko-stimulierenden Signals und der APC-Typ spielen ebenfalls eine Rolle bei der Entscheidung Th1- oder Th2-Lymphozyt (Constant and Bottomly, 1997; Romagnani, 1997; Corry and Kheradmand, 1999). Die Differenzierung der Th0-Vorläuferzellen zu Th2-Lymphozyten wird demnach durch Allergene wie Pollen, Hausstaubmilben oder Schimmelpilze begünstigt (Holgate, 1999; Corry und Kheradmand, 1999; Abb. 1.3). Bakterielle und virale Infektionen dagegen protegiere die Th1-Differenzierung (Holgate, 1999; Corry und Kheradmand, 1999, Abb. 1.3). Darüberhinaus inhibieren, von reifen Th1-Lymphozyten sezernierte, Zytokine die Differenzierung und Effektorfunktion von Th2-Lymphozyten und umgekehrt (Mosmann und Sad, 1996; Corry und Kheradmand, 1999; Abb. 1.3). So hemmen die Th1-spezifischen Zytokine IL-2 und IFN γ in B-Lymphozyten den Klassenwechsel zu IgE (Pene et al., 1988; Nakanishi et al., 1995), fördern jedoch gleichzeitig die Produktion von IgG2a-Antikörpern (Corry und Kheradmand, 1999; Abb. 1.3).

Ob sich letztendlich ein IgE-vermitteltes allergisches Asthma entwickelt oder nicht hängt demzufolge davon ab, zu welchem Th-Subtyp sich die naiven Th0-Lymphozyten bei erstmaliger Antigenpräsentation hauptsächlich differenzieren. Bei gesunden Personen überwiegt die Differenzierung zu Th1-Lymphozyten, wie Untersuchungen des Zytokinsekregationsmusters ergaben (Holt et al., 1999; Wills-Karp und Ewart, 2004). Dieses Th1/Th2-Gleichgewicht scheint bei atopischen (allergischen) Asthmatikern massiv in Richtung der Differenzierung zu Th2-Lymphozyten verschoben zu sein (Holt et al., 1999; Wills-Karp und Ewart, 2004). Die Schlüsselereignisse, die zu einer bevorzugten Bildung von Th2-Lymphozyten führen, finden anscheinend schon früh im Leben statt, oftmals einige Jahre vor Auftreten der ersten Krankheitssymptome (Holt et al., 1999). So kann das „priming“ (vgl. 1.4.1) der fötalen Th0-Lymphozyten gegen Umweltallergene bereits im Uterus stattfinden, durch den transplazentalen Transport von Allergenen, denen die Mutter während der Schwangerschaft ausgesetzt ist (Holt et al., 1999). Auch wird postuliert, dass der bevorzugten Bildung von Th2-Lymphozyten eine genetische Prädisposition zugrunde liegt (Romagnani, 1997).

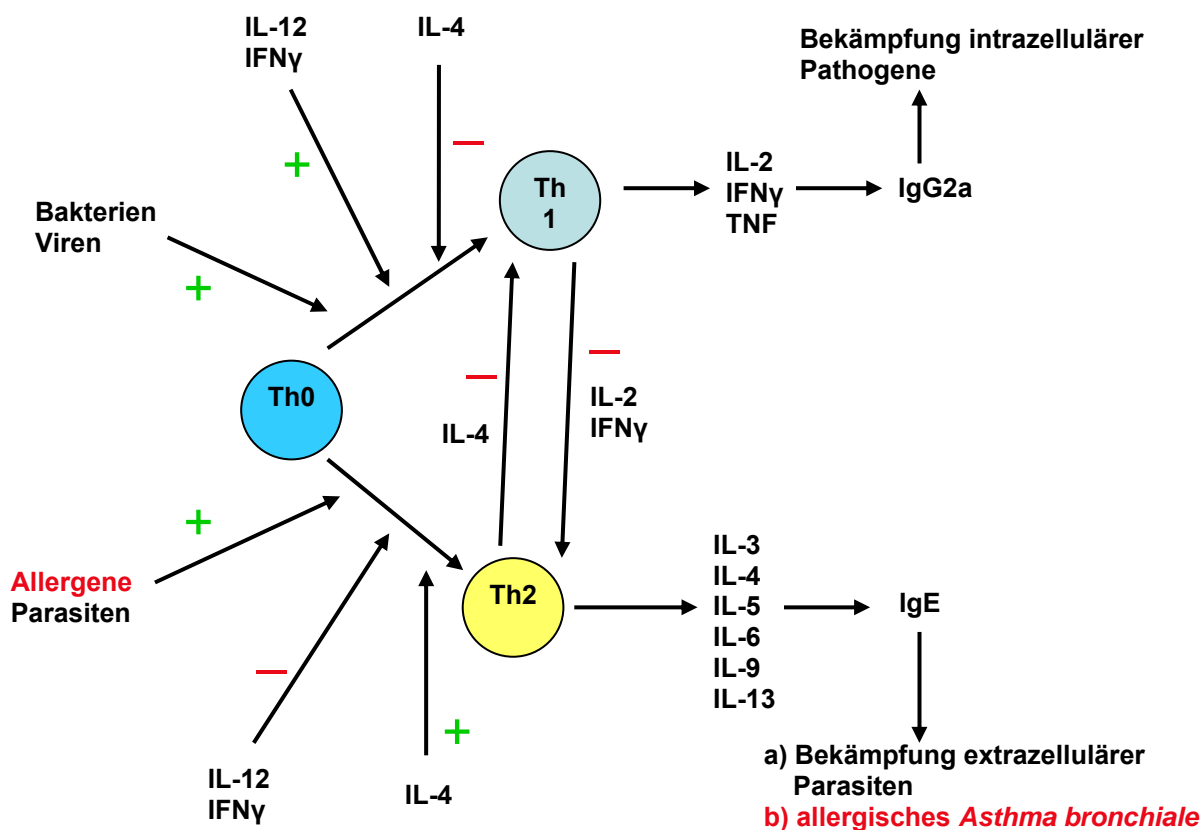


Abbildung 1.3: Übersicht über die Differenzierung von Th0-Lymphozyten (nach Corry und Kheramand, 1999 und Holt et al., 1999, in abgewandelter Form). Grünes Plus: positiver Einfluß auf die Differenzierung. Rotes Minus: Hemmung der Differenzierung. Nähere Erklärungen siehe Text.

1.5 Genetik von *Asthma bronchiale*

1.5.1 *Asthma bronchiale* als komplexe (multifaktorielle) Erkrankung

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts häufen sich die Hinweise auf eine Beteiligung genetischer Komponenten in der Ätiologie von *Asthma bronchiale* und anderen atopischen Erkrankungen (Pionierarbeiten von Drinkwater, 1909; Cooke und van der Veer, 1916).

So handelt es sich bei der Bevölkerung von Tristan da Cunha, einer kleinen isolierten Insel im Südatlantik, um eine isoliert lebende Population mit hohem Inzuchtfaktor (Zamel, 1995; Zamel et al., 1996). Genealogischen Analysen zufolge stammen alle Bewohner der Insel von nur 15 schiffbrüchigen Erstbesiedlern ab, unter denen zwei bis drei Frauen Asthmatikerinnen waren (Zamel, 1995; Zamel et al., 1996). Die hohe Asthmaprävalenz von 23% auf dieser Insel scheint demnach das Ergebnis einer Anreicherung von Asthmagenen zu sein und könnte somit einen Gründereffekt („founder effect“) darstellen (Zamel et al., 1996).

Weiterhin konnte in einer Vielzahl von Familienstudien eine familiäre Häufung von Asthma nachgewiesen werden (Cooke and van der Veer, 1916; Schwartz, 1952; Leigh und Marley, 1967; Sibbald et al., 1980; Burke et al., 2003). Einer Studie zufolge war das Risiko eines Kindes an Asthma zu erkranken um das dreifache erhöht, wenn ein Elternteil Asthmatiker war und stieg auf das sechsfache, wenn beide Elternteile erkrankt waren (Dold et al., 1992; Wjst, 1999b; Illig und Wjst, 2002). Eine für Asthma positive Familienanamnese ist demnach eine der größten Risikofaktoren für eine Erkrankung (Palmer und Cookson, 2000; Burke et al., 2003).

Auch die Ergebnisse einer Reihe von Zwillingsstudien lassen auf die Beteiligung genetischer Faktoren in der Asthma-Ätiologie schließen. So wiesen monozygote Zwillinge in der Regel signifikant höhere Konkordanzraten für Asthma und Asthma-assoziierte Phänotypen wie BHR, erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel und Bluteosinophilie auf, als dizygote Zwillinge (Zusammenfassungen in Koppelman et al., 1999; Wjst, 1999b; Los et al., 2000). Dies konnte sowohl für zusammen als auch für getrennt voneinander aufgewachsene Zwillingspaare gezeigt werden (Hanson et al., 1991).

Im Gegensatz zu monogenen Erkrankungen folgen Asthma und die assoziierten Phänotypen dabei keinem klassischen mendelschen Erbgang (wie dominant, rezessiv, additiv oder geschlechtsgebunden), wie sich aus den Ergebnissen einer Reihe von Segregationsanalysen schließen läßt (Anderson und Cookson, 1999; Sandford und Paré, 2000). Vielmehr sind die unterschiedlichen Asthma-Phänotypen das Ergebnis des Zusammenspiels einer unbekannten Anzahl von Genen (polygene Vererbung) und verschiedener Umweltfaktoren (z.B. Allergene, Virusinfektionen, kalte Luft etc.), sog. Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Wechselwirkungen (Barnes und Marsh, 1998; Halapi und Hakonarson, 2003; Cookson, 2002; siehe Abb. 1.4). Somit zählt *Asthma bronchiale* zu den komplexen (multifaktoriellen) Krankheiten (Barnes und Marsh, 1998; Cookson, 2002 und 2004). In der Regel manifestiert sich die Krankheit immer dann, wenn auf ein genetisch prädisponiertes Individuum bestimmte Umweltfaktoren einwirken. Im Hinblick auf das Manifestationsalter, Schwere der Erkrankung und die Asthma-assoziierten Phänotypen (vgl. Abschnitt 1.3) können dabei Personen gleicher genetischer Prädisposition unterschiedliche Krankheitsformen entwickeln (variable Ausprägung des Phänotyps) (Hoffjan und Ober, 2002). Auch wird von einer genetischen Heterogenität, d.h. unterschiedliche prädisponierende Gene in verschiedenen Familien, ausgegangen (Palmer und Cookson, 2000; Hoffjan und Ober, 2002). Unterschiedliche Asthma-Prävalenzen zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen, die den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt sind, lassen zudem auf ethnische Unterschiede bezüglich der genetischen Prädisposition schließen. So waren in Singapur lebende Chinesen sehr viel seltener an Asthma erkrankt als die

ebenfalls dort lebenden Inder und Malaien (Wjst, 1999b; Ng et al., 2003). Für die unterschiedlichen Asthmaprävalenzen zwischen in den USA lebenden Schwarzen und Weißen ist diese Theorie jedoch umstritten (GINA, 2002).

Unter den prädisponierenden Genen befinden sich sowohl Gene, die an der Pathogenese von Asthma beteiligt sind, als auch solche mit einem sog. protektiven Effekt (Halapi und Hakonarson, 2003). Darüberhinaus steht die Hypothese der Beteiligung von eher wenigen prädisponierenden Genen mit jeweils mäßigem bis großem Effekt der Hypothese der Beteiligung einer Vielzahl von Genen mit jeweils kleinem Effekt gegenüber (Cookson, 1999; Cookson, 2002). Alter, Geschlecht, anatomische Faktoren und Lebensstil scheinen den asthmatischen Phänotyp ebenfalls zu beeinflussen (GINA, 2002; Whittaker, 2003; siehe Abb. 1.4).

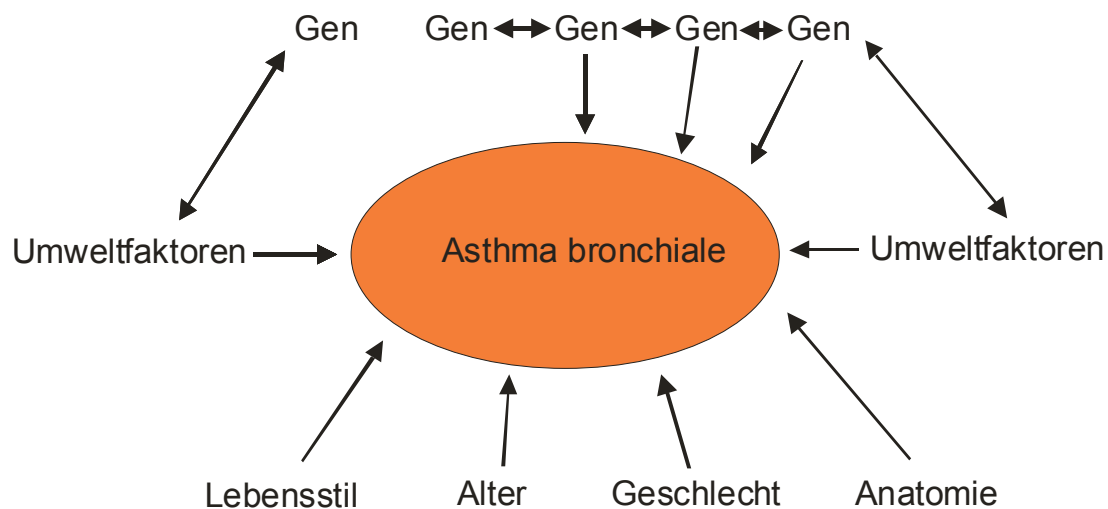


Abbildung 1.4: Asthma als komplexe Erkrankung (nach Whittaker, 2003, in abgewandelter Form).

Abhängig von der jeweiligen Studie liegt die geschätzte Erblichkeit von Asthma zwischen 36% (Nieminen et al., 1991) und 75% (Duffy et al., 1990). Dagegen wird die Erblichkeit für einen erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel auf 50% bis 80% geschätzt (Palmer und Cookson, 2000), diejenige für eine bronchiale Hyperreaktivität (BHR) gegenüber cholinergen Agentien dagegen auf 22% bis 66% (Palmer und Cookson, 2000).

Neben dem komplexen Charakter von Asthma wird die Suche nach prädisponierenden Genen noch durch auftretende unvollständige Penetranzen (genetisch prädisponierte Personen erkranken nicht) sowie eine hohe Phänokopierate (Umwelteinflüsse induzieren einen sehr ähnlichen Phänotyp auch ohne genetische Prädisposition) erschwert (Heinzmann und Deichmann, 2001; Hoffjan und Ober, 2002). Weiterhin legen die Ergebnisse einiger Studien den Verdacht nahe, dass bei der Vererbung von Asthma und den Asthma-assoziierten

Phänotypen maternale Effekte eine Rolle spielen (Cookson et al., 1992; Zusammenfassung in Moffatt und Cookson, 1998a und b). Allerdings bleibt noch zu klären, in wie weit diese Beobachtungen auf genetischem Imprinting beruhen oder schlichtweg das Ergebnis von immunologischen Interaktionen zwischen Fötus und Mutter in der Plazenta bzw. postpartum sind (Anderson und Cookson, 1999; Cookson, 1999).

Hält man sich all diese Erkenntnisse vor Augen, dann gleicht die Suche nach Asthmagenen der berühmten Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Trotzdem konnten in den letzten Jahren mit der Identifizierung von z.B. *ADAM 33* (van Eerdewegh et al., 2002), *PHF11* (Zhang et al., 2003), *DPP10* (Allen et al., 2003), *GPR4* (Laitinen et al., 2004) und, mit dem bisher stärksten Effekt, *ORMDL3* (Moffatt et al., 2007) als prädisponierende Gene für Asthma und Asthma-assoziierte Phänotypen große Erfolge erzielt werden.

1.5.2 Methoden zur Identifizierung prädisponierender Gene für Asthma

Im Rahmen der Suche nach prädisponierenden Genen für Asthma und Asthma-assoziierte Phänotypen wurden zwei unterschiedliche Strategien entwickelt, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.5.2.1 Kandidatengenanalyse

Eine Methode zum Auffinden prädisponierender Gene ist die klassische Kandidatengenanalyse. Diese beinhaltet die Identifizierung von Polymorphismen in bekannten Kandidatengen und deren regulatorischen Bereichen gefolgt von der Genotypisierung dieser Polymorphismen in einer Fall-Kontroll-Studie (Cookson, 1999; Moffatt und Cookson, 1999). Bei einer solchen Studie besteht sowohl die Fallgruppe (erkrankte Probanden) als auch diejenige der Kontrollen (gesunde Probanden) aus genetisch unabhängigen Individuen (populationsbezogene Studie). Ein Vergleich der Häufigkeiten der einzelnen Allele zwischen Fällen und Kontrollen mittels statistischer Tests gibt Auskunft darüber, ob der jeweilige Polymorphismus mit einem bestimmten Phänotyp (Asthma, BHR, etc.) assoziiert ist (Moffatt und Cookson, 1999; Palmer und Cookson, 2001). Dies ist immer dann der Fall, wenn bestimmte Allele und/oder Genotypen in der Fallgruppe signifikant häufiger auftreten als in der Kontrollgruppe. Bei bestehender Assoziation wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem untersuchten Kandidatengen um ein prädisponierendes Gen handelt.

Kandidatengene sind solche Gene, von deren Genprodukten angenommen wird, dass sie aufgrund ihrer biologischen Funktion eine Rolle in der Pathogenese von Asthma spielen

könnten (Moffatt und Cookson, 1998a; Whittaker, 2003). Hierzu zählen z. B. Gene, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Inflammation beteiligt sind, Effektormoleküle, aber auch Gene, die den Gesamt-IgE-Spiegel oder die spezifische IgE-Antwort beeinflussen (Moffatt und Cookson, 1998a; Anderson und Cookson, 1999).

Die klassische Kandidatengenanalyse setzt demnach umfangreiche Kenntnisse über die Pathobiologie von *Asthma bronchiale* voraus. Neue, noch unbekannte, prädisponierende Gene und eventuell damit verbundene neue Pathways können mit dieser Methode jedoch nicht gefunden werden (Cookson, 1999).

Tabellarische Zusammenfassungen der bis 2003 durchgeführten Kandidatengenanalysen finden sich z.B. in Hakonarson und Halapi, 2002; Sengler et al., 2002 sowie Halapi und Hakonarson, 2003.

1.5.2.2 Genomweite Suchen

Als zweite Strategie hat sich die genomweite Suche bewährt. Hierbei wird zwischen genomweiten Kopplungsstudien und genomweiten Assoziationsstudien unterschieden, wie im Folgenden näher erläutert wird.

1.5.2.2.1 Genomweite Kopplungsstudien

Unter einer genomweiten Kopplungsstudie versteht man die systematische Durchsuchung des gesamten humanen Genoms nach sogenannten „chromosomalen Kopplungsregionen“ (Cookson, 2002). Von diesen Regionen wird erwartet, dass sie ein oder mehrere prädisponierende Gene für Asthma und/oder Asthma-assoziierte Phänotypen beinhalten.

Die Identifizierung solcher Kopplungsregionen erfolgt in der Regel mit Hilfe von hochpolymorphen Mikrosatellitenmarkern bekannter chromosomaler Position (Moffatt und Cookson, 1998a; Cookson, 1999), die in einem Abstand von 5-10 cM auf dem jeweiligen Chromosom lokalisiert sind (Holgate, 1999; Barnes, 2000). Nach erfolgter Genotypisierung in einer Familienstudie wird mittels statistischer Tests überprüft, welcher dieser Mikrosatellitenmarker innerhalb von Familien mit Asthma und/oder einem Asthma-assoziierten Phänotyp ko-vererbt wird, d.h. genetisch gekoppelt ist (Holgate, 1999; Palmer und Cookson, 2001). Chromosomale Regionen, in denen ein oder mehrere solcher genetisch gekoppelter Mikrosatellitenmarker lokalisiert sind, werden als „chromosomale Kopplungsregionen“ bezeichnet. Zur weiteren Einengung schließt sich dieser Grobkartierung eine Feinkartierung der bereits identifizierten Kopplungsregionen an (Hoffjan und Ober, 2002; Wills-Karp und Ewart, 2004). Der Abstand der hierfür verwendeten Mikrosatellitenmarker beträgt dann nur noch 1-2 cM (Holgate, 1999).

Genomweite Kopplungsstudien werden in der Regel mit Familien durchgeführt, welche eine Häufung der Krankheit aufweisen (Holgate, 1999). Ein häufig verwendetes Design der Familienstudie ist das sog. „affected sib-pair“-Design (Cookson, 1999; Holgate, 1999). Bei diesem Studiendesign besteht jede Familie aus den jeweiligen Eltern und mindestens zwei erkrankten Kindern (Cookson, 1999; Holgate, 1999; vgl. Abschnitt 2.1.3).

Bisher wurden eine große Zahl genomweiter Kopplungsstudien in ethnisch unterschiedlichen Populationen veröffentlicht, die zusammen mehr als 20 chromosomale Kopplungsregionen für Asthma und Asthma-assoziierte Phänotypen identifizieren konnten (Zusammenfassungen der wichtigsten Studien in Barnes, 2000; Whittaker, 2003; Wills-Karp und Ewart, 2004). Trotz dieser Fülle und der Tatsache, dass nur die wenigsten Studien die von Lander und Kruglyak aufgestellten Signifikanzkriterien erfüllen (Lander und Kruglyak, 1995; Altmüller et al., 2001), haben sich einige Regionen herauskristallisiert, die in mehreren Studien Kopplung mit einem oder mehreren Phänotypen gezeigt haben. Diese Konsensusregionen sind: 2p, 2q, 5q, 6p, 11q, 12q und 13q (Hoffjan und Ober, 2002; Sengler et al., 2002; Gao und Huang, 2004; Wills-Karp und Ewart, 2004). Auch in der, dieser Arbeit zugrunde liegenden, deutschen Asthma-Familienstudie konnte für die Konsensusregionen 2p, 6p und 12q Kopplung mit Asthma bzw. Asthma-assoziierten Phänotypen nachgewiesen werden (Wjst et al., 1999a; Immervoll et al., 2001). All diese Regionen beherbergen eine Anzahl vielversprechender Asthma-Kandidatengene. Zusammenfassungen über genomweite Kopplungsstudien finden sich unter anderem in Sengler et al., 2002 sowie Wills-Karp und Ewart, 2004.

Zum Auffinden prädisponierender Gene für Asthma und Asthma-assoziierte Phänotypen in bereits identifizierten chromosomalen Kopplungsregionen folgt der genomweiten Suche häufig eine klassische positionelle Klonierung. Diese Methode erwies sich in früheren Jahren als sehr erfolgreich bei der Identifizierung von Kandidatengenen für monogenetische Erkrankungen wie Zystische Fibrose oder muskuläre Dystrophie (Halapi und Hakonarson, 2003; Cookson, 2004). Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass es keinerlei Kenntnisse über die Pathobiologie der zu untersuchenden Krankheit bedarf. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, neue prädisponierende Gene zu finden, die bisher nicht als klassische Kandidatengene in Frage kamen, so im Falle der Asthmagene *ADAM33* auf 20p, *DPP10* auf 2q und *PHF11* auf 13q, die alle nicht in die klassischen Asthma-Pathways passen (Zusammenfassungen in Cookson, 2004 und Wills-Karp und Ewart, 2004).

Da es sich bei der klassischen positionellen Klonierung jedoch um ein sehr zeit- und arbeitsaufwendiges sowie kostspieliges Verfahren handelt, wird in der Praxis häufig dazu übergegangen, die genomweite Suche mit der klassischen Kandidatengenanalyse (vgl. 1.5.2.1) zu kombinieren. In dieser als „positionelle Kandidatenklonierung“ bezeichneten

Methode (Barnes und Marsh, 1998; Anderson und Cookson, 1999; Holgate, 1999) beschränkt sich die Analyse auf solche Kandidatengene, die in einer bereits identifizierten chromosomalen Kopplungsregion lokalisiert sind. Diese Kandidatengenanalyse kann zwar auch mit einer populationsbezogenen Fall-Kontroll-Studie durchgeführt werden. In der Regel erfolgt sie jedoch mit der gleichen Familienstudie, die bereits in der vorangegangenen, genomweiten Suche verwendet wurde (familienbasierte Assoziationsstudie, vgl. Abschnitt 1.5.2.2.2 und 2.3.2.3). Ein Blick in die öffentlichen Literaturdatenbanken zeigt, dass sich die positionelle Kandidatenklonierung zu einem erfolgreichen und effizienten Werkzeug bei der Suche nach Asthmagenen entwickelt hat.

1.5.2.2.2 Genomweite Assoziationsstudien

Durch die Fertigstellung des Humangenomprojekts und des internationalen HapMap-Projekts (www.hapmap.org) stehen mittlerweile öffentliche, computerbasierte Datenbanken mit Karten der genetischen Varianten des gesamten humanen Genoms zur Verfügung, die für genomweite Studien herangezogen werden können. Die Entwicklung einer ganzen Reihe neuer und effizienterer Hochdurchsatz-Genotypisierungstechniken in den letzten Jahren erlaubt zudem eine rasche und exakte Analyse des gesamten humanen Genoms auch in sehr großen Studien mit mehr als tausend Probanden. Dies hat dazu beigetragen, dass in vielen Bereichen die klassische genomweite Kopplungsstudie immer mehr durch genomweite Assoziationsstudien ersetzt wird.

Unter einer genomweiten Assoziationsstudie versteht man die systematische Durchsuchung des gesamten humanen Genoms nach genetischen Varianten, die mit einem oder mehreren der untersuchten Phänotypen (Asthma, erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel etc.) assoziiert sind, d.h. bei Erkrankten häufiger vorkommen als bei Gesunden. Dabei kommen zwei grundlegend verschiedene Studiendesigns zum Einsatz: populationsbezogene Studiendesigns und familienbasierte Studiendesigns (Laird und Lange, 2006). Das Standarddesign einer populationsbezogenen Studie stellt dabei die sog. Fall-Kontroll-Studie dar (vgl. Abschnitt 1.5.2.1). Im Gegensatz zu familienbasierten Studien hat dieses Studiendesign den Vorteil der leichteren, und meist auch kostengünstigeren, Rekrutierung der Studienteilnehmer (Laird und Lange, 2006). Das Standarddesign der familienbasierten Assoziationsstudie hingegen ist dasjenige der Kernfamilien (Trios), wobei jede Kernfamilie aus den Eltern und einem erkrankten Kind besteht (Laird und Lange, 2006; vgl. Abschnitt 2.3.2.3). Im Gegensatz zu populationsbezogenen Studien weisen familienbasierte Studien eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Populationsstratifikationen auf und erlauben zudem das

gleichzeitige Auffinden von Assoziation und Kopplung (Laird und Lange, 2006; vgl. Abschnitt 2.3.2.2 und 2.3.2.3).

Genomweite Assoziationsstudien werden im Allgemeinen mit SNPs („single-nucleotide“-Polymorphismen) durchgeführt, deren Daten aus den öffentlichen SNP-Datenbanken entnommen werden. In der Regel kommen dabei nicht alle eingetragenen SNPs zum Einsatz, vielmehr beschränkt man sich bei der Auswahl auf sog. „tag“-SNPs (vgl. Abschnitt 4.4.2). Hierbei handelt es sich um SNPs, die in einer genomischen Region mit hohem Kopplungsungleichgewicht („linkage disequilibrium“, LD) lokalisiert sind und mit einer Vielzahl von benachbarten SNPs im Kopplungsungleichgewicht stehen.

Auch für Asthma und Asthma-assoziierte Phänotypen wurden bereits erste genomweite Assoziationsstudien veröffentlicht (z.B. Moffatt et al. 2007; Choudhry et al., 2008; Hui et al., 2008). Den bisher größten Erfolg können dabei Moffatt und Kollegen verzeichnen. Sie konnten mit ihrer genomweiten, kaukasischen Assoziationsstudie das in der chromosomalen Region 17q21.1 lokalisierte *ORMDL3*-Gen als neues, prädisponierendes Gen für kindliches Asthma identifizieren (Moffatt et al., 2007).

1.5.3 Die chromosomale Kopplungsregion 12q

Eine der am häufigsten identifizierten chromosomalen Kopplungsregionen ist der lange Arm von Chromosom 12, kurz 12q. Eine Vielzahl der bisher veröffentlichten genomweiten Kopplungsstudien konnten für Mikrosatellitenmarker in der Region 12q13-q24 Kopplung mit Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen nachweisen (tabellarische Übersichten in Noguchi und Arinami, 2001 und Wills-Karp und Ewart, 2004). Bestätigt werden diese Befunde durch die Ergebnisse einer Vielzahl von Kopplungsstudien, die rein auf die Region 12q beschränkt waren, sowie Kandidatengenanalysen (z.B. Barnes et al., 1996; Nickel et al., 1997; Wilkinson et al., 1998; Heinzmann et al., 2000; Malerba et al., 2000). Darüberhinaus konnte in einem Asthma-Mausmodell genetische Kopplung zwischen dem Phänotyp BHR (bronchiale Hyperreaktivität) und einer Region auf Chromosom 10 der Maus nachgewiesen werden, die syntänisch zu der humanen chromosomalen Region 12q21.1-q24.22 ist (Zhang et al., 1999).

Zu den genomweiten Kopplungsstudien, welche den Bereich 12q13-q24 als chromosomale Kopplungsregion für Asthma und/oder Asthma-assoziierte Phänotypen identifizieren konnten, zählt auch eine deutsche Asthma-Familienstudie (Wjst et al., 1999a; Immervoll et al., 2001). Da die Ergebnisse dieser Studie die Ausgangsbasis dieser Arbeit bildeten, sind in Abbildung

1.5 die Ergebnisse der Feinkartierung für die Phänotypen *Asthma bronchiale*, erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und erhöhter SLOPE dargestellt.

Unter dem Begriff „SLOPE“ verbirgt sich dabei ein Parameter aus dem Bereich der unspezifischen bronchialen Provokationstests. Diese Tests überprüfen die erhöhte Reaktionsbereitschaft der glatten Bronchialmuskulatur auf chemische und physikalische Reize wie Kaltluft, Histamin, Zigarettenrauch oder Vagusüberträgerstoffe (z.B. Acetylcholin, Methacholin) mit einer Kontraktion zu reagieren (Petro, 1998). Eine erhöhte Reaktionsbereitschaft der Bronchialmuskulatur gegenüber solchen Reizen bezeichnet man als bronchiale Hyperreaktivität, kurz BHR, welche ein zentrales Merkmal von *Asthma bronchiale* darstellt (vgl. Abschnitt 1.2). Um festzustellen, ob eine BHR vorhanden ist, werden in der klinischen Praxis sog. inhalative Provokationstests durchgeführt, bei denen der Patient definierte Mengen von z.B. Methacholin inhaliert. Definitionsgemäß wird bei solchen Tests eine BHR als die provokative Menge an Methacholin bezeichnet, die inhaliert werden muß, damit FEV₁ (siehe Abschnitt 1.3.2) um 20% gegenüber dem Ausgangswert abfällt (Wassmer et al., 1997; Petro, 1998). Je nach Schwere der Erkrankung können bei Asthmatikern bereits geringe Mengen an Methacholin eine BHR auslösen. Trägt man die Werte aus den Provokationstests graphisch auf, erhält man eine Dosis-Antwort-Kurve, deren Steigung als „SLOPE“ bezeichnet wird. Der SLOPE wird von Alter und Geschlecht beeinflusst (Wassmer et al., 1997) und ist bei Asthmatikern im Allgemeinen steiler als bei Gesunden (erhöhter SLOPE).

Insgesamt wurden 18 Mikrosatellitenmarker in der chromosomalen Region 12q untersucht (Wjst/Illig/Loesgen, persönliche Mitteilung; Abb. 1.5). Ausgehend von einem p-Wert von 0,05 als Signifikanzgrenze konnte für fünf Marker eine signifikante Kopplung mit dem Phänotyp *Asthma bronchiale* gefunden werden (p-Werte = 0,0278; 0,0216; 0,0166; 0,0138 und 0,0136; Immervoll et al., 2001; Loesgen, persönliche Mitteilung; Abb. 1.5). Drei Marker zeigten eine signifikante Kopplung mit SLOPE (p-Werte = 0,0126; 0,0116 und 0,0288; Immervoll et al., 2001; Loesgen, persönliche Mitteilung; Abb. 1.5) und einer mit einer erhöhten Eosinophilenzellzahl (p-Wert = 0,0288; Immervoll et al., 2001; Loesgen, persönliche Mitteilung; Abb. 1.5).

Ein p-Wert von 0,05 wird in der Statistik allgemein als Signifikanzgrenze angesehen und bedeutet eine 5%ige Wahrscheinlichkeit, dass das jeweilige Ergebnis auf Zufall beruht. Demnach gilt: je kleiner der p-Wert, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis nicht zufällig erzielt wurde.

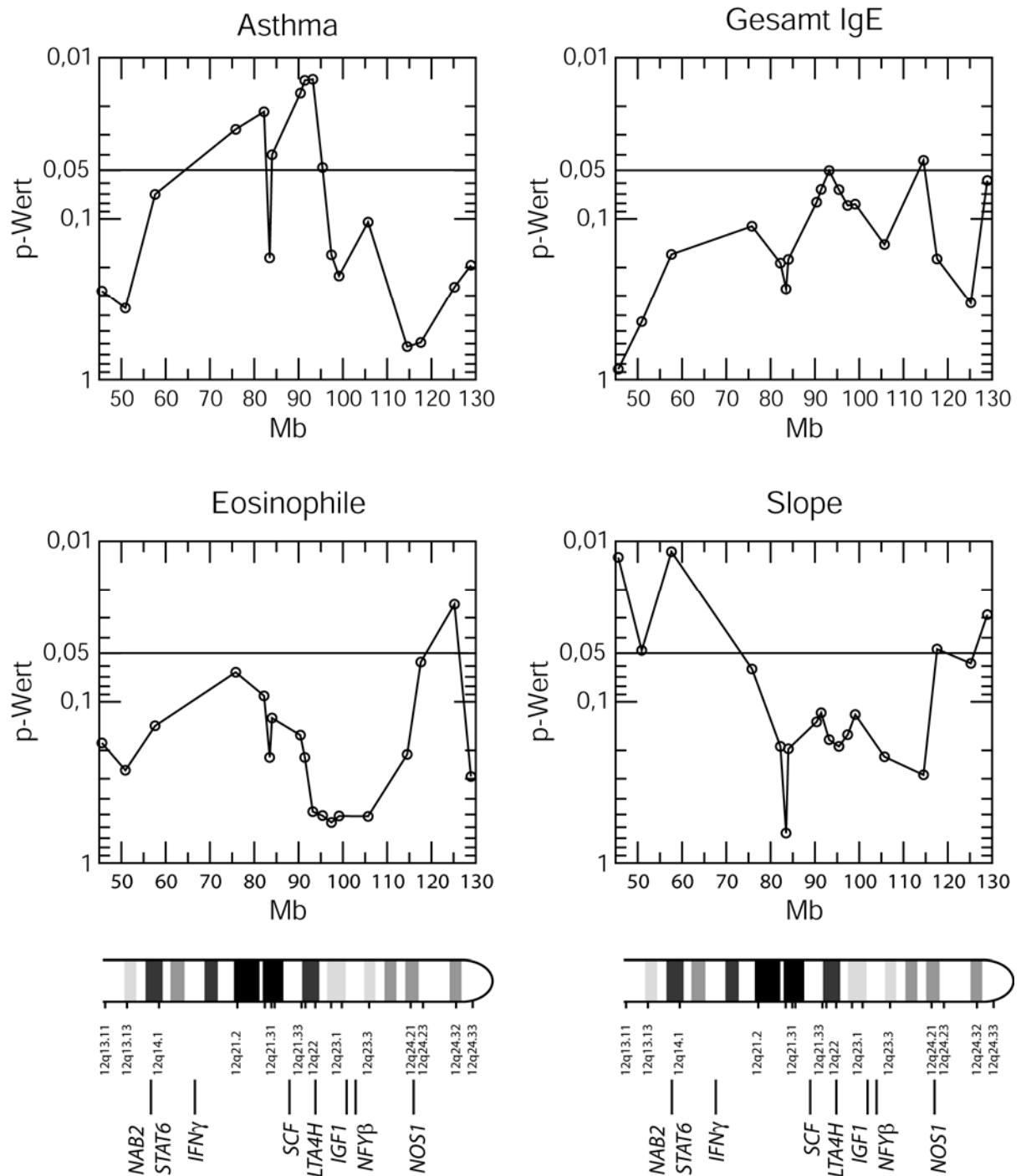


Abbildung 1.5: Graphische Darstellung der Feinkartierungsergebnisse der deutschen Asthma-Familienstudie für die chromosomale Region 12q. Die Graphik wurde anhand der Originaldaten der Feinkartierung sowie der Daten aus der Ensembl-Datenbank angefertigt (http://ensembl.org/Homo_sapiens). Dargestellt ist die absolute Lage der Mikrosatellitenmarker sowie einiger Asthma-Kandidatengene in bp sowie deren relative Lage bzgl. der zytogenetischen Position auf dem Chromosom. Als Signifikanzgrenze wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt (Querlinie).

1.5.4 Asthma-Kandidatengene in der chromosomalen Region 12q13-q24

In der chromosomalen Kopplungsregion 12q13-q24 sind eine ganze Reihe bedeutender Asthma-Kandidatengene lokalisiert, darunter die Gene für den „signal transducer and activator of transcription 6“ (*STAT6*), das *NGFI-A*-Bindeprotein 2 (*NAB2*), Interferon γ (*IFN\gamma*); den Stammzell-Faktor („stem-cell factor“; *SCF*), die Leukotrien A 4 Hydrolase (*LTA4H*), den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 („insulin-like growth factor 1“, *IGF1*), die β -Untereinheit des nukleären Transkriptionsfaktor Y („nuclear transcription factor Y, β -subunit“, *NFY\beta*) und die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase („neuronal nitric oxide synthase“, *NOS1*). Die absolute Position dieser Gene in bp sowie ihre relative Lage in Bezug auf die, in der deutschen Asthma-Familienstudie untersuchten Mikrosatellitenmarker ist in Abbildung 1.5 wiedergegeben.

Im Folgenden werden diejenigen Asthma-Kandidatengene vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

1.5.4.1 *NOS1* als Asthma-Kandidatengen

Zu den Asthma-Kandidatengen der chromosomalen Region 12q zählt *NOS1*. *NOS1*, auch als *nNOS* bezeichnet, ist in der zytogenetischen Region 12q24.2-24.31 lokalisiert und kodiert für die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase („neuronal nitric oxide synthase“) (Xu et al., 1993). Stickstoffmonoxidsynthasen sind Enzyme, welche die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin katalysieren (Xu et al., 1993; Hall et al., 1994). Neben *NOS1* existieren bei Säugern noch zwei weitere Isoformen: die induzierbare NOS (*NOS2* oder *iNOS*) mit dem Genlocus auf 17qcen.q12 und die endotheliale NOS (*NOS3* oder *eNOS*) mit dem Genlocus auf 7q35-q36 (Hall et al., 1994; Förstermann et al., 1998).

In der Lunge fungiert NO unter anderem als Bronchodilatator, Vasodilatator, Neurotransmitter und Mediator der Entzündung (Gaston et al., 1994; Barnes P.J., 1996). Folglich könnten Abnormitäten in der NO-Produktion relevant für die Pathophysiologie von Asthma sein.

NO wird von verschiedenen Zelltypen der unteren Atemwege, darunter inflammatorische Zellen und Epithelzellen, produziert und kann generell in der Atemluft nachgewiesen werden (Gustafsson et al., 1991; Kharitonov et al., 1994). Allerdings konnten verschiedene Studien zeigen, dass die NO-Level in der Atemluft von Asthmatikern gegenüber denen gesunder Probanden signifikant erhöht waren, sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen (z.B. Alving et al., 1993; Kharitonov et al., 1994 und 1995; Massaro et al., 1996). In einer irischen Studie mit an Asthma erkrankten Kindern ergab sich sogar eine Korrelation zwischen dem

NO-Level in der Atemluft und dem prozentualen Anteil an Eosinophilen in der BAL-Flüssigkeit (Warke et al., 2002).

Noch ist unklar welche der drei NOS-Isoformen für die erhöhte NO-Produktion bei Asthmatikern verantwortlich ist. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass NOS1 einen wesentlichen Beitrag dazu leistet. So konnten in einem Mausmodell in der Atemluft von *NOS1*^{-/-}-Knockout-Mäusen signifikant niedrigere NO-Level gemessen werden als in der Atemluft von Wildtyp-Mäusen (De Sanctis et al., 1997 und 1999). Darüberhinaus entwickelten *NOS1*^{-/-}-Mäuse nach anfänglicher Sensibilisierung in Provokationstests weniger häufig eine BHR gegenüber Methacholin als Wildtyp-Mäuse (De Sanctis et al., 1997 und 1999). Weiterhin wurde mittels RT-PCR und Immunhistochemie die Expression von NOS1 im Lungenepithel von Maus und Ratte nachgewiesen (Asano et al., 1994; North et al., 1994). Betrachtet man die Feinkartierungsergebnisse der deutschen Asthma-Familienstudie dann ist das *NOS1*-Gen in der Nähe von Mikrosatellitenmarkern lokalisiert, für die Kopplung mit einer erhöhten Eosinophilenzellzahl bzw. einem erhöhtem SLOPE gefunden wurde (p-Werte < 0,05; siehe Abb. 1.5; Immervoll et al., 2001).

1.5.4.2 *STAT6* als Asthma-Kandidatengen

Das in der zytogenetischen Region 12q13.3-14.1 lokalisierte *STAT6*-Gen (Patel et al., 1998) stellt eines der vielversprechendsten Asthma-Kandidatengene dar. Es kodiert für den, zur Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren gehörenden, „signal transducer and activator of transcription 6“, kurz *STAT6* (Patel et al., 1998). Neben *STAT6* existieren bei Säugern noch sechs weitere Mitglieder der STAT-Familie, *STAT1-4* sowie *STAT5a* und *b* (Imada und Leonard, 2000; Takeda und Akira, 2000).

Im Bereich der Zytokin-Signaltransduktion hat sich der Jak-STAT-Signaltransduktionsweg als einer der wichtigsten Signaltransduktionswege bewiesen (Imada und Leonard, 2000; Takeda und Akira, 2000). So ist *STAT6* in den Signaltransduktionsweg von IL-4 und IL-13 involviert, zweier Zytokine, die bei der Entstehung der allergischen Form von *Asthma bronchiale* eine wichtige Rolle spielen (vgl. Abschnitt 1.4.1 und 1.4.4).

Durch die Bindung von IL-4 bzw. IL-13 an den jeweiligen Rezeptor werden zunächst mit dem Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen (JAKs) aktiviert. Im Falle von IL-4 sind es JAK1 und 3, im Falle von IL-13 JAK1 und 2 (Imada und Leonard, 2000; Kelly-Welch et al., 2003). Die aktivierten JAKs aktivieren ihrerseits *STAT6* durch Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste (Imada und Leonard, 2000; Takeda und Akira, 2000). Aktivierte *STAT6*-Monomere wiederum dimerisieren zu Homo- oder Heterodimeren (Imada und Leonard, 2000;

Kelly-Welch et al., 2003). Diese wandern in den Zellkern, wo sie an Konsensussequenzen in den Promotoren von IL-4 bzw. IL-13 induzierbaren Genen binden (Imada und Leonard, 2000; Kelly-Welch et al., 2003).

Beweise für die bedeutende Rolle des IL-4-/IL-13-STAT6-Signaltransduktionswegs in der Entwicklung von allergischem Asthma liefern Untersuchungen an *STAT6*^{-/-}-Knockout-Mäusen. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen entwickelten *STAT6*^{-/-}-Mäuse keine BHR infolge eines Provokationstests und waren nicht in der Lage, den Klassenwechsel von IgM zu IgE durchzuführen (Shimoda et al., 1996; Kuperman et al., 1998). Demzufolge fanden sich im Serum von *STAT6*^{-/-}-Mäusen auch keine erhöhten IgE-Spiegel (Akimoto et al., 1998; Kuperman et al., 1998; Miyata et al., 1999). Die für Asthma typische Th2-Antwort, Zerstörung des Lungengewebes infolge der Entzündung, erhöhte Schleimproduktion sowie eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen in der bronchoalveolaren Lavage-Flüssigkeit (BAL) konnten bei *STAT6*^{-/-}-Mäusen ebenfalls nicht beobachtet werden (Takeda et al., 1996; Akimoto et al., 1998; Kuperman et al., 1998; Miyata et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für *STAT6*^{-/-}-Mäuse, denen man vor den Provokationstests *in vitro*-differenzierte Antigen-spezifische *STAT6*^{+/+}-Th2-Zellen intravenös injiziert hatte (Mathew et al., 2001). Untermuert werden diese Befunde durch die Ergebnisse von STAT6-Expressionsanalysen an humanem Lungengewebe, welches durch Bronchoskopie gewonnen wurde. Demzufolge war die Anzahl an STAT6-exprimierenden Lungenepithelzellen bei sowohl atopischen als auch nicht-atopischen Asthmatikern signifikant höher als bei Gesunden (Christodoulopoulos et al., 2001) und korrelierte sogar mit dem Schweregrad der Erkrankung. So wiesen Personen mit schwerem Asthma eine wesentlich höhere STAT6-Expression auf als Gesunde und Personen mit leichtem Asthma (Mullings et al., 2001).

Im Vergleich mit den Feinkartierungsergebnisse der deutschen Asthma-Familienstudie zeigt sich, dass das humane *STAT6*-Gen in derselben Region lokalisiert ist, in der mehrere Mikrosatellitenmarker Kopplung mit einem erhöhten SLOPE zeigten (p-Werte < 0,05; siehe Abb. 1.5; Immervoll et al., 2001).

1.5.4.3 *NAB2* als Asthma-Kandidatengen

Als weiteres Asthma-Kandidatengen der chromosomalen Region 12q wurde im Rahmen dieser Arbeit das humane *NAB2*-Gen untersucht, das ebenfalls in der zytogenetischen Region 12q13.3-14.1 lokalisiert ist, in direkter Nachbarschaft zu *STAT6* (Svaren et al., 1996; Svaren et al., 1997). *NAB2* kodiert für das sog. NGFI-A-Bindeprotein 2, welches mit dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor NGFI-A (Synonym: Egr-1) interagiert und dessen Transaktivierung

unterdrückt (Svaren et al., 1996; Svaren et al., 1997). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass NGFI-A eine wesentliche Rolle sowohl in der Reifung und Proliferation von T-Lymphozyten (Perez-Castillo et al., 1993; Miyazaki und Lemonnier, 1998; Carleton et al., 2002). als auch in der Entwicklung von Makrophagen aus myeloiden Vorläuferzellen spielt (Krishnaraju et al., 1995 und 2001). Darüberhinaus konnte bei Mäusen eine Aktivierung der NGFI-A-Expression während der Reifung von B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Seyfert et al., 1989 und 1990). Northern Blot-Analysen an verschiedenen Geweben von adulten Mäusen ergaben unter anderem für die Milz eine signifikante NAB2-Expression (Svaren et al., 1996). Die höchste Expression konnte jedoch in Gehirn und Thymus gefunden werden (Svaren et al., 1996). Letzterer ist der Hauptort für die Reifung und Differenzierung von T-Lymphozyten (Janeway und Travers, 1997; Kapitel 6).

Wie *STAT6* auch, liegt *NAB2* in einer Region, für die in der deutschen Asthma-Familienstudie Kopplung mit einem erhöhten SLOPE gefunden werden konnte (p-Werte < 0,05; siehe Abb. 1.5; Immervoll et al., 2001).

1.5.4.4 *IGF1* als Asthma-Kandidatengen

Ein weiteres bedeutendes Asthma-Kandidatengen in der chromosomalen Region 12q ist das für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 („insulin-like growth factor 1“) kodierende humane *IGF1*-Gen, welches in der zytogenetischen Region 12q22-q23 lokalisiert ist (Jansen et al., 1983; Mathew et al., 1992). Demzufolge befindet es sich in der Nachbarschaft von Mikrosatellitenmarkern, für die in der deutschen Asthma-Familienstudie Kopplung mit Asthma gezeigt werden konnte (p-Werte < 0,05; siehe Abb. 1.5; Immervoll et al., 2001).

IGF1, auch Somatomedin C genannt, ist ein nicht-glykosiliertes Polypeptid und gehört zur Familie der IGFs bestehend aus Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren sowie IGF-Bindeproteinen (Le Roith et al., 2001). Es spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Entwicklung von Säugern und wird von einer Vielzahl von Gewebe- und Zelltypen produziert (Clark, 1997; Le Roith et al., 2001). Untersuchungen an humanen Zellkulturen, durch Bronchoskopien gewonnenem Lungengewebe sowie BAL-Flüssigkeiten konnten IGF1-Expression unter anderem in humanen Lungenepithelzellen, glatten Muskelzellen, alveolaren Makrophagen und der, von der Submucosa sezernierten, extrazellulären Matrix nachweisen (Rom et al., 1988; Cambrey et al., 1995; Hoshino et al., 1998a; Allen et al., 2000). Dies legt die Vermutung einer Beteiligung von IGF1 an der Entstehung von Asthma nahe.

Dabei scheint IGF1 vor allem eine Rolle bei dem als „airway remodeling“ bezeichneten Prozeß zu spielen, bei dem es infolge der chronischen Entzündung der Atemwege zu einem

Umbau der Atemwege kommt (Bousquet et al., 1992; vgl. Abschnitt 1.4.3). Ein Merkmal dieses Prozesses ist eine Verdickung der subepithelialen Basalmembran, hervorgerufen durch die massive Einlagerung verschiedener Kollagentypen und Fibronectin, die von dort ansässigen Fibroblasten sezerniert werden (Roche et al., 1989; Brewster et al., 1990; vgl. Abschnitt 1.4.3). In Untersuchungen an, durch Bronchoskopien gewonnenem, Lungengewebe von Asthmatikern und gesunden Probanden wurde eine signifikante Korrelation zwischen der IGF1-Expression und der Stärke der Basalmembranverdickung bzw. der Anzahl an Fibroblasten gefunden (Hoshino et al., 1998b). Die Einnahme von Kortikosteroiden vor Durchführung der Bronchoskopien führte zu einer signifikanten Abnahme sowohl der Basalmembranverdickung als auch der IGF1-Expression (Hoshino et al., 1998b). Darüberhinaus konnten Versuche mit kultivierten humanen Lungenfibroblasten zeigen, dass die Behandlung mit einem IGF1-Antikörper die zuvor induzierte Proliferation dieser Zellen zum Teil inhibierte (Cambrey et al., 1995).

Weiterhin lassen Befunde, dass sowohl humane Thymozyten als auch humane Thymus-Epithelzellen in Primärkultur IGF1 und den IGF1-Rezeptor exprimieren (de Mello Coelho et al., 2002), auf eine Beteiligung von IGF1 bei der Differenzierung, Proliferation und Migration von T-Lymphozyten schließen. Tatsächlich konnte in einigen Studien eine IGF1-induzierte Proliferation von T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Roldán et al., 1989; Johnson et al., 1992; Kooijman et al., 1995). Auf die Entwicklung von B-Lymphozyten scheint IGF1 ebenfalls einen Einfluß zu haben (Landreth et al., 1992).

1.5.4.5 *LTA4H* als Asthma-Kandidatengen

Ausgehend von den Feinkartierungsergebnissen der deutschen Asthma-Familienstudie stellt das für die Leukotrien A₄-Hydrolase kodierende *LTA4H*-Gen ein weiteres Asthma-Kandidatengen in der chromosomalen Region 12q dar. Das humane *LTA4H*-Gen ist in der zytogenetischen Region 12q22 lokalisiert (Mancini und Evans, 1995) und liegt demnach in der Nähe von Mikrosatellitenmarkern, für die in der deutschen Asthma-Familienstudie Kopplung mit Asthma gefunden wurde (p-Werte < 0,05; siehe Abb. 1.5; Immervoll et al., 2001).

Bei der *LTA4H* handelt es sich um ein lösliches, bifunktionelles Zink-Metalloenzym, das die stereospezifische Hydrierung von Leukotrien A₄ (LTA₄) zu Leukotrien B₄ (LTB₄) katalysiert (Haeggström, 2000 und 2004; Thunnissen et al., 2001). Leukotriene sind eine Klasse von Lipidmediatoren, die eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von inflammatorischen Prozessen und allergischen Reaktionen spielen, einschließlich derjenigen,

welche die Atemwege betreffen (Samuelsson et al., 1987; Haeggström, 2000 und 2004). LTB₄ wird von u.a. von Mastzellen sezerniert und hat sich als sehr wirksames Chemoattraktant für eine Reihe von Leukozytentypen, darunter Eosinophile und Makrophagen, erwiesen (Ford-Hutchinson et al., 1980; Haeggström, 2004). Die Gabe von Medikamenten, deren Wirkstoffe die Leukotriensynthese oder -wirkung unterdrücken bzw. modifizieren (z.B. Montelukast, Pranlukast, Zileuton; Zusammenfassung in Drazen, 1999), erwies sich in den letzten Jahren in der Asthma-Therapie als sehr erfolgreich.

Studien an Geweben von Nagern und Menschen zeigen, dass LTA₄H von einer Vielzahl von Geweben gebildet wird, in hoher Konzentration unter anderem in Milz und Lunge (Haeggström, 2000). Auf zellulärer Ebene scheinen vor allem alveolare Epithelzellen (Bigby et al., 1989 und 1994; Brock et al., 2005) und alveolare Makrophagen (Haeggström, 2000; Brock et al., 2001) LTA₄H zu exprimieren.

Auch in BAL („bronchoalveolaren Lavage“-)Flüssigkeiten konnte LTA₄H nachgewiesen werden (Lam et al., 1988; Munafo et al., 1994). Allerdings wurden nur in den BAL-Flüssigkeiten von Asthmatikern signifikante Mengen an LTB₄ gefunden (Lam et al., 1988). In den BAL-Flüssigkeiten gesunder Probanden dagegen waren keine Leukotriene vorhanden (Lam et al., 1988). Weiterhin wiesen periphere polymorphkernige Leukozyten von asthmatischen Kindern gegenüber gesunden Probanden eine erhöhte LTA₄H-Expression und eine damit einhergehende gesteigerte LTB₄-Synthese auf (Zaitsu et al., 2003). Zusammen mit dem Befund, dass IL-4 und IL-13 in humanen polymorphkernigen Leukozyten die Aktivität der LTA₄H steigern können (Zaitsu et al., 2000), lassen diese Ergebnisse auf eine Beteiligung von LTA₄H in der Pathogenese von *Asthma bronchiale* schließen.

1.6 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Viele genomweite Kopplungsstudien sowie Kandidatengenanalysen und regional, auf die Region 12q beschränkte, Kopplungsstudien konnten für die chromosomale Region 12q13-q24 Kopplung bzw. Assoziation mit Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen wie z.B. erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl, bronchiale Hyperreaktivität (BHR) und/oder diversen Lungenfunktionsparametern nachweisen (Übersichten in z.B. Noguchi und Arinami, 2001; Wills-Karp et al., 2004). Auch in der, dieser Arbeit zugrunde liegenden, deutschen Asthma-Familienstudie, wurde mittels Grob- und anschließender Feinkartierung für mehrere Mikrosatellitenmarker dieser Region Kopplung mit Asthma oder Asthma-assoziierten Phänotypen gefunden (Wjst et al., 1999a; Immervoll et al., 2001; vgl. Abb. 1.5).

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von den Ergebnissen der Grob- und Feinkartierung der deutschen Asthma-Familienstudie, Kandidatengene für *Asthma bronchiale* in der chromosomalen Kopplungsregion 12q13-q24 zu identifizieren. Dies beinhaltete zunächst einmal die Auswahl geeigneter Kandidatengene und die Aufklärung der jeweiligen Genstruktur anhand von Daten aus öffentlichen Gen-Datenbanken und der Literatur. Auswahlkriterien waren zum einen die biologische Funktion des jeweiligen Kandidatengens, zum anderen die chromosomale Position des Gens in Bezug auf die chromosomale Lage derjenigen Mikrosatellitenmarker, für die Kopplung mit Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen gefunden wurde. In einem zweiten Schritt sollten die ausgewählten Kandidatengene systematisch auf das Vorkommen von Polymorphismen, in erster Linie SNPs („single-nucleotide-polymorphisms“), untersucht werden. Anschließend erfolgte die Genotypisierung von identifizierten Polymorphismen innerhalb der deutschen Asthma-Familienstudie mittels geeigneter Hochdurchsatz-Techniken („High-Throughput“-Techniken) wie MALDI-TOF- („matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight“-) Massenspektrometrie, Kapillarsequenzierung, RFLP-Analyse und Fragmentanalyse.

Zusätzlich sollten auch bereits bekannte SNPs aus öffentlichen SNP-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) untersucht werden. Dies umfaßte die Validierung dieser SNPs und die darauffolgende Genotypisierung validierter SNPs in der Asthma-Familienstudie mit den bereits erwähnten Hochdurchsatz-Techniken.

Abschließend sollten vollständig genotypisierte Polymorphismen mittels geeigneter statistischer Methoden innerhalb der Asthma-Familienstudie auf Assoziation/Kopplung mit Asthma und den Asthma-assoziierten Phänotypen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl, erhöhter SLOPE und verminderter Peak-Flow getestet werden.

2. Probanden, Material und Methoden

2.1 Probanden

2.1.1 ECRHS-Studie

Die Suche nach SNPs („single-nucleotide-polymorphisms“) im menschlichen *STAT6*-Gen erfolgte mit genomischer DNA von 32 unabhängigen, adulten Probanden, 16 Asthmatiker und 16 nicht-Asthmatiker, einer deutschen populationsbezogenen Studie, die zwischen 1990 und 1992 in Ost-Deutschland (Erfurt, Thüringen) durchgeführt wurde und insgesamt 4.990 Probanden zwischen 19 und 65 Jahren umfasst (Wassmer et al., 1997; Ulbrecht et al., 2000). Die Erhebung ist Teil der ECRHS- („European Community Respiratory Health Survey“-) Studie, die mit ihren weltweit 34 Zentren zu einer der größten epidemiologischen Studien für Atemwegserkrankungen zählt. Das Hauptinteresse dieser Studie liegt dabei in der Erforschung der Genetik von *Asthma bronchiale* (Wjst et al. for the ECRHS-Group, 1997; Wassmer et al., 1997). Genauere Beschreibungen der ECRHS-Studie finden sich in Burney et al., 1994 und Heinrich et al., 2002.

2.1.2 KORA S4-Studie

Die Validierung von SNPs aus öffentlichen SNP-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) erfolgte in einem Pool aus genomischer DNA von 286 zufällig ausgewählten adulten Probanden der KORA S4-Studie. Hierbei handelt es sich um eine deutsche, populationsbezogene Studie, die zwischen 1999 und 2001 in der Stadt Augsburg (Bayern) und der umliegenden Region durchgeführt wurde (Filipiak et al., 2001; Holle et al., 2005; Wichmann et al., 2005). Alle der mehr als 4.000 Studienteilnehmer gaben eine Einverständniserklärung ab, ihre DNA für weitere Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich zur Blutentnahme wurde auch der Gesundheitsstatus der Probanden festgestellt. Eine explizite Untersuchung auf *Asthma bronchiale* und verwandte Merkmale erfolgte jedoch nicht. Der Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer zugrunde.

2.1.3 Asthma-Familienstudie

2.1.3.1 Studiendesign und Auswahlkriterien

Bei dem verwendeten Studiendesign handelt es sich um eine sog. „affected sib-pair“ (ASP)-Studie. Dazu wurden seit Anfang 1994, hauptsächlich in pädiatrischen Abteilungen von Universitätskliniken in Deutschland und Schweden, kaukasische Familien rekrutiert. Die Kernfamilien bestanden aus dem jeweiligen Elternpaar und mindestens zwei, an Asthma erkrankten Kindern („affected sib-pairs“) (Wjst und Wichmann, 1995; Wjst et al., 1999a). Folgende Punkte stellten die primären Auswahlkriterien für die Teilnahme an der Studie dar (J. Altmüller/M. Wjst, persönliche Mitteilung; Wjst und Wichmann, 1995):

1. In der Familie muss bei mindestens zwei Kindern *Asthma bronchiale* ärztlich diagnostiziert sein. Die Kinder müssen leiblich und keine Zwillinge sein.

Begründung: „affected sib-pair“-Design

2. Alle Familienmitglieder sollten deutsch sprechen.

Begründung: Vermeidung von Verständigungsschwierigkeiten, ausländische Angehörige wären bei einem späteren Zeitpunkt nicht erreichbar.

3. Beide Kinder dürfen keine Früh-/Mangelgeborene sein (Gestationsalter über der 37.

Schwangerschaftswoche, Geburtsgewicht über 2.500 Gramm) und sollten in den ersten 6 Lebensmonaten nicht mechanisch beatmet worden sein.

Begründung: Ausschluss von Phänokopie Surfactant-Mangel/Lungenreifungsstörungen

4. Das Einverständnis der Eltern muss vorliegen.

Begründung: Juristische und ethische Gründe

5. Das Alter der Kinder sollte zwischen 6 und 18 Jahren liegen.

Begründung: In diesem Alter haben die meisten Kinder bereits Asthma-Symptome entwickelt.

Mit Ausnahme von 5 schwedischen und 9 Familien anderer Nationalitäten waren alle Familien deutscher Herkunft (Wjst et al., 1999a). Von den 108 Familien (474 Probanden: 216 Eltern, 258 Kinder), die zu Beginn der Arbeit zur Verfügung standen, wurden 97 (415 Personen) in die initiale genomweite Suche eingeschlossen (Wjst et al., 1999a; Immervoll et al., 2001). Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Studie auf insgesamt 172 Familien (748 Probanden: 344 Eltern, 404 Kinder) aufgestockt, die für die Analysen der Gene *NAB2*, *IGF1* und *LTA4H* herangezogen wurden. Alle Studienteilnehmer, Eltern und Kinder, unterschrieben eine Einverständniserklärung für die Verwendung ihrer DNA sowie aller anderen Daten zu weiteren Studienzwecken. Der Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission von Nordrhein-Westfalen zugrunde (Wjst et al., 1999a).

2.1.3.2 Phänotypisierung der Studienteilnehmer

Alle Eltern und Kinder wurden auf *Asthma bronchiale* sowie auf, mit Asthma-assoziierte Merkmale wie z. B. Gesamt-IgE-Spiegel, spezifischer IgE-Spiegel, periphere Eosinophilenzellzahl und bronchiale Hyperreaktivität (BHR) untersucht.

Asthma bronchiale wurde zunächst klinisch diagnostiziert und später durch Fragebögen bestätigt. Dabei galt folgende Definition: *Asthma bronchiale* liegt dann vor, wenn nach dem 3. Lebensjahr mehrfach ($> 10x$) und über einen längeren Zeitraum (> 3 Jahre) akut, sich wiederholende Zeichen der Atemwegsobstruktion aufgetreten sind. Zeichen der Atemwegsobstruktion (und/oder Hyperreaktivität) sind Atemnot und pfeifende Atemgeräusche oder ständiger Husten (mehr als 2x am Tag), wobei anatomische Anomalien des Respirationstraktes und andere Lungenerkrankungen wie Zystische Fibrose, chronische Bronchitis etc. ausgeschlossen wurden.

Zur physikalischen Verifizierung der klinischen Diagnose und Bestimmung der bronchialen Hyperreaktivität (BHR) wurden zusätzlich Lungenfunktionstests, Peak-Flow-Messungen und bronchiale Provokation mit Methacholin, durchgeführt (Wjst und Wichmann, 1995). Die genaue Durchführung ist in Wjst, 1999b beschrieben.

Des weiteren wurden die Teilnehmer mit einem standardisierten Skin-Prick-Test (SPT) auf Allergien gegenüber zwölf häufigen Allergenen (Gräserpollen, Hausstaubmilben, Schimmelpilze, Tierhaare, Birkenpollen, Haselnusspollen etc.) getestet (Wjst und Wichmann, 1995) und der Gesamt-IgE-Spiegel im Serum als auch der spezifische IgE-Spiegel für die im SPT verwendeten Allergene mittels ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) bzw. RAST („radioallergosorbent assay“) (Pharmacia, Freiburg, D) ermittelt (Wjst, 1999b). Da Asthmatiker meist eine Blut-Eosinophilie aufweisen, wurde zusätzlich die periphere Eosinophilenzellzahl wie in Wjst, 1999b beschrieben, bestimmt. Eine Übersicht über die verwendeten Methoden sowie Festlegungen sind in Wjst und Wichmann, 1995 wiedergegeben.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

- Gelelektrophorese-Apparatur: Sunrise, horizontal Gel Electrophoresis Apparatus
(GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe, D)
Bio-Rad Power Pac300/3000 (Bio-Rad, München, D)
- Gel-Dokumentationssystem: UVT40 M Transilluminator (Herolab, Wiesloch, D)
- DNA-Sequenzierer : CEQ2000 (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer
(Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- Kühlzentrifugen für Platten: Sigma 4K15C (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, D)
Rotanda 46 RS (Hettich, Darmstadt, D)
- Massenspektrometer: BIFLEX II- TOF
(Bruker Franzen Analytik GmbH, Bremen, D)
- Mikrowelle: Moulinex (Solingen, D)
- PCR-System: PCR PTC 225 Tetrad, Peltier Thermal Cycler
(MJ Research, Boston, USA)
PCR PTC 200 Tetrad, Peltier Thermal Cycler
(MJ Research, Boston, USA)
PCR RoboCycler 96 Temperatur Cycler with Hot Top
(Stratagene, Amsterdam, NL)
- Pipettierroboter: Biomek2000 (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
Genesis RSP 150 Work Station (Tecan AG, Crailsheim, D)
Multimek96 Automated 96-Channel Pipettor
(Beckman Coulter, Fullerton, USA)
- Photometer: GeniOS[®] Fluorescence Plate Reader (Tecan AG, Crailsheim, D)
- Schüttler: Taumelschüttler Unitwist 3D
(UniEquip Laborgeräte + Vertriebs GmbH, München, D)
- Spotter: SpectroJET[™] NP nanoliter pipetting system
(SEQUENOM GmbH, Hamburg, D)
SpectroPOINT[™] nanoliter pipetting system
(SEQUENOM GmbH, Hamburg, D)
- Thermomixer: Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, D)

- Tischzentrifuge: Centrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, D)
MicroCentrifuge SD110VAC
(Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D)
- Vakuumkonzentrator: SpeedVac Concentrator RVC 2-25 (Christ, Osterode, D)
- Vortexer: MS2 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen, D)

2.2.2 Oligonukleotide (Primer)

Die für das Auffinden von SNPs verwendeten PCR- und Sequenzierprimer wurden vom damaligen hauseigenen Syntheseservice (U. Linzner, Abteilung BioDV am Institut für Säugetiergenetik des Helmholtz-Zentrums Münchens) hergestellt.

Im Rahmen der MALDI-TOF- sowie Fragmentanalyse verwendete, HPSF („high purity salt free“)-aufgereinigte PCR- und Extensions-Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg, D, bezogen. Alle in der Arbeit verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet.

2.2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und sonstigen Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen ABgene (Hamburg, D), ABI (Applied Biosystems, Weiterstadt, D), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D), ART (San Diego, USA), Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ, USA), Corning Costar (Bodenheim, D), Dunn Labortechnik (Asbach, D), Eppendorf (Hamburg, D), Fisher Scientific (Schwerte, D), Gentra Systems (Minneapolis, USA), GibcoBRL (Eggenstein, D), Greiner Labortechnik (Solingen, D), Gilson International (Bad Camberg, D), JT Baker (Deventer, NL), Macherey-Nagel (Düren, D), MBI-Fermentas (St. Leon-Rot, D), Merck (Darmstadt, D), Molecular Probes (Leiden, NL), NEB New England Biolabs (Frankfurt, D), Nerbe Plus (Winsen/Luhe, D), QIAGEN (Hilden, D), Roth (Karlsruhe, D), Safe Skin Corp. (San Diego, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim, D), bezogen. Entionisiertes und gefiltertes Wasser wurde der Reinstwasser-Anlage Ultra Clear UV (2002) der Firma Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH (Barsbüttel, D), entnommen.

2.2.4 Reagentien, Lösungen und Puffer

2.2.4.1 Reagentien, Lösungen und Puffer für die PCR

- 10x Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Tween (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

- 10x PCR Puffer: Tris-HCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 mM MgCl_2 , pH 8,7 (QIAGEN, Hilden, D)
- 25 mM MgCl_2 QIAGEN, Hilden, D
- 25 mM MgCl_2 MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
- dNTP-Set, je 100 mM MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.2.4.2 Reagentien, Lösungen und Puffer für die Sequenzierung bzw. Fragmentanalyse

- 10x Running Buffer mit EDTA Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- LiChrosolv, H_2O , HPLC grade Merck, Darmstadt, D
- HI-DI Formamid Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- FG, 3100 POP6 Sequenziergel Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- FG, 3100 POP4 Gel Applied Biosystems, Weiterstadt, D
- CEQ Sequenzier-Gel Beckman Coulter, Fullerton, USA
- CEQ Sequenzier-Puffer Beckman Coulter, Fullerton, USA

2.2.4.3 Reagentien, Lösungen und Puffer für MALDI-TOF Massenspektrometrie

- MassEXTENDTM Nucleotide Tri-Mix Pack SEQUENOM, Hamburg, D
- MassEXTENDTM Nucleotide Di-Mix Pack SEQUENOM, Hamburg, D
- MassEXTENDTM Nucleotide Uni-Mix Pack SEQUENOM, Hamburg, D
- hME MassEXTENDTM Nucleotide Tri-Mix Pack SEQUENOM, Hamburg, D
- 3-Punkt KalibrantTM SEQUENOM, Hamburg, D
- hME Puffer SEQUENOM, Hamburg, D
- Spectro CLEANTM SEQUENOM, Hamburg, D

2.2.4.4 Reagentien, Lösungen und Puffer für RFLP-Analysen (Restriktionsverdau)

- 10x NEBuffer 4:
(1x Buffer: 50 mM KAc, 20 mM TrisAc, 10 mM MgAc, 1 mM DTT, pH 7,9)
(NEB New England Biolabs, Frankfurt, D)
- 10x NEBuffer 3:
(1x Buffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, pH 7,9)
(NEB New England Biolabs, Frankfurt, D)

2.2.4.5 Reagentien, Lösungen und Puffer für die DNA Gelelektrophorese

- | | |
|---------------------------|---|
| - Agarose ultra pure | GibcoBRL, Eggenstein, D |
| - 6x Loading Dye Solution | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| - 1x TBE-Laufpuffer | (Protokoll siehe Sambrook and Russel, 2001) |

GibcoBRL, Eggenstein, D
 MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
 (Protokoll siehe Sambrook and Russel, 2001)

Alle weiteren Lösungen und Puffer wurden den jeweiligen Reaktionskits entnommen (siehe 2.2.7) und werden deshalb nicht gesondert aufgeführt.

2.2.5 Längenstandards für DNA Agarosegele

- pUC Mix, Marker, 8 MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.2.6 Längenstandards für die Fragmentanalyse (Genescan)

- Genescan 400HD [ROX] Size Standard Applied Biosystems, Weiterstadt, D

Applied Biosystems, Weiterstadt, D

2.2.7 Reaktionskits

2.2.7.1 Reaktionskits für die Gewinnung von DNA aus Vollblut

- Puregene Genomic DNA Isolation Kit Gentra Systems, Minneapolis, USA

Gentra Systems, Minneapolis, USA

2.2.7.2 PCR-Aufreinigungskits

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| - NucleoSpin® Robot 96-T Extract Kit | Macherey-Nagel, Düren, D |
| - QIAquick PCR Purification Kit | QIAGEN, Hilden, D |
| - QIAquick Gel Extraction Kit | QIAGEN, Hilden, D |

Macherey-Nagel, Düren, D
 QIAGEN, Hilden, D
 QIAGEN, Hilden, D

2.2.7.3 Sequenzierkits

- BigDye™ Terminator v1.0 Cycle Sequencing Kit
(Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- CEQ™ DTCS Kit, Dye Terminator Cycle Sequencing Kit
(Beckman Coulter, Fullerton, USA)

(Applied Biosystems, Weiterstadt, D)

(Beckman Coulter, Fullerton, USA)

2.2.7.4 Reaktionskits für MALDI-TOF Massenspektrometrie

- MassEXTEND™ Core Kit SEQUENOM, Hamburg, D

2.2.7.5 Reaktionskits für die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

- PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit Molecular Probes, Leiden, NL

2.2.8 Enzyme

2.2.8.1 Polymerasen

- | | |
|--------------------------------------|---|
| - HotStar Taq™ DNA Polymerase | QIAGEN, Hilden, D |
| - Taq DNA Polymerase LC, recombinant | MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| - Thermosequenase™ | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D |

2.2.8.2 Restriktionsenzyme für RFLP-Analysen

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| - <i>Ava</i> I, recombinant | NEB New England Biolabs, Frankfurt, D |
| - <i>Dra</i> III | NEB New England Biolabs, Frankfurt, D |

2.2.8.3 Enzyme für MALDI-TOF Massenspektrometrie

- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) SEQUENOM, Hamburg, D

2.2.9 Verwendete Computerprogramme

2.2.9.1 Computerprogramme für Pipettierroboter

- | | |
|--|---------------------------------|
| - Gemini 3.2 (Visual Basic Programme) | Tecan, Crailsheim, D |
| - Xfluor4 | Tecan, Crailsheim, D |
| - NormalisationWorklistMaker (Visual Basic Programm) | Tecan, Crailsheim, D |
| - Bioworks | Beckman Coulter, Fullerton, USA |

2.2.9.2 Computerprogramme für MALDI-TOF Massenspektrometrie

- SpectroTYPER™ SEQUENOM, Hamburg, D
- Genotype Analyzer™ Version 2.0.0.5 SEQUENOM, Hamburg, D
- SpectroDESIGNER™ SEQUENOM, Hamburg, D
- SpectroREADER™ SEQUENOM, Hamburg, D

2.2.9.3 Computerprogramme für Sequenzierung und Fragmentanalyse

- DNA Sequencing Analysis Software™ Version 3.6.1
(Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- 3100 Data Collection Software™ Version 1.0.1
(Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- GeneScan Analysis Software™ Version 3.7
(Applied Biosystems, Weiterstadt, D)
- CEQ™ 2000 Software Version 2.0
(Beckman Coulter, Fullerton, USA)

2.2.9.4 Computerprogramme für Primerkonstruktion, Analyse genomischer DNA-Sequenzen, Sequenzalignments

- Vector NTI Suite 6.0 (www.invitrogen.com)

2.2.9.5 Computerprogramme für Datenverwaltung und statistische Analysen

- SIB-PAIR Version 0.99.9 by David L. Duffy davidD@qimr.edu.au
- SAS 8.1 und SAS 8.2 <http://www.sas.com>
- RC-TDT Version 1.0 by M. Knapp <http://www.uni-bonn.de>
(Knapp 1999a und b)
- QTDT Package Version 2.2.1 by G. Abecasis <http://www.well.ox.ac.uk/asthma/QTDT>
(Abecasis et al., 2000a und b)
- haptx (Dr. Klaus Rohde, Bioinformatik, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin, D)
- Arlequin Release 2.001 (EM-Algorithmus) <http://lgb.unige.ch/arlequin/software/2.001>
(Excoffier und Slatkin, 1995)

2.2.10 Verwendete Internet-Datenbanken

- Ensemble (<http://www.ensembl.org>)
- National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- UCSC Human Genome Project Working Draft, Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>)
- Unified Database for Human Genome Mapping (<http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc>)
- <http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>

2.3 Methoden

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

2.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut

Genomische DNA wurde aus peripheren Leukozyten (weiße Blutkörperchen) gewonnen. Dazu wurde den Probanden der Asthma-Familienstudie aus einer peripheren Vene 9-10 ml Vollblut entnommen und mittels des Puregene Genomic DNA Isolation Kits (Gentra Systems, Minneapolis, USA) genomische DNA nach einem Standardprotokoll isoliert. Dabei wurden zuerst die zellkernlosen Erythrozyten mittels Lyse und Zentrifugation von den restlichen Leukozyten abgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Leukozyten-Zellkerne unter Zugabe eines DNA-Stabilisators. In einem weiteren Schritt wurde die RNA mittels RNase A-Verdau abgebaut und Proteine durch eine Salzpräzipitation beseitigt. Die sich im Überstand befindliche genomische DNA wurde mit 100% Isopropanol gefällt, gewaschen (70% Ethanol) und das getrocknete Pellet in 1-2 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, fertige Lösung ist Bestandteil des Kits) resuspendiert. Mit dieser Methode betrug die Ausbeute an genomischer DNA ca. 300-400 µg pro 9 ml Vollblut.

Die Langzeitlagerung der genomischen DNA-Stammlösungen erfolgte bei -20°C und -80°C in 2 ml Röhrchen, Cluster Mikrotiterplatten (96 Well-Format) und Deep Well-Platten (96 Well-Format).

2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung genomischer DNA

Die Konzentration des eingesetzten DNA-Templates stellt eines der Hauptkriterien für das Funktionieren der PCR („polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion) dar. Für die Etablierung von PCRs im Hochdurchsatz-Verfahren („High-Throughput“-Technik) ist es deshalb notwendig, möglichst äquimolare Konzentrationen der genomischen DNA-Templates zu verwenden.

Eine herkömmliche photometrische Konzentrationsbestimmung wässriger, doppelsträngiger (ds) DNA-Lösungen mittels Absorptionsmessung bei 260 nm (Absorptionsmaximum doppel- und einzelsträngiger DNA) wirft insofern Probleme auf, da der große Beitrag einzelner Nukleotide und einzelsträngiger DNA (ssDNA) zum Absorptionssignal sowie Verunreinigungen der Probe die Messwerte verfälschen (Singer et al., 1997). Daher wurde die photometrische Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA-Stammlösungen unter Verwendung des PicoGreen® dsDNA Quantitation Kits (Molecular Probes, Leiden, NL) durchgeführt.

PicoGreen® ist ein ultrasensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt an doppelsträngige DNA (dsDNA) anlagert (Interkalation). Dies erlaubt eine äußerst genaue Detektion von weniger als 25 pg/ml dsDNA in der Anwesenheit äquimolarer Mengen von ssDNA oder RNA (Singer et al., 1997).

Bei der PicoGreen®-Methode wird zunächst eine Eichreihe mit verschiedenen Konzentrationen eines, im Kit enthaltenen, *Lambda*-DNA-Standards durchgeführt. Die Messungen wurden mit dem GenIOS® Fluorescence Plate Reader der Fa. Tecan (Crailsheim, D) unter Verwendung von Standard-Fluoreszenz-Wellenlängen (Anregung 482 nm, Emission 520 nm) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Anhand der Messwerte der Eichreihe wurden anschließend die Konzentrationen der genomischen DNA-Stammlösungen bestimmt. Für eine weitere Verwendung der genomischen DNAs in der PCR wurden die Stammlösungen mit 1x TE-Puffer auf eine Konzentration von 40-60 ng/µl bzw. 1 ng/µl verdünnt und die Verdünnungen in Deep Well-Mikrotiterplatten bei 4°C im Kühlraum gelagert. Alle Verdünnungen wurden vollautomatisch auf der Pipettierstation Genesis RSP 150 Work Station (Tecan, Crailsheim, D) unter Verwendung des Gemini 3.2 Visual Basic Programms (Tecan, Crailsheim, D) durchgeführt.

2.3.1.3 Pooling genomischer DNA aus der KORA S4-Studie

Zur Herstellung des DNA-Pools wurde zunächst die Konzentration der genomischen DNA-Stammlösungen von 286 zufällig ausgewählten Probanden der KORA S4-Studie (vgl. Abschnitt 2.1.2) mit der PicoGreen®-Methode photometrisch bestimmt und mit 1x TE-Puffer auf eine Endkonzentration von jeweils 1 ng/µl eingestellt. Danach wurden die eingestellten DNA-Lösungen durch Transfer von jeweils 18 µl einer jeden Verdünnung in einem Röhrchen vereinigt und gut gemischt („pooling“), um in etwa äquimolare Mengen zu erhalten. Von dieser gepoolten DNA-Lösung wurden in einem weiteren Schritt je 18 µl auf die einzelnen Wells einer 96 Well-Mikrotiterplatte transferiert und über Nacht eingetrocknet, so dass pro

Well 18 ng gepoolter DNA zur Verfügung standen. Die eingetrockneten DNA-Pools wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Alle Pipettierschritte erfolgten dabei auf der Genesis RSP 150 Work Station (Tecan, Crailsheim, D) unter Verwendung der Gemini 3.2-Software (Tecan, Crailsheim, D).

2.3.1.4 Konstruktion von Primern (Oligonukleotide)

Für eine optimale Amplifikation bestimmter genomischer DNA-Sequenzen mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) im Hochdurchsatz-Verfahren stellt die Wahl der richtigen PCR-Primer ein weiteres, wichtiges Kriterium dar. Primer, die in ihrer Sequenz Repeats oder Palindrome enthalten, können die PCR genauso beeinträchtigen wie solche, die Dimere oder Haarnadelschleifen bilden. Auch spielt die Länge der Oligonukleotide, der GC-Gehalt wie auch die Schmelztemperatur (T_m) eine gravierende Rolle (siehe auch Sambrook und Russel, 2001). Um solche Probleme zu minimieren, erfolgte die Konstruktion der Primer mit Hilfe entsprechender Computerprogramme. So wurden alle für die Suche nach Polymorphismen im menschlichen *STAT6*-Gen verwendeten PCR- und Sequenzierprimer mit dem Vector NTI Programm konstruiert (Vector NTI Suite 6.0, <http://www.invitrogen.com>).

Primer, die bei der MALDI-TOF-Analyse Verwendung fanden (PCR- und Extensions-Primer) wurden mit dem SpectroDESIGNERTM-Programm der Fa. SEQUENOM (Hamburg, D) konstruiert.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PCR-, Sequenzier- und Extensions-Primer sind, zusammen mit den dazugehörigen Annealing-Temperaturen, im Anhang aufgelistet.

2.3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR von „polymerase chain reaction“) erlaubt die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz, ohne auf das Klonieren zurückzugreifen. Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird dabei durch die, in der Reaktion verwendeten Primer definiert.

Damit für anschließende Sequenzierreaktionen ausreichende Mengen aufgereinigter PCR-Produkte zur Verfügung standen, wurden für PCRs, die im Rahmen der SNP-Suche im menschlichen *STAT6*-Gen bzw. der Genotypisierung verschiedener SNPs in der Asthma-Familienstudie durchgeführt wurden, ein Reaktionsansatz von insgesamt 50 µl gewählt.

PCR-Reaktionsansatz für ein Gesamtvolumen von 50 µl:

30,0 µl LiChrosolv H₂O (Merck, Darmstadt, D)

1,5 µl genomisches DNA-Template (40 ng/µl)

5,0 µl 2 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

5,0 µl 10x PCR-Puffer mit (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

3,0 µl 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

2,5 µl forward PCR-Primer (10 pmol/µl)

2,5 µl reverse PCR-Primer (10 pmol/µl)

0,5 µl Taq DNA Polymerase (1 U/µl) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

In der Regel wurde für mehrere, gleiche PCR-Ansätze ein sog. Master-Mix angesetzt, der bis auf das DNA-Template alle oben aufgeführten Komponenten enthält. 48,5 µl dieses Mixes wurden in die einzelnen Wells einer 96 Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und danach das DNA-Template dazu pipettiert. Die fertigen PCR-Ansätze wurden gut gemischt, kurz abzentrifugiert und bis zur Beladung der PCR-Thermocycler auf Eis gelagert.

Die Amplifikationen wurden auf PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) bzw. für *NOSI* auf dem PCR RoboCycler 96 Temperature Cycler der Fa. Stratagene (Amsterdam, NL) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

95°C	5 min	einleitender Denaturierungsschritt	1 Zyklus
95°C	1 min	Denaturierung	35 Zyklen
X°C	1 min	Annealing der Primer	
72°C	1 min	Elongation	
72°C	10 min	Elongation	1 Zyklus

Alle eingesetzten Primer-Paare, die Primer-spezifischen Annealing-Temperaturen sowie die Längen der einzelnen PCR-Fragmente in bp sind gesondert im Anhang aufgeführt.

PCRs, die für eine Analyse mit der MALDI-TOF-Methode durchgeführt wurden, werden unter 2.3.1.13. genauer beschrieben.

2.3.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Fragmenten mit Agarosegelen

Die Überprüfung von PCR-Fragmenten erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen. Dazu wurden je 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl 6x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) versetzt und das Gemisch entsprechend der Länge der amplifizierten Fragmente

auf ein 3% bzw. 4% Agarosegel aufgetragen. Herstellung der Gele, Elektrophorese sowie Färbung der Gele mit Ethidiumbromid erfolgte nach Standardprotokollen (siehe Sambrook und Russel, 2001). Als Puffer diente 1x TBE (Herstellung siehe Sambrook und Russel, 2001).

2.3.1.7 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Für PCRs, die im 96 Well-Format (96 Well-Mikrotiterplatten) durchgeführt wurden, erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte mit der Pipettierstation Biomek 2000 (Beckman Coulter, Fullerton, USA) nach einem Standardprotokoll unter Verwendung des NucleoSpin® Robot 96-B Extract Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren, D).

Einzelne PCRs (bis zu 30 Einzelproben) wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, D) nach einem Standardprotokoll (siehe QIAquick Spin Handbuch) aufgereinigt.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit 30-50 µl LiChrosolv H₂O eluiert, auf einem Agarosegel überprüft und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3.1.8 Extraktion von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen

Um nach erfolgter PCR eine vollständige Abtrennung restlicher dNTPs und anderer Bestandteile des PCR-Ansatzes zu gewährleisten, erfolgte bei einigen PCRs die Aufreinigung der PCR-Produkte über eine Gelextraktion. Dazu wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, die PCR-Banden nach erfolgter Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Fa. QIAGEN (Hilden, D) nach Anleitung (siehe QIAquick Spin Handbuch) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit 30-50 µl LiChrosolv H₂O eluiert, auf einem Agarosegel überprüft und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3.1.9 Enzymatischer Verdau von PCR-Fragmenten (Restriktionsverdau)

Enzymatische Verdau von PCR-Fragmenten mittels Restriktionsenzymen wurden im Rahmen der RFLP-Analyse (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse) von SNPs in verschiedenen Genen durchgeführt.

2.3.1.9.1 *Dra* III-Restriktionsverdau

Zur Analyse des SNPs in Exon 18 des humanen *NOS1*-Gens wurde eine RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym *Dra* III (NEB New England Biolabs, Frankfurt, D) durchgeführt. Das Enzym wurde aus einem *E. coli*-Stamm isoliert, der das geklonte *Dra* III-Gen von *Deinococcus radiophilus* enthält. Da dieses Restriktionsenzym durch weitere PCR-Komponenten nicht beeinträchtigt wird, war eine, dem Restriktionsverdau vorangehende, Aufreinigung der PCR-Produkte nicht notwendig.

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt:

15 µl unaufgereinigtes PCR-Produkt

2 µl 10x NEBuffer 3 (NEB New England Biolabs, Frankfurt, D)

2 µl BSA (Bovines Serum Albumin, 1:10 verdünnt, New England Biolabs, Frankfurt, D)

1 µl *Dra* III (20.000 U/ml)

Um einen möglichst vollständigen Verdau zu gewährleisten, erfolgte der Verdau bei 37°C über Nacht in einem Wasserbad. Die Ergebnisse wurden nachfolgend auf einem 6% Agarosegel überprüft, wobei der gesamte Restriktionsansatz aufgetragen wurde.

2.3.1.9.2 *Ava* I-Restriktionsverdau

Die RFLP-Analyse des SNPs in der Promotorregion des humanen *STAT6*-Gens, *STAT6* 5'flankingSNP1, wurde mittels des Restriktionsenzym *Ava* I (NEB New England Biolabs, Frankfurt, D) durchgeführt. Das Enzym stammt aus einem *E. coli*-Stamm, der das klonierte *Ava* I-Gen von *Anabaena variabilis* enthält. Auch hier erfolgte keine vorangehende Aufreinigung der PCR-Produkte.

Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt:

15 µl unaufgereinigtes PCR-Produkt

2 µl dest. H₂O

2 µl 10x NEBuffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt, D)

1 µl *Ava* I (10.000 U/ml)

Der Verdau wurde für 5 Stunden in einem Wasserbad bei 37°C durchgeführt und nachfolgend die Ergebnisse auf einem 6% Agarosegel überprüft, wobei der gesamte Reaktionsansatz aufgetragen wurde.

2.3.1.10 Sequenzierung von aufgereinigten PCR-Fragmenten

Sequenzierungen erfolgten im Rahmen dieser Arbeit aus zwei Gründen. Zum einen wurden verschiedene SNPs innerhalb der Asthma-Familienstudie mittels Sequenzierung genotypisiert, zum anderen sollten durch einen Sequenzvergleich der PCR-Produkte von 32 Probanden der ECRHS-Studie (vgl. Abschnitt 2.1.1) SNPs in der genomischen Sequenz des humanen *STAT6*-Gens identifiziert werden.

Die Genotypisierung der beiden SNPs im humanen *NOS1*-Gen wurden auf dem 8-Kapillarsequenziergerät CEQ 2000 der Fa. Beckman Coulter (Fullerton, USA) durchgeführt. Alle weiteren Sequenzierungen erfolgten auf dem 16-Kapillarsequenziergerät ABI Prism 3100 Genetic Analyzer der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt, D).

Beide Sequenziermethoden arbeiten mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) nach der Sanger-Abbruch-Methode (Sanger et al., 1977). Genauere Beschreibungen können den jeweiligen Handbüchern der Herstellerfirmen entnommen werden.

2.3.1.10.1 Sequenzierung mit dem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer

Sequenzierreaktionen für PCR-Produkte > 300 bp erfolgten mit dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit der Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt, D) nach einem Standardprotokoll der Herstellerfirma (siehe Handbuch). Dabei wurde entsprechend der jeweiligen PCR-Effizienz, 3-5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt als Template eingesetzt. Für PCR-Produkte bis zu einer Länge von 300 bp wurde der Reaktionsansatz wie folgt abgeändert:

1-3 µl aufgereinigtes PCR-Template

2 µl BigDyeTM Terminator Mix

1 µl Sequenzierprimer (10 pmol/µl)

x µl LiChrosolv H₂O

Gesamtvolumen: 10 µl

Das Thermocycling erfolgte auf den PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter folgenden Bedingungen:

96°C	30 s	Denaturierung	} 30 Zyklen
50°C	15 s	Annealing des Sequenzierprimers	
60°C	4 min	Elongation	

Die Sequenzierprodukte wurden mittels Ethanolfällung nach einem Standardprotokoll der Fa. Applied Biosystems (siehe Handbuch) aufgereinigt. Für den 10 µl Reaktionsansatz wurden die jeweiligen Mengenangaben angepasst. Die getrockneten Pellets (Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur) wurden in 200 µl LiChrosolv H₂O resuspendiert und bis zur Sequenzierung bei 4°C gelagert. Von den 200 µl wurden 20 µl in spezielle Mikrotiterplatten (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) überführt und das Gerät beschickt. Die Sequenzierung erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Handbuch der Herstellerfirma). Eine Analyse der Chromatogramme erfolgte mit der DNA Sequencing Analysis SoftwareTM Version 3.6.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D).

2.3.1.10.2 Sequenzierung mit dem CEQ 2000 Sequenzierer

Sequenzierreaktionen sowie die anschließende Aufreinigung der Sequenzierprodukte erfolgte mit dem CEQTM 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter, Fullerton, USA) nach einem Standardprotokoll der Herstellerfirma. Es wurden entsprechend der PCR-Effizienz, 3-6 µl aufgereinigtes PCR-Template eingesetzt. Das Thermocycling erfolgte auf dem PCR RoboCycler 96 Temperature Cycler der Fa. Stratagene (Amsterdam, NL) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

96°C	30 s	Denaturierung	} 30 Zyklen
50°C	30 s	Annealing des Sequenzierprimers	
60°C	4 min	Elongation	

Die aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden in 40 µl deionisiertem Formamid (JT Baker, Deventer, NL) aufgenommen und unter Standardbedingungen (siehe Handbuch der Herstellerfirma) sequenziert. Die Analyse der Chromatogramme erfolgte mit dem Analyseprogramm der CEQTM 2000 Software Version 2.0 (Beckman Coulter, Fullerton, USA).

2.3.1.11 Sequenzalignment zum Auffinden von SNPs

Zum Auffinden von SNPs wurden die Sequenzen des jeweiligen PCR-Fragments aller 32 Probanden der ECRHS-Studie (siehe 2.1.1) mit dem ContigExpress des Vector NTI Programms (www.invitrogen.com) analysiert.

2.3.1.12 Fragmentanalyse

Die Fragmentanalyse ist eine einfache und schnelle Methode zur Genotypisierung von Polymorphismen, die sich mit Sequenzierung oder MALDI-TOF Massenspektrometrie nicht analysieren lassen. Einen solchen Polymorphismus stellt der, im Rahmen dieser Arbeit untersuchte, GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens dar. Bei diesem Repeat handelt es sich um einen Mikrosatelliten-Polymorphismus, der aus einer bestimmten Anzahl von direkt hintereinander liegenden GT-Dinukleotid-Folgen besteht. Das heißt, zwei Allele unterscheiden sich in der Zahl der Dinukleotide, so dass eine, für diesen Polymorphismus, heterozygote Person z. B. ein Allel mit 13 hintereinanderliegenden GT-Dinukleotiden und ein Allel mit 15 Folgen aufweist. PCR-Fragmente, die diesen Repeat enthalten, unterscheiden sich somit in ihrer Länge. Bei einer Analyse der PCR-Fragmente mittels Sequenzierung würde es bei heterozygoten Personen zu einer Verschiebung der beiden Allelsequenzen kommen. Die daraus resultierenden Mischsequenzen machen eine genaue Bestimmung der Anzahl der GT-Dinukleotide praktisch unmöglich.

Bei einer Fragmentanalyse dagegen, werden die einzelnen Allele aufgrund der unterschiedlichen Längen der entsprechenden PCR-Fragmente unterschieden. Dazu wird in einem ersten Schritt die den Repeat enthaltende, genomische DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert, wobei jeweils ein Fluoreszenz-markierter und ein nicht-markierter PCR-Primer verwendet werden, so dass Fluoreszenz-markierte PCR-Produkte entstehen (Primer siehe Anhang). Das PCR-Reaktionsvolumen belief sich dabei auf 20 µl:

- 1,5 µl genomisches DNA-Template (40 ng/ul)
- 2,5 µl 2 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer mit (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 0,75 µl 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 1,25 µl 6-FAM markierter forward PCR-Primer (10 pmol/µl)
- 1,25 µl unmarkierter reverse PCR-Primer (10 pmol/µl)
- 0,25 µl Taq DNA Polymerase (1 U/µl) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Die Amplifikationen wurden auf PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C	5 min	einleitender Denaturierungsschritt	1 Zyklus
95°C	1 min	Denaturierung	} 35 Zyklen
58°C	1 min	Annealing der Primer	
72°C	1 min	Elongation	
72°C	10 min	Elongation	1 Zyklus

Nach Überprüfung der PCR auf DNA Agarosegelen, wurden die unaufgereinigten PCR-Produkte zunächst mit LiChrosolv H₂O 1:20 bzw. 1:50 (je nach Bandenstärke) verdünnt. In einem nachfolgenden Schritt wurden dann je 1 µl verdünntes PCR-Produkt und 0,3 µl eines definierten Längenstandards (Genescan 400HD [ROX] Size Standard, Applied Biosystems, Weiterstadt, D) in 15 µl deionisiertem Formamid (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) 2 min bei 90°C denaturiert und der Ansatz anschließend sofort auf Eis gekühlt.

Die Fragmentanalyse erfolgte unter Standardbedingungen auf dem ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Hierbei wurden die PCR-Fragmente entsprechend ihrer Länge in einem denaturierenden Sequenziergel (FG, 3100 POP 4 Gel, Applied Biosystems, Weiterstadt, D) elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Detektion der Fragmente aufgrund der Fluoreszenz-Markierung über ein entsprechendes Filtersystem und eine sensitive CCD-Kamera erfolgte. Die Längenbestimmung der einzelnen PCR-Produkte wurde mit der GeneScan Analysis SoftwareTM Version 3.7 (Applied Biosystems, Weiterstadt, D) anhand des eingesetzten Längenstandards bestimmt.

Um die Anzahl an GT-Repeats der einzelnen Allele zu bestimmen, wurden PCR-Fragmente, von, für das jeweilige Allel, homozygoten Personen, sequenziert. Als Sequenzierprimer diente der nicht-markierte forward PCR-Primer. Für die entsprechenden PCRs wurden die nicht-markierten PCR-Primer verwendet (Primer siehe Anhang). Die Primersequenzen wurden dabei der Veröffentlichung von Tamura et al., 2001 entnommen.

2.3.1.13 Genotypisierung von SNPs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie, speziell die „matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“ Massenspektrometrie, kurz MALDI-TOF MS, hat sich in den letzten Jahren zu einer effektiven Hochdurchsatz- („High-Throughput“-) Methode für die schnelle und genaue Genotypisierung von SNPs entwickelt. Dabei werden in einer Art „Minisequenzierungsreaktion“, der Primer-Verlängerungs-Reaktion (Primer-Extension), Allel-spezifische Primer-Extensions-Produkte erzeugt, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülmassen massenspektrometrisch unterscheiden lassen (Griffin und Smith, 2000; Gut, 2001).

2.3.1.13.1 Prinzip der MALDI-TOF Massenspektrometrie

Bei der erstmals von Karas und Hillenkamp beschriebenen, Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie („matrix-assisted laser desorption/ionisation“ Massenspektrometrie, MALDI MS) wird die zu analysierende Probe mit einem 1.000 bis 10.000fachen Überschuss einer Licht absorbierenden Matrix, meistens eine organische Säure, auf einem metallischen Probenhalter ko-kristallisiert (Karas und Hillenkamp, 1988; Kirpekar et al., 1998). Bei der nachfolgenden Laser Desorption/Ionisation (LDI) im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird der Analyt wie auch die Matrix durch einen intensiven Impuls eines kurzwelligen Lasers (UV-Laser) ionisiert und dabei in die Gasphase desorbiert (Kirpekar et al., 1998; Gut, 2001). Da die Matrix den größten Teil der Laserenergie absorbiert, wird die, bei einer herkömmlichen LDI zu beobachtende, Fragmentierung der Analytmoleküle drastisch herabgesetzt (Karas und Hillenkamp, 1988; Leushner und Chiu, 2000). Außerdem bewirken die während der Laser Desorption/Ionisation entstehenden photoionisierten, radikalischen Matrixmoleküle durch Protonentransfer eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Probenmolekülen (Griffin und Smith, 2000; Lottspeich und Zorbas, 1998). Bei der für eine Analyse von DNA-Fragmenten (Oligonukleotiden) verwendeten Matrix handelt es sich in der Regel um 3-Hydroxypicolinsäure, welche im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 337 nm absorbiert (Little et al., 1997a und b; Buetow et al., 2001).

Der, in Verbindung mit MALDI MS, am häufigsten verwendete Massenanalysator ist das Flugzeitmassenspektrometer, auch TOF-Analysator genannt, wobei TOF für „time-of-flight“ steht (Griffin und Smith, 2000). Hierbei werden die, bei der Laser Desorption/Ionisation gebildeten Ionen in einem elektrischen Feld auf das gleiche Potential beschleunigt und durchlaufen, nach Verlassen der Ionenquelle, eine feldfreie Driftstrecke, das sog. Flugrohr, in dem sie nach ihrem Masse/Ladungs- (m/z) Verhältnis aufgetrennt werden bevor sie am Detektor auftreffen (Kirpekar et al., 1998; Griffin und Smith, 2000). Dabei wandern Ionen mit hohen m/z -Werten langsamer durch das Flugrohr und erreichen somit den Detektor später als Ionen mit niedrigen m/z -Werten (Griffin und Smith, 2000). So können mit den heutigen MALDI-TOF Massenspektrometern DNA-Fragmente mit Massen zwischen 1.000 und 6.000 Da (3-20 Basen) mit einer Genauigkeit von 0.1% bis 0.01% bestimmt werden (Leushner und Chiu, 2000; Gut, 2001).

Da DNA bei dem oben beschriebenen Prozess im Normalfall eine einfache Protonierung erfährt, ist die Ladung aller Proben gleich groß, so dass die Auftrennung im Flugrohr nur nach der Masse erfolgt.

Das Prinzip der MALDI-TOF MS ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.

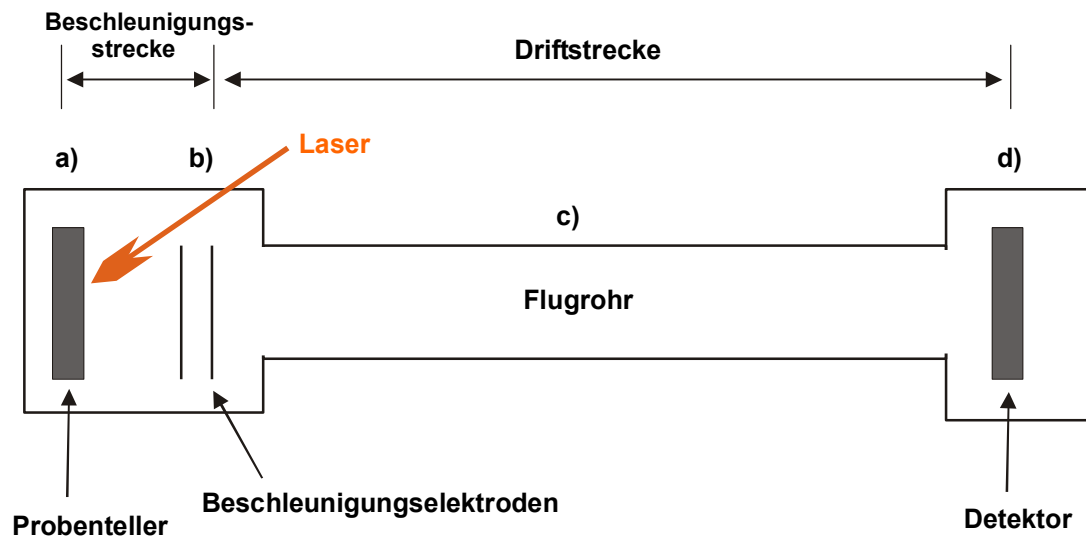


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines linearen MALDI-TOF Massenspektrometers (nach Griffin und Smith, 2000, in abgewandelter Form). a) Laser Desorption/Ionisation von Matrix und Analyt im Hochvakuum der Ionenquelle. b) Beschleunigung der erzeugten Ionen im elektrischen Feld der Ionenquelle. c) Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse/Ladungs- (m/z -) Verhältnis in einem linearen, feldfreien Flugrohr. d) Detektion der Ionen.

2.3.1.13.2 Primer-Verlängerungs-Reaktion (Primer-Extension)

Für die Analyse von SNPs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie werden zunächst die, den jeweiligen SNP enthaltenden, genomischen DNA-Sequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die PCR-Fragmente dienen dann als Matrize (Template) für eine spezifische Primer-Verlängerungs-Reaktion (Primer-Extension), bei der die o. g. Allel-spezifischen Primer-Extensions Produkte erzeugt werden (Leushner und Chiu, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Varianten der Primer-Verlängerungs-Reaktion angewendet: die sogenannte PROBETM-Reaktion („primer oligo base extension reaction“, Little et al., 1997a und b), für die Validierung von SNPs aus Datenbanken sowie die SNP-Genotypisierung im 96 Well-Format und die hME- („homogeneous MassEXTEND“TM-) Methode (SEQUENOM, Hamburg, D) für die SNP-Genotypisierung im 384 Well-Format.

Beide Methoden, inklusive der Massenspektrometrie selbst, sowie alle Analyse- und Auswerteschritte wurden mit dem MassARRAYTM-System der Fa. SEQUENOM (Hamburg, D) durchgeführt, welches eine Plattform für die automatisierte SNP-Genotypisierung mit MALDI-TOF MS im Hochdurchsatz-Verfahren („High-Throughput“) darstellt (Leushner und Chiu, 2000; Jurinke et al., 2001).

2.3.1.13.2.1. PROBETM-Reaktion („primer oligo base extension reaction“)

a) Prinzip

Aufgrund der hohen Sensitivität müssen die zu analysierenden Allel-spezifischen Primer-Extensions-Produkte für eine Analyse mit MALDI-TOF MS einen wesentlich höheren Reinheitsgrad aufweisen als es für andere Analysemethoden erforderlich ist (Gut, 2001). Bei der PROBETM-Reaktion bedient man sich deshalb der Aufreinigung mittels des Biotin-Streptavidin Systems (Jurinke et al., 1997).

Streptavidin ist ein bakterielles Protein, das, aufgrund seiner sehr hohen Affinität zu Biotin, mit diesem, und damit auch mit biotinyliertem Material, sehr stabile Komplexe bildet (Jurinke et al., 1997).

Aus diesem Grund wird bei der PROBETM-Reaktion zunächst eine PCR mit einem biotinylierten (Biotinylierung am 5'-Ende) und einem nicht-biotinylierten PCR-Primer durchgeführt (Little et al., 1997a und b). Das unaufgereinigte, biotinylierte PCR-Produkt wird dann durch eine Bindung an, mit Streptavidin überschichteten, paramagnetischen Beads (SEQUENOM, Hamburg, D) immobilisiert (Little et al., 1997a und b) und denaturiert. Der Überstand, in welchem sich der nicht-biotinylierte Strang des PCR-Produkts sowie alles nicht-spezifisch gebundene Material befinden, wird verworfen. Der immobilisierte Strang des PCR-Produkts dient dann als Template für die nachfolgende Primer-Extensions-Reaktion.

Bei dem sogenannten PROBE-Primer (Extensions-Primer) handelt es sich um ein zum Template-Strang komplementäres Oligonukleotid, dessen 3'-Ende genau eine Base vor dem jeweiligen SNP endet (Little et al., 1997a und b; Leushner und Chiu, 2000). In der nachfolgenden Primer-Extension wird dieser Primer durch die Zugabe einer bestimmten Kombination an Didesoxynukleotiden (Abbruch-Mix, auch Stop-Mix genannt) nach der Sanger-Abbruch-Methode (Sanger et al., 1977) ein bis drei Basenpaare verlängert. Dabei wird die Art der verwendeten Didesoxynukleotide durch die beiden Allele des SNPs bestimmt, wie Abbildung 2.2 am Beispiel des SNPs in Intron 18 des humanen *STAT6*-Gens verdeutlicht. Nach einem weiteren Denaturierungsschritt befinden sich die Extensions-Produkte im Überstand und stehen in dieser gelösten Form für eine nachfolgende Analyse mit MALDI-TOF MS zur Verfügung.

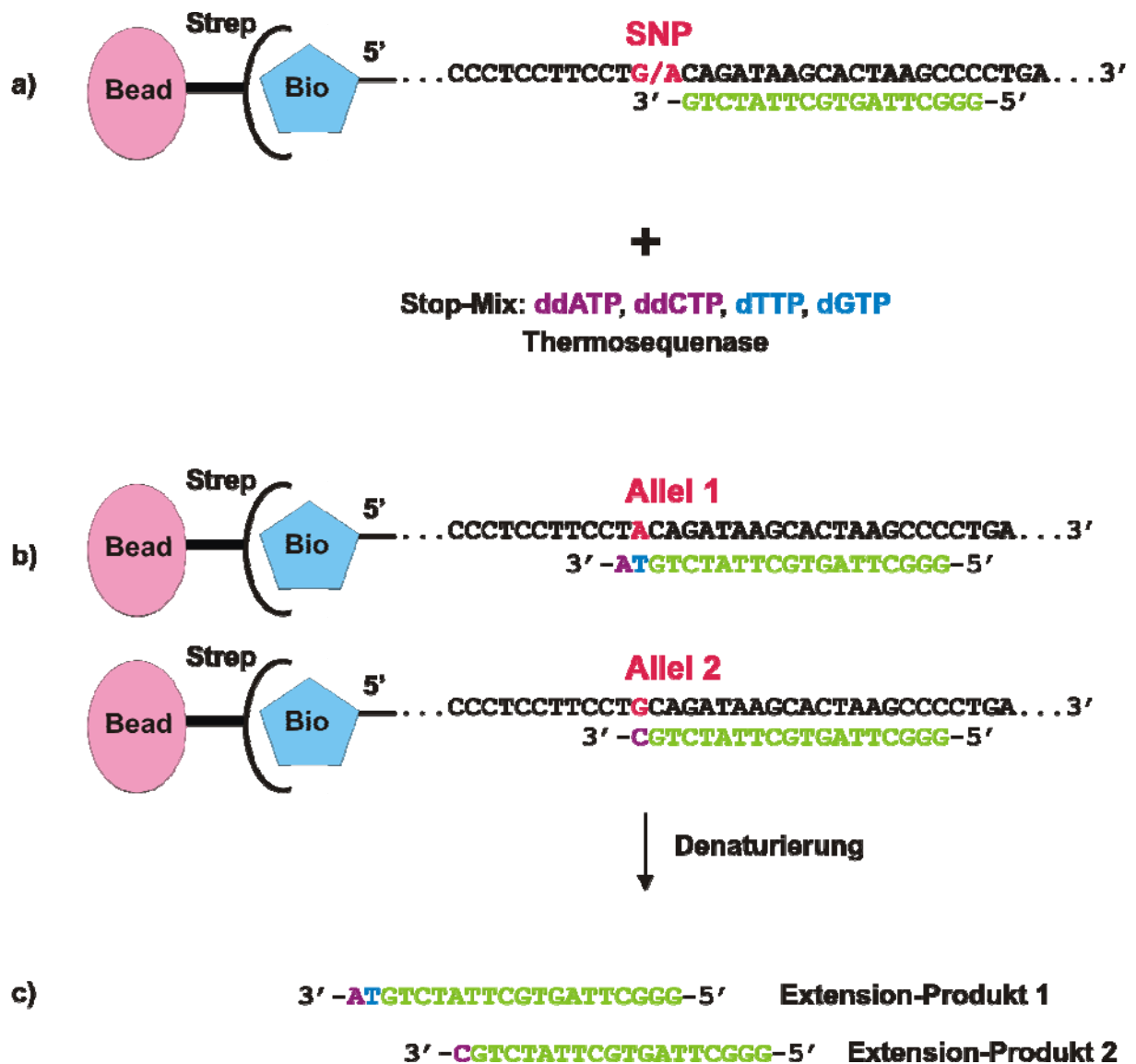


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der PROBETM-Reaktion für den SNP in Intron 18 des humanen *STAT6*-Gens, *STAT6* In18SNP1 (nach Little et al., 1997a und b, in abgewandelter Form). a) Gezeigt ist der reverse Strang des PCR-Produkts (schwarz), der durch sein biotinyliertes 5'-Ende (Bio) an Streptavidin (Strep) beschichtete paramagnetische Beads (Bead) gebunden ist. Während des Annealing-Schrittes der Primer-Extensions-Reaktion lagert sich der komplementäre Extensions-Primer (grün) an das Template an. Dieser endet mit seinem 3'-Ende genau eine Base vor dem SNP (rot), welcher in diesem Fall ein G>A-Austausch ist. b) Nach Zugabe von ThermosequenaseTM (einer spezifischen DNA-Polymerase) und eines geeigneten Stop-Mixes bestehend aus einem best. Verhältnis dNTPs (blau) und ddNTPs (violett) erfolgt während des Elongationsschrittes der Primer-Extensions-Reaktion die Verlängerung des Extensions-Primers, so dass bei einem heterozygoten Fall zwei Allel-spezifische Extensions-Produkte (Extension Produkt 1 und 2) entstehen, die sich in ihren Molekülmassen deutlich von einander unterscheiden. c) Nach einem Denaturierungsschritt befinden sich die beiden Extensions-Produkte im Überstand und stehen für eine weitere Analyse mit der MALDI-TOF MS zur Verfügung.

b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um spätere Primer-Kontaminationen im Massenspektrum (siehe Punkt c) zu vermeiden, wurde für PCRs, die im Rahmen der PROBETM-Reaktion erfolgten, die Menge des eingesetzten biotinylierten PCR-Primers so gewählt, dass dessen möglichst vollständiger quantitativer Verbrauch während der Reaktion gewährleistet war, ohne dabei die PCR in irgendeiner Weise zu beeinträchtigen. Das PCR-Reaktionsvolumen betrug dabei für alle Assays 50 µl.

Für die Genotypisierung von SNPs im 96 Well-Format wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

- 32,4 µl LiChrosolv H₂O (Merck, Darmstadt, D)
- 1,5 µl genomisches DNA-Template (40 ng/ul)
- 5,0 µl 2 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer mit (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 3,0 µl 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 2,5 µl nicht-biotinylierter PCR-Primer (10 pmol/µl)
- 0,1 µl biotinylierter PCR-Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Taq DNA Polymerase recombinant (1 U/µl) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Für die Validierung von SNPs mit der gepoolten DNA der KORA S4-Studie wurde folgender Ansatz verwendet, der direkt auf das lyophilisierte DNA-Template (18 ng) pipettiert wurde:

- 33,9 µl LiChrosolv H₂O (Merck, Darmstadt, D)
- 5,0 µl 2 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer mit (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 3,0 µl 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
- 2,5 µl nicht-biotinylierter PCR-Primer (10 pmol/µl)
- 0,1 µl biotinylierter PCR-Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl Taq DNA Polymerase (1 U/µl) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Die Amplifikationen erfolgten für beide Ansätze auf PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

95°C	10 min	einleitender Denaturierungsschritt	1 Zyklus
95°C	45 sec	Denaturierung	} 45 Zyklen
X°C	45 sec	Annealing der Primer	
72°C	45 sec	Elongation	
72°C	10 min	Elongation	1 Zyklus
4°C	unendlich		

c) Primer-Extensions-Reaktion

Die Immobilisierung der PCR-Produkte über paramagnetische Beads, die Primer-Extensions-Reaktion sowie alle damit verbundenen Denaturierungs- und Waschschrte wurden unter Verwendung des MassEXTEND™ Core Kits der Fa. SEQUENOM (Hamburg, D) nach einem Standardprotokoll der Herstellerfirma (Manual Processing Procedure for the MassARRAY™ II System; SEQUENOM, Hamburg, D) durchgeführt. Alle erforderlichen Pipettierschritte erfolgten dabei auf der Pipettierstation Multimek96 Automated 96 Channel-Pipettor (Beckman Coulter, Fullerton, USA) unter Verwendung von vorgefertigten Programmen (SEQUENOM, Hamburg, D). Das für die Primer-Extensions-Reaktion erforderliche Thermocycling wurden auf PCR PTC 200 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter Standardbedingungen (siehe Manual Processing Procedure for the MassARRAY™ II System; SEQUENOM, Hamburg, D) durchgeführt.

d) MALDI-TOF Massenspektrometrie

Für eine Analyse mit MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden mit Hilfe des SpectroJET™ nanoliter pipetting systems der Fa. SEQUENOM (Hamburg, D) 1-2 nl der aufgereinigten Primer-Extensions-Produkte auf einen sog. SpectroCHIP™ (SEQUENOM, Hamburg, D) übertragen. Hierbei handelt es sich um einen 96-Spot Siliziumchip der mit einigen Nanolitern einer kristallinen Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) beladen ist (Buetow et al., 2001). Neben den 96 Spots für die zu analysierenden Proben befanden sich auf dem Chip noch fünf weitere, die ebenfalls mit der Matrix beladen waren. Auf diese zusätzlichen Spots wurde, ebenfalls mit dem SpectroJET™ nanoliter pipetting system, ein Kalibrant (SEQUENOM, Hamburg, D) gespottet. Dieser bestand aus einer Mischung von drei Standard-Oligonukleotiden (17 Nukleotide, 28 Nukleotide und 33 Nukleotide) und diente der Kalibrierung des Analysesystems. Der Chip wurde dann auf einen metallischen Probenträger übertragen und in das MassARRAY™ Massenspektrometer (Bruker Franzen Analytik, Bremen, D - SEQUENOM, Hamburg, D) eingeführt, wobei die Kalibrierung des Systems, Messung und Analyse der Proben voll automatisch mit Standardeinstellungen erfolgte:

1. Übersetzung des TOF-(„time-of-flight“-) Spektrums in ein Massenspektrum (SpectroREADERTM-Software; Leushner und Chiu, 2000)
2. Prozessierung und Analyse der Spektren sowie deren Übersetzung in entsprechende Genotypen (SpectroTYPERTM-Software; Buetow et al., 2001).

2.3.1.13.2.2. hME- („homogeneous MassEXTEND“TM-) Methode

a) Prinzip

Die hME-Methode, welche für die Genotypisierung von SNPs im 384 Well-Format verwendet wurde, unterscheidet sich von der PROBE-Reaktion in sofern, dass hier keine Aufreinigung über das Biotin-Streptavidin-System erfolgt. Weiterhin werden die PCRs mit sog. „getaggt“ PCR-Primern durchgeführt. Hierbei werden an das 5'-Ende der sequenzspezifischen Primer zehn zusätzliche Basen, der sog. „tag“, angehängt (siehe Abbildung 2.3). Diese tags sind für alle Primer gleich und haben folgende Sequenz: 5'-ACGTTGGATG-3'. Durch den Anhang dieser zusätzlichen Nukleotide wird die Molekülmassen der PCR-Primer erhöht, so dass sie weit außerhalb des Massenbereichs der Primer-Extensions-Produkte liegen und somit nicht im Massenfenster erscheinen.

Nach erfolgter PCR wird der Ansatz mit dem Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase; SEQUENOM, Hamburg, D) behandelt. Dieses baut freie, während der PCR nicht eingebaute, Desoxynukleotide ab, so dass diese in der darauffolgenden Primer-Extensions-Reaktion nicht stören. Die Primer-Extension erfolgt nun direkt in dem nicht-aufgereinigten PCR-Ansatz. In einem letzten Schritt wird die Probe zur Reinigung mit einem Ionenaustauscher-Harz (SpectroCLEANTM, SEQUENOM, Hamburg, D) behandelt und steht nun für eine weitere Analyse bereit.

5'-ACGTTGGATGCTTACGGTTGTTCTGTATGC-3'

Abbildung 2.3: hME PCR-Primer mit „tag“ (Anhang). Grün: Sequenzspezifischer Teil des Primers. Rot: 10 Nukleotide langer Anhang (tag).

b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle im Rahmen der hME-Methode durchgeführten PCRs erfolgten in 384 Well-Mikrotiterplatten, wobei das Reaktionsvolumen 5 µl betrug. Dazu wurde ein Mastermix angefertigt, der mit der Pipettierstation Genesis RSP 150 Work Station der Fa. Tecan (Crailsheim, D) unter Verwendung des Gemini 3.2 Programms in die einzelnen Wells vorgelegt wurde. Die, auf 384 Well-Mikrotiterplatten vorgefertigten genomischen DNA-

Templates wurden dann mit einer Mehrkanalpipette manuell zu den Mastermixen dazu pipettiert.

Dabei ergab sich pro Einzelreaktion folgender Ansatz:

1,08 µl LiChrosolv H₂O (Merck, Darmstadt, D)
 2,50 µl genomisches DNA-Template (1 ng/µl)
 0,50 µl 2 mM dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D)
 0,50 µl 10x PCR-Puffer (QIAGEN, Hilden, D)
 0,20 µl 25 mM MgCl₂ (QIAGEN, Hilden, D)
 0,10 µl forward PCR-Primer (10 pmol/µl)
 0,10 µl reverse PCR-Primer (10 pmol/µl)
 0,02 µl HotStar TaqTM DNA Polymerase (5 U/µl) (QIAGEN, Hilden, D)

Die Amplifikationen erfolgten auf PCR PTC 225 Tetrad Peltier Thermal Cyclern der Fa. MJ Research (Boston, USA) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

95°C	15 min	einleitender Denaturierungsschritt	1 Zyklus
95°C	20 s	Denaturierung	} 45 Zyklen
X°C	30 s	Annealing der Primer	
72°C	1 min	Elongation	
72°C	3 min	Elongation	1 Zyklus
4°C	unendlich		

c) Primer-Extensions-Reaktion

SAP-Behandlung, Primer-Extensions-Reaktion sowie Reinigung mit dem Ionenaustauscher-Harz wurden nach einem Standardprotokoll der Fa. SEQUENOM (siehe Handbuch) durchgeführt.

d) MALDI-TOF Massenspektrometrie

Nach Abzentrifugieren des Ionenaustauscher-Harzes wurden 1-2 nl der Proben mit dem SpectroPOINTTM nanoliter pipetting system der Fa. SEQUENOM (Hamburg, D) auf einen 384-Spot Siliziumchip transferiert, welcher ebenfalls mit einer kristallinen Matrix (3-Hydroxypicolinsäure) beladen war und 10 Extra-Spots für den Kalibranten enthielt. Die Messung und Analyse der Proben erfolgte in gleicher Weise wie für die PROBE-Reaktion beschrieben.

2.3.1.13.3 Assay-Design - Konstruktion von PCR- und Extensions-Primern

Ein Hochdurchsatz-Verfahren, wie es die Genotypisierung von SNPs mittels MALDI-TOF MS darstellt, erfordert ein optimales Assay-Design. So müssen die Molekülmassen der PCR- und Extensions-Primer genau aufeinander abgestimmt sein. Auch dürfen die Extensions-Primer nicht zu lang sein (Optimum: 16-25 bp), da ihr Molekulargewicht und das der Extensions-Produkte sonst zu groß wäre für eine massenspektrometrische Analyse. Um solche Schwierigkeiten zu vermeiden, wurden alle verwendeten Assays mit dem SpectroDESIGNERTM-Programm der Fa. SEQUENOM (Hamburg, D) konstruiert, welches auch gleich die zu erwartenden Molekülmassen der Primer sowie der Extensions-Produkte berechnet.

Eine Übersicht über alle PCR- und Extensions-Primer und die zu erwartenden Extensions-Produkten ist im Anhang aufgelistet.

2.3.2 Statistische Methoden

2.3.2.1 Überprüfung der Genotypenkonformität innerhalb der Familien - Mendel-Check

Die Überprüfung der Genotypenkonformität innerhalb einzelner Familien der Asthma-Familienstudie gemäß den Mendelschen Vererbungsgesetzen wurde für jeden genotypisierten SNP mit dem, von G. Fischer (Institut für Epidemiologie, Helmholtz-Zentrum München) aufbereiteten, Mendel-Check-Programm des SIB-PAIR-Softwarepakets von David L. Duffy (SIB-PAIR Version 0.99.9, davidD@qimr.edu.au) durchgeführt.

2.3.2.2 Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)

Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt, dass innerhalb einer Population sowohl Allel- als auch Genotypfrequenzen über Generationen hinweg konstant bleiben (konstanter Zustand der Häufigkeitsverteilungen = Gleichgewicht). Dies gilt jedoch nur, wenn die Population hinreichend groß ist und die Partnerwahl innerhalb der Population zufällig, d.h. unabhängig vom Genotyp erfolgt (Panmixie, „random mating“), keine Mutationen auftreten, kein Selektionsdruck herrscht und keine Migration in bzw. aus der Population statt findet. Unter diesen Voraussetzungen gilt das Hardy-Weinberg-Gesetz für die Beziehung zwischen Allel- und Genotypfrequenzen innerhalb einer Population.

Für einen biallelischen Marker, wie ihn ein SNP darstellt, sei p die Frequenz des Allels A, q diejenige des Allels B. Somit gilt $p+q = 1$. Unter Panmixie ist dann die Wahrscheinlichkeit für eine Person homozygot für das Allel A zu sein p^2 , die Wahrscheinlichkeit homozygot für das

Allel B zu sein q^2 und die Wahrscheinlichkeit heterozygot, AB, zu sein $2pq$. Diese Beziehung zwischen den Allel- und Genotypfrequenzen wird durch das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium, kurz HWE) dargestellt:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p+q)^2 = 1$$

Somit lassen sich Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht häufig schon dadurch erkennen, dass sich in der untersuchten Stichprobe zu viele homozygote Personen befinden. Um vor allem Genotypisierungsfehler weitestgehend auszuschließen, wurde jeder untersuchte SNP auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft. Da sich das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf die Population bezieht, flossen in den entsprechenden Test nur die Genotypen der Eltern (also vermeintlich nicht genetisch verwandte Individuen) ein. Dazu wurde für jeden Genotyp die Gesamtzahl in der Stichprobe ausgezählt und die Verteilung der Genotypen mittels eines Softwarepakets des Instituts für Humangenetik des Helmholtz-Zentrums München statistisch getestet (<http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html> und dort zitierte Literatur). Dabei wurde sowohl der „goodness-of-fit“ χ^2 -Test von Pearson als auch die Methode von Elston und Forthofer verwendet, wobei letztere den genaueren Test für kleine Stichproben (sehr seltene SNPs) darstellt (Elston und Forthofer, 1977). Die p-Werte sind für beide Verfahren angegeben.

2.3.2.3 Reconstruction-Combined TDT (RC-TDT)

Der von Spielman 1993 entwickelte „Transmission-Disequilibrium-Test“, kurz TDT (Spielman et al., 1993), ist ein familienbasierter Assoziationstest, der sich von reinen Assoziationstests dadurch unterscheidet, dass gleichzeitig auf Kopplung („linkage“) zwischen einem Markerlocus (z.B. SNP) und einem mutmaßlichen krankheitsverursachenden Locus als auch auf Assoziation (aufgrund eines Kopplungsungleichgewichts) zwischen diesen beiden Loci getestet wird (Spielman et al., 1993; Spielman und Ewans, 1996). Dadurch entstehen keine Verzerrungen durch stratifizierte Populationen, wie es die Gefahr bei populationsbezogenen Fall-Kontroll-Studien ist. Stratifizierte Populationen sind solche, die aus mehreren Subpopulationen entstanden sind und noch nicht lange genug der Panmixie unterliegen.

Mit dem TDT wird überprüft, ob heterozygote Eltern ein bestimmtes Allel signifikant häufiger an ihre erkrankten Kinder weitergeben, als nach den Mendelschen Regeln zu erwarten wäre, wenn keine Kopplung bzw. Assoziation bestünde (Spielman et al., 1993). Die

statistische Analyse erfolgt dabei mit einem χ^2 -Test für verbundene Stichproben über eine Kontingenztafel für biallelische Marker (2x2 Kontingenztafel) (Spielman et al., 1993; Spielman und Ewans, 1996).

Bei dem von Michael Knapp entwickelten „Reconstruction-Combined Transmission-Disequilibrium“-Test, kurz RC-TDT (Knapp, 1999a), handelt es sich um eine Variante des klassischen TDTs von Spielman (Spielman et al., 1993) bei dem auch Familien in die Berechnungen einfließen, für die keine bzw. nur teilweise Informationen über die Genotypen der Eltern vorliegen (Knapp, 1999a). In solchen Fällen werden die Genotypen der Eltern anhand der Genotypen der Kinder rekonstruiert, wobei alle Geschwister der jeweiligen Familie, erkrankte als auch nicht erkrankte, herangezogen werden (Knapp, 1999a). Dabei wird der aus der Rekonstruktion resultierende systematische Fehler (Bias) korrigiert (Knapp, 1999a und b). Weiterhin ist die Kalkulation exakter p-Werte möglich (Knapp, 1999b). Zwar fließen alle genotypisierten Familien in die Berechnungen ein, jedoch sind nur solche Familien informativ, bei denen mindestens ein Elternteil heterozygot für das zu testende Allel ist. Dabei bilden die Erkrankten (Kinder) die Fallgruppe, die Kontrollgruppe besteht aus „künstlichen“ Individuen (Pseudokontrollen), deren Genotyp aus den nicht an die erkrankten Kinder weitergegebenen Allelen der Eltern gebildet wird.

Der RC-TDT wurde für das qualitative Merkmal Asthma durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten für alle untersuchten SNPs als auch für den GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens. Für letzteren wurde die Programmversion für multiallelische Marker verwendet (S. Loesgen, persönliche Mitteilung).

Die statistischen Analysen für den RC-TDT wurden von Diplom-Statistikerin Sabine Loesgen (<http://www.loesgen.com>) unter Verwendung der RC-TDT Software Version 1.0 von Michael Knapp (Knapp, 1999b) durchgeführt.

2.3.2.4 Quantitativer TDT

Um innerhalb der Familienstudie auf Assoziation zu testen, wurde für die quantitativen Merkmale Gesamt-IgE-Spiegel, Eosinophilenzellzahl, SLOPE und Peak-Flow ein quantitativer TDT, QTD (Abecasis et al., 2000a und b), durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit dem erweiterten orthogonalen Modell von Abecasis (Abecasis et al., 2000a und b, <http://www.well.ox.ac.uk/asthma/QTD>) unter Verwendung der Genotypen aller Familienmitglieder und Einbeziehung von Alter und Geschlecht als Ko-Variablen (S. Loesgen, persönliche Mitteilung). Die Wahrscheinlichkeitstest basierten dabei auf einem Permutationsverfahren mit 1.000 Permutationen (S. Loesgen, persönliche Mitteilung). Auch

hier bestand die Kontrollgruppe aus „künstlichen“ Individuen (Pseudokontrollen), deren Genotyp aus den nicht an die erkrankten Kinder weitergegebenen Allelen der Eltern gebildet wird. Um eine bessere Anpassung an die Normalverteilung zu erhalten, wurden im Falle des Gesamt-IgE-Spiegels die Werte logarithmiert (\ln IgE). Die Berechnungen wurden für alle untersuchten SNPs als auch für den GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens durchgeführt. Für letzteren wurde die Programmversion für multiallelische Marker verwendet, mit der ein globaler p-Wert errechnet wird (<http://www.well.ox.ac.uk/asthma/QTDT>).

Die statistischen Analysen für den QTDT wurden von Diplom-Statistikerin Sabine Loesgen (<http://www.loesgen.com>) durchgeführt, wobei das QTDT-Softwarepaket Version 2.2.1 von Abecasis verwendet wurde (<http://www.well.ox.ac.uk/asthma/QTDT>).

2.3.2.5 Bestimmung von Haplotypen

Für die 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens wurde die Bestimmung der Haplotypen sowie deren Frequenzen mit einem nach K. Rohde und R. Fuerst modifizierten „Expectation-Maximization“- (EM-) Algorithmus (Excoffier und Slatkin, 1995) durchgeführt. Dieser unterscheidet sich von der ursprünglichen Methode insofern, dass in die Berechnungen zusätzlich die Information der Kernfamilien einbezogen wird (Rohde und Fuerst, 2001).

So erfolgt die Abschätzung der Haplotypenfrequenzen über die Eltern als genetisch unabhängige Personen, während der Genotyp der Kinder dazu benutzt wird, solche Haplotypenpaare von der Analyse auszuschließen, die zwar mit dem Genotyp der Eltern, aber nicht mit dem ihrer Kinder vereinbar sind. Dies führt zu einer genaueren Abschätzung der Haplotypenfrequenzen (Rohde und Fuerst, 2001).

Die statistischen Analysen wurden von Herrn Dr. Klaus Rohde (Bioinformatik, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, D) durchgeführt.

2.3.2.6 Assoziation von Haplotypen mit den quantitativen Merkmalen

Der Test auf Assoziation der *STAT6*-Haplotypen mit den quantitativen Merkmalen Gesamt-IgE-Spiegel, Eosinophilenzellzahl und SLOPE wurde mit dem von D. Rabinowitz entwickelten quantitativen TDT (Rabinowitz, 1997) in abgewandelter Form durchgeführt (K. Rohde, persönliche Mitteilung). Dabei wurden anstelle der multiplen Allele an einem Locus die geschätzten Haplotypen eingesetzt, wobei die Statistik über 10.000 Permutationen erfolgte. Eine Justierung der Daten bezüglich Alter und Geschlecht erfolgte nicht. Das verwendete Computerprogramm „haptdx“ wurde von Herrn Dr. K. Rohde entwickelt. Zur

Überprüfung der Normalverteilung der Merkmale wurden die Rangsummentests Kruskal-Wallis-Test und Wilcoxon-Test angewendet (K. Rohde, persönliche Mitteilung).

Die statistischen Analysen wurden von Herrn Dr. Klaus Rohde (Bioinformatik, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin, D) durchgeführt.

2.3.2.7 Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts zwischen SNPs

(„**pairwise linkage disequilibrium**“; **pairwise LD**)

Der Test für die Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts zwischen den einzelnen SNPs des humanen *STAT6*-Gens erfolgte paarweise für alle Zweier-Kombinationen der 13 SNPs und wurde mit der „Maximum-Likelihood“-Methode von Excoffier und Slatkin (Excoffier und Slatkin, 1995) unter Verwendung von 10.000 Permutationen durchgeführt (Software-Paket: Arlequin Release 2.001).

3. Ergebnisse

3.1 Analyse des humanen *NOS1*-Gens

Das humane *NOS1*-Gen ist ein „single-copy“ Gen (nur eine Gen-Kopie im gesamten Genom), das für die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase („neuronal nitric oxide synthase“) kodiert und auf der chromosomalen Region 12q24.2-24.31 lokalisiert ist (Xu et al., 1993; Hall et al., 1994). Es besteht aus 29 Exons, 28 Introns und einer „upstream“ des ersten Exons gelegenen Promotorregion, die sich zusammen über eine mehr als 160 kb umfassende genomische Sequenz erstrecken (Hall et al., 1994). Der Translationsstartpunkt für das 1.434 Aminosäure große Protein befindet sich in Exon 2, so dass Exon 1 die 5'UTR darstellt (Hall et al., 1994). Die 3'UTR wird von den letzten zwei Dritteln von Exon 29 gebildet (Hall et. al., 1994).

In einer früheren Veröffentlichung wurden für das humane *NOS1*-Gen zwei SNPs beschrieben, von denen einer in Exon 18 lokalisiert ist (*NOS1* Ex18SNP1), der andere in der 3'UTR von Exon 29 (*NOS1* Ex29SNP1) (Grasemann et al., 1999a; Tabelle 3.1, Spalte 4). Bei beiden SNPs handelt es sich um eine C>T-Transition, die jedoch, im Falle von Exon 18, zu keinem Aminosäureaustausch führt (Grasemann et al., 1999a; Tabelle 3.1, Spalte 2). Für den SNP in Exon 29 konnte in einer Fall-Kontroll-Studie eine Assoziation mit dem asthmatischen Phänotyp gefunden werden (Grasemann et al., 1999a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob auch in der deutschen Asthma-Familienstudie eine Kopplung/Assoziation dieser SNPs mit Asthma und/oder den Asthma-assoziierten, quantitativen Merkmalen, erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und dem Lungenfunktionsparameter SLOPE (Erklärung siehe Abschnitt 1.5.3), nachgewiesen werden kann. Dies erforderte zunächst einmal die erfolgreiche Validierung der SNPs, an die sich eine möglichst vollständige Genotypisierung aller zur Verfügung stehenden Familien anschloss. Die Daten wurden im darauffolgenden statistisch analysiert und auf Assoziation bzw. Kopplung getestet.

3.1.1 Validierung der *NOS1*-SNPs in der Asthma-Familienstudie

Zur Validierung der *NOS1*-SNPs in der Asthma-Familienstudie wurden die entsprechenden genomischen Sequenzen von jeweils 30 zufällig ausgewählten, genetisch unabhängigen Probanden (Eltern) der Asthma-Familienstudie spezifisch amplifiziert und die PCR-Fragmente mittels Sequenzierung überprüft. Dabei konnten für beide SNPs alle drei Allelkombinationen, homozygot CC, heterozygot CT und homozygot TT, nachgewiesen werden.

Die Position der SNPs in bp bezüglich der mRNA des *NOS1*-Gens (GenBank Accession-Nr.: NM_00620, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sowie die entsprechenden Referenznummern für die öffentliche SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) sind in Tabelle 3.1, Spalte 2, 3 und 6 wiedergegeben.

SNP	Position in bp entsprechend mRNA	GenBank Accession-Nr.	Lage im Gen entsprechend der Exon / Intron- Grenzen	Genotyp.-Methode Sequenz. (S) / RFLP-Analyse (R)	GenBank ref. SNP Id (rs#) / GenBank Assay Id (ss#)
<i>NOS1</i> Ex18SNP1	3391C>T	NM_000620	Exon 18	R / S	1047735 / 1520025
<i>NOS1</i> Ex29SNP1	5266C>T	NM_000620	Exon 29 (3'UTR)	S	2682826 / 3787441

Tabelle 3.1: Übersicht über die beiden SNPs im humanen *NOS1*-Gen. Die Position der SNPs in bp bzgl. der mRNA des *NOS1*-Gens (GenBank Accession-Nr.: NM_000620, Spalte 3) ist in Spalte 2 wiedergegeben, die Lage im Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen in Spalte 4. Bei beiden SNPs handelt es sich um einen C>T-Austausch (Spalte 1). Die Genotypisierung in der Asthma-Familienstudie erfolgte für den SNP in Exon 18, *NOS1* Ex18SNP1, mittels RFLP-Analyse (R) und Sequenzierung (S), für den SNP in Exon 29, *NOS1* Ex29SNP1, nur mittels Sequenzierung (S) (Spalte 5). Beide SNPs sind bereits in die öffentliche SNP-Datenbank eingetragen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>; Spalte 6).

3.1.2 Genotypisierung der *NOS1*-SNPs in der Asthma-Familienstudie

Zu Beginn der Arbeit standen 108 Familien (474 Probanden, 216 Eltern, 258 Kinder) zur Verfügung, die möglichst vollständig genotypisiert werden sollten, um für nachfolgende Assoziationstests eine möglichst hohe Power (Teststärke) zu erreichen.

Eine computergestützte Sequenzanalyse ergab für den SNP in Exon 18 eine, für das C-Allel-spezifische, *Dra* III-Erkennungssequenz (Abbildung 3.1a), so dass die Genotypisierung innerhalb der Familienstudie zunächst mittels einer RFLP-Analyse (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse) erfolgen konnte. Dazu wurden die entsprechenden PCR-Fragmente einem *Dra* III-Restriktionsverdau unterzogen und das, bei der Agarosegelelektrophorese entstandene, Bandenmuster analysiert. Die PCR-Primer wurden dabei so gewählt, dass das resultierende 179 bp große PCR-Fragment keine zusätzlichen *Dra* III-Schnittstellen enthielt (Abbildung 3.1a). Für das C-Allel homozygote Probanden zeigten demnach zwei Banden, ein 118 bp großes Fragment und ein 61 bp großes Fragment, während im Falle einer TT-Homozygotie nur das ungeschnittene 179 bp große PCR-Fragment

zu finden war (Abbildung 3.1b). Bei heterozygoten Probanden dagegen wurden alle drei Fragmente nachgewiesen (Abbildung 3.1b).

Die Genotypisierungsrate lag für diese Methode bei ca. 65%. Ein in vielen Fällen zu beobachtender Partialverdau erschwerte die Unterscheidung zwischen heterozygoten und homozygoten Fällen. Zur Überprüfung der Ergebnisse, wie auch zur Vervollständigung der Genotypisierung, wurde deshalb zusätzlich eine Sequenzierung der PCR-Fragmente durchgeführt. Dabei stimmten 70% der Ergebnisse des Verdau mit denen der Sequenzierung überein. Probanden, für die auch nach einer zweiten Sequenzierung noch kein eindeutiger Genotyp bestimmt werden konnte, wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Insgesamt wurde für den *NOS1* Ex18SNP1 eine Genotypisierungsrate von ca. 85% erreicht.

a)

forward PCR-Primer

1 GTTCTCAGTT TTTGGCCTCG GCTCACGAGC ATACCCTCAC TTTTGCGCCT
CAAGAGTCAA AAACCGGAGC CGAGTGCTCG TATGGGAGTG AAAACGCGGA

***Dra* III**

51 TCGGACACGC TGTGGACACC CTCCTGGAAG AACTGGGAGG GGAGAGGATC
AGCCTGTGCG ACACCTGTGG GAGGACCTTC TTGACCCTCC CCTCTCCTAG

101 CTGAAGATGA GGAAGGGGA TGAGCTCTGT GGGCAGGAAG AGGCTTTCAG
GACTTCTACT CCTTCCCCT ACTCGAGACA CCCGTCCTTC TCCGAAAGTC

151 GACCTGGGCC AAGAAGGTCT TCAAGGTAA
CTGGACCCGG TTCTTCCAGA AGTTCCATT

reverse PCR-Primer

b)

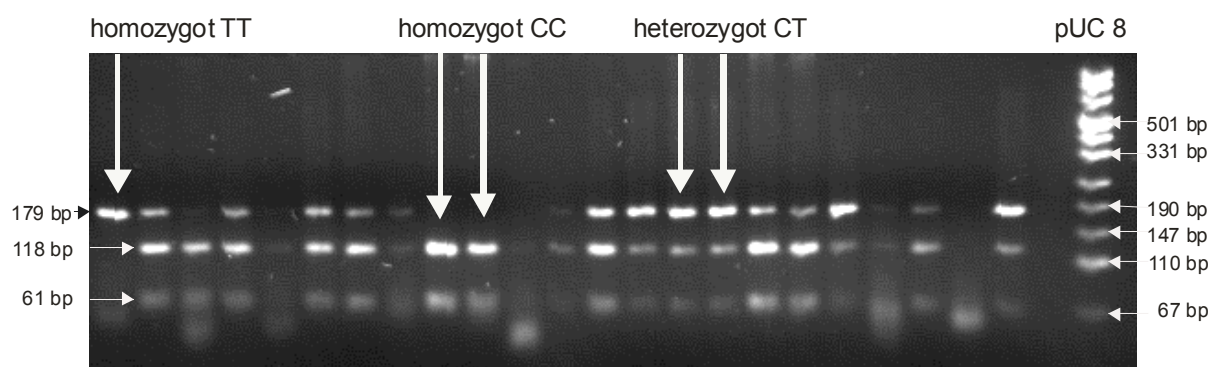


Abbildung 3.1: RFLP-Analyse des SNPs *NOS1* Ex18SNP1 mittels *Dra* III-Restriktionsverdau. a) Gezeigt ist das 179 bp große PCR-Produkt mit der für das C-Allel (rot) spezifischen *Dra* III-Erkennungssequenz (blau). Die beiden PCR-Primer sind grün markiert. b) Agarosegelelektrophorese des *Dra* III-Verdau. Spur 1: homozygot TT, Spur 2: homozygot CC, Spur 3: heterozygot CT, Spur 4: pUC 8-Längenstandard.

Die Genotypisierung des SNPs in Exon 29, *NOS1* Ex29SNP1, erfolgte ausschließlich mittels Sequenzierung der entsprechenden PCR-Fragmente (Tabelle 3.1, Spalte 5). Die Genotypisierungsrate lag dabei bei 87%.

Im Anschluss an die Genotypisierungen wurde für beide SNPs des *NOS1*-Gens ein computergestützter Test durchgeführt, bei dem für jede Familie die elterlichen Genotypen auf Konformität mit den Genotypen ihrer Kinder überprüft wurden („Mendel-Check“). Dabei wurden für beide SNPs keinerlei Unstimmigkeiten festgestellt. Weiterhin zeigten sich keine Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (p -Werte $> 0,05$; Tabelle 3.2, Spalte 5), so dass Genotypisierungsfehler weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

SNP	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allel 11	Anzahl der Eltern [N] heterozygot Allel 12	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allel 22	p-Wert nach Pearson's Test / Elston + Forthofer
<i>NOS1</i> Ex18SNP1	78	92	24	0,6954 / 0,7571
<i>NOS1</i> Ex29SNP1	86	75	18	0,7820 / 0,8611

Tabelle 3.2: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die beiden SNPs des humanen *NOS1*-Gens. Die p -Werte sind für beide SNPs des *NOS1*-Gens einmal für den Test nach Pearson sowie für die Methode von Elston & Forthofer angegeben (Elston und Forthofer, 1977; <http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>; Spalte 5). P -Werte $< 0,05$ bedeuten eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Nur die elterlichen Genotypen flossen in die Tests ein. Spalte 2: Anzahl der Eltern, die homozygot für das Allel C (Allel 1) sind. Spalte 3: Anzahl der heterozygoten Eltern (CT, Allel 12). Spalte 4: Anzahl der Eltern, die homozygot für das Allel T (Allel 2) sind.

3.1.3 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen

Um einen besseren Bezug zu den Ergebnissen der genomweiten Suche (Wjst et al., 1999a) und der anschließenden Mikrosatelliten-Feinkartierung (Immervoll et al., 2001) herzustellen, flossen in die statistischen Analysen für die beiden SNPs des *NOS1*-Gens zunächst nur die 97 Familien ein, die auch für die vorangegangenen Studien herangezogen worden waren (Immervoll et al., 2001; Illig, persönliche Mitteilung). Die elterlichen Allelverteilungen sind sowohl in absoluten Zahlen als auch als relative Frequenzen in Tabelle 3.3 wiedergegeben.

Die statistische Analyse für Asthma erfolgte mit dem RC-TDT („Reconstruction-Combined Transmission-Disequilibrium-Test“; Knapp, 1999a und b), wobei definitionsgemäß alle genotypisierten Kinder aus allen Familien in die Berechnungen einfließen (Loesgen,

persönliche Mitteilung). Dabei wurde weder für den SNP in Exon 18, *NOS1* Ex18SNP1, noch denjenigen in Exon 29, *NOS1* Ex29SNP1, Kopplung/Assoziation mit Asthma nachgewiesen (p-Werte > 0,05; Tabelle 3.3, Spalte 5; Immervoll et al., 2001).

SNP	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]	RC-TDT p-Wert Asthma
<i>NOS1</i> Ex18SNP1	1 (C)	219	63,29	0,3010
	2 (T)	127	36,71	
<i>NOS1</i> Ex29SNP1	1 (C)	226	68,48	0,7971
	2 (T)	104	31,52	

Tabelle 3.3: Kopplungs-/Assoziationsanalyse für die beiden SNPs des humanen *NOS1*-Gens mit Asthma.

Die Analysen erfolgten mit dem RC-TDT (Knapp, 1999a und b), wobei nur die 97 Familien in die Berechnungen einfließen, die auch für die genomweite Suche und die Feinkartierung herangezogen wurden. Keiner der beiden SNPs des *NOS1*-Gens zeigte eine Kopplung/Assoziation mit Asthma (p-Werte > 0,05; Spalte 5). Die elterlichen Allelverteilungen für die 97 Familien sind sowohl in absoluten Zahlen [N] als auch in relativen Frequenzen [%] wiedergegeben (Spalte 3 und 4).

Um den Einfluss der SNPs auf die quantitativen Merkmale erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und erhöhter SLOPE zu testen, wurde für die beiden SNPs ein quantitativer TDT, kurz QTDT (Abecasis et al., 2000a und b), durchgeführt. Dabei wurden die Genotypen aller Familienmitglieder berücksichtigt. Da die Ausprägung der quantitativen Phänotypen alters- und geschlechtsabhängig ist, flossen zusätzlich Alter und Geschlecht als Ko-Variablen in die Berechnungen ein. Die Analysen erfolgten sowohl für die schon erwähnten 97 Familien (S1) als auch für alle 108 Familien (S2). Es wurde für keine der beiden Stichproben eine Assoziation der SNPs mit den quantitativen Merkmalen nachgewiesen (p-Werte > 0,05; Tabelle 3.4).

Da sich für die quantitativen Analysen bezüglich der Signifikanzen keine Unterschiede zwischen den beiden Stichproben (97 Familien und alle 108 Familien) ergaben, wurde darauf verzichtet, auch die Assoziationsanalyse für Asthma mit allen 108 Familien durchzuführen.

SNP	mit erhöhtem Gesamt-IgE assoziiertes Allel	p-Wert Gesamt-IgE	mit erhöhter Eos.zellzahl assoziiertes Allel	p-Wert Eos.zellzahl	mit erhöhtem SLOPE assoziiertes Allel	p-Wert SLOPE
NOS1 Ex18SNP1	S1: 2 (T) S2: 2 (T)	> 0,1000 > 0,1000	S1: 2 (T) S2: 2 (T)	> 0,1000 0,0690	S1: 2 (T) S2: 2 (T)	0,0510 0,0540
NOS1 Ex29SNP1	S1: 2 (T) S2: 2 (T)	> 0,1000 > 0,1000	S1: 2 (T) S2: 2 (T)	> 0,1000 0,0710	S1: 2 (T) S2: 2 (T)	> 0,1000 > 0,1000

Tabelle 3.4: Assoziationsanalyse für die beiden SNPs des humanen *NOS1*-Gens mit den quantitativen Merkmalen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und erhöhter SLOPE. Die Analysen erfolgten mit dem QTDT (Abecasis et al., 2000a und b) und wurden einmal für die 97 Familien (S1) als auch für alle 108 Familien (S2) durchgeführt. In beiden Fällen wurde für keinen der beiden SNPs des *NOS1*-Gens eine Assoziation mit den quantitativen Phänotypen nachgewiesen (p-Werte alle > 0,05; Spalte 3,5 und 7). In Spalte 2,4 und 6 ist der Einfluss des jeweiligen Allels auf den quantitativen Phänotyp in Form einer deskriptiven Statistik wiedergegeben. Der Einfluss ist nur dann von Bedeutung, wenn auch der p-Wert signifikant ist ($p < 0,05$).

3.2 Analyse des humanen *STAT6*-Gens

Das ca. 19 kb umfassende *STAT6*-Gen, welches in der chromosomalen Region 12q13.3-q14.1 lokalisiert ist, besteht aus 23 Exons und 22 Introns, wobei die ersten beiden Exons nicht-kodierend sind (5'UTR) (Patel et al., 1998). Von den insgesamt 1.350 bp von Exon 23 kodieren nur die ersten 186 bp für das insgesamt 847 Aminosäure große Protein, die restlichen 1.164 bp stellen die 3'UTR dar (Patel et al., 1998). Dem Gen ist eine ca. 3,6 kb große Region vorgeschaltet (5'flankierende Region), die Promotor- und Enhancerelemente enthält (Patel et al., 1998).

Im Rahmen der Arbeit wurden alle 23 Exons als auch die upstream gelegene Promotorregion des Gens systematisch auf das Vorhandensein von Polymorphismen, insbesondere SNPs, untersucht und diese dann in der Asthma-Familienstudie auf Assoziation mit Asthma und den quantitativen Phänotypen getestet.

3.2.1 Identifizierung von SNPs im humanen *STAT6*-Gen

Die Suche nach SNPs im humanen *STAT6*-Gen erfolgte mit der genomischen DNA von 32 unabhängigen Probanden, darunter 16 Asthmatiker und 16 Nicht-Asthmatiker, einer populationsbezogenen Studie (KORA S4-Studie, vgl. Abschnitt 2.1.2). Hierzu wurden die entsprechenden genomischen Bereiche spezifisch amplifiziert und mittels Sequenzierung überprüft. Die PCR-Primer wurden dabei so gewählt, dass die resultierenden PCR-Fragmente jeweils ein komplettes Exon und ca. 20-100 bp der benachbarten Introns beinhalteten. So bestand die Möglichkeit, auch intronische SNPs zu finden, die einen Einfluss auf den Spleißmechanismus haben könnten. Wegen seiner Größe (1.350 bp) wurde Exon 23 in vier, sich überlappende PCR-Fragmente aufgeteilt. Die Analyse der Promotorregion erfolgte mit sieben, sich ebenfalls überlappenden PCR-Fragmenten (*STAT6* Promotorregion Teil 1-7, PCR-Primer siehe Anhang). Aufgrund zweier GT-Repeats schlug die Sequenzierung des 6. PCR-Fragments, *STAT6* Promotorregion Teil 6 fehl, so dass nur ca. 2,9 kb der Promotorregion abgedeckt wurden.

Mit dieser Strategie konnten insgesamt 10 biallelische SNPs identifiziert werden. Zwei dieser SNPs, *STAT6* 5'flankingSNP1 und *STAT6* 5'flankingSNP2, sind in der Promotorregion des Gens lokalisiert (Tabelle 3.5 und Abb. 3.6). Bei dem ersten SNP, *STAT6* 5'flankingSNP1, handelt es sich um einen G>A Austausch, der 1.771 bp upstream des bekannten Transkriptionsstartpunkts liegt (Patel et al., 1998) und 77 bp upstream einer CCAAT-Box, die ein mutmaßliches Enhancerelement darstellt (Patel et al., 1998). Der zweite SNP der Promotorregion, *STAT6* 5'flankingSNP2, ist ein C>T-Austausch, welcher 1.216 bp upstream

des Transkriptionsstartpunkts lokalisiert ist und 474 bp downstream der CCAAT-Box. Von den weiteren acht SNPs sind drei intronisch, wobei einer in Intron 16 (*STAT6* In16SNP1), einer in Intron 17 (*STAT6* In17SNP1) und einer in Intron 18 (*STAT6* In18SNP1) lokalisiert ist (Tabelle 3.5). Die restlichen fünf SNPs, hier mit *STAT6* 3'UTRSNP1-5 bezeichnet, befinden sich alle in der 3'UTR von Exon 23 (Tabelle 3.5). Der erste SNP der 3'UTR, *STAT6* 3'UTRSNP1, liegt dabei 258 bp downstream des Translationsendes. Es konnte kein SNP in der kodierenden Region gefunden werden.

Bis auf den fünften SNP in der 3'UTR, *STAT6* 3'UTRSNP5, existiert mittlerweile für jeden der gefundenen SNPs ein Datenbankeintrag (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, Tabelle 3.5, Spalte 7). Eine Zusammenfassung über die gefundenen SNPs, ihre Position in bp entsprechend der jeweiligen GenBank Accession-Nummer sowie die jeweiligen Referenznummern für die öffentliche SNP-Datenbank finden sich in Tabelle 3.5.

3.2.2 Genotypisierung der *STAT6*-SNPs in der Asthma-Familienstudie

Für nachfolgende Kopplungs- und Assoziationsstudien wurden alle 10 SNPs des humanen *STAT6*-Gens in 108 Familien (474 Probanden, 216 Eltern, 258 Kinder) der Asthma-Familienstudie genotypisiert, wobei für die einzelnen SNPs unterschiedliche Genotypisierungsmethoden verwendet wurden (Tabelle 3.5, Spalte 6). Dabei konnten alle 10 SNPs als biallelisch bestätigt werden.

Die Genotypisierung des ersten SNPs in der Promotorregion, *STAT6* 5'flankingSNP1, erfolgte zunächst mittels einer RFLP-Analyse (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse), wobei eine, für das G-Allel spezifische *Ava* I-Restriktionsschnittstelle genutzt wurde (Abbildung 3.2). Die PCR-Primer wurden dabei so gewählt, dass das resultierende 600 bp große PCR-Fragment keine zusätzlichen *Ava* I-Schnittstellen enthielt (Abbildung 3.2). Bei einer elektrophoretischen Auftrennung des *Ava* I-Restriktionsverdaus ergaben sich demnach im Falle einer GG-Homozygotie zwei Banden, ein 330 bp großes Fragment und ein 270 bp großes Fragment (Abbildung 3.3a). Für das A-Allel homozygote Probanden zeigten dagegen nur die 600 bp große Bande des ungeschnittenen PCR-Fragments, während im Falle einer Heterozygotie alle drei Banden nachzuweisen waren (Abbildung 3.3a). Dabei war das Bandenmuster in den meisten Fällen eindeutig (keine Partialverdaus). Aufgrund der hohen Ausfallraten bei der PCR lag die Genotypisierungsrate für diese Methode bei ca. 75%. Zur Überprüfung der Ergebnisse des *Ava* I-Verdaus wurden die PCR-Produkte sequenziert, wobei in 98% der Fälle die Ergebnisse der RFLP-Analyse bestätigt werden konnten. Die Vervollständigung der Genotypisierung erfolgte mittels Sequenzierung und in einigen Fällen auch mit MALDI-TOF Massenspektrometrie (Tabelle 3.5, Spalte 6; Abb. 3.3b und c).

SNP	Position in bp entsprechend der GenBank Accession-Nr.	Lage im Gen entsprech. Exon / Intron- Grenzen	GenBank Accession-Nr.	in Asthma- Studie bestätigt	Genotyp.-Methode MALDI-TOF MS (M) / Sequenzierung (S) / RFLP-Analyse (R)	GenBank ref. SNP Id (rs#) / GenBank Assay Id (ss#)
<i>STAT6</i> 5'flankingSNP1	1882G>A	Promotorregion	AF067572	ja	M / S / R	2598483 / 3654370
<i>STAT6</i> 5'flankingSNP2	2437C>T	Promotorregion	AF067572	ja	M	3001428 / 4225476
<i>STAT6</i> In2SNP1	5021C>T	Intron 2	AF067572	ja	M	167769 / 223750
<i>STAT6</i> In2SNP2	5814C>T	Intron 2	AF067572	ja	M	324012 / 414465
<i>STAT6</i> In2SNP3	6613C>T	Intron 2	AF067572	ja	M	324011 / 414464
<i>STAT6</i> In8SNP1	9114C>T	Intron 8	AF067572	nein	M	2626575 / 2386180
<i>STAT6</i> In8SNP2	9234C>G	Intron 8	AF067572	nein	M	2629435 / 2386181
<i>STAT6</i> In12SNP1	105936C>T	Intron 12	AC023237	nein	M	703816 / 1182241
<i>STAT6</i> In16SNP1	763A>C	Intron 16	AF067575	ja	M	3024972 / 4250935
<i>STAT6</i> In17SNP1	1309A>G	Intron 17	AF067575	ja	M	841718 / 1187093
<i>STAT6</i> In18SNP1	1570C>T	Intron 18	AF067575	ja	M	3024974 / 4250938
<i>STAT6</i> 3'UTRSNP1	4219G>A	3'UTR	AF067575	ja	M	324015 / 1298593
<i>STAT6</i> 3'UTRSNP2	4491A>G	3'UTR	AF067575	ja	M / S	703817 / 1332328
<i>STAT6</i> 3'UTRSNP3	4610A>G	3'UTR	AF067575	ja	S	1059513 / 1542078
<i>STAT6</i> 3'UTRSNP4	4671A>G	3'UTR	AF067575	ja	S	4559 / 7385
<i>STAT6</i> 3'UTRSNP5	4703A>G	3'UTR	AF067575	ja	S	neu

Tabelle 3.5: Übersicht über die 16 SNPs des humanen *STAT6*-Gens. Die Position der SNPs in bp entsprechend der jeweiligen GenBank Accession-Nummer (Spalte 4) ist in Spalte 2 wiedergegeben; ihre Lage entsprechend der Exon/Intron-Grenzen des Gens in Spalte 3. Die Annotation erfolgte mit Hilfe der Originaldaten von Patel und Kollegen (Patel et al., 1998) sowie Daten aus den öffentlichen Gen-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; siehe Accession-Nummern in Spalte 4). Mit Ausnahme von *STAT6* In2SNP1-3, *STAT6* In8SNP1-2 und *STAT6* In12SNP1, die direkt der öffentlichen SNP-Datenbank entnommen wurden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), wurden alle anderen SNPs mittels Sequenzanalyse gefunden. Bis auf den fünften SNP in der 3'UTR, *STAT6* 3'UTRSNP5, existiert mittlerweile für jeden der gefundenen SNPs ein Datenbankeintrag (Spalte 7). Die Genotypisierung innerhalb der Asthma-Familienstudie erfolgte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (M), Sequenzierung (S) und im Falle von *STAT6* 5'flankingSNP1 auch mittels einer RFLP-Analyse (R; Spalte 6). Während alle 10, durch Sequenzanalyse identifizierten, SNPs in der Asthma-Familienstudie bestätigt werden konnten, waren von den sechs SNPs aus den Datenbanken nur *STAT6* In2SNP1-3 vorhanden (Spalte 5).

forward PCR-Primer

```

1  GCCAGATTG CCTCTAAATT CTGTTTTTTC CCCTTACATC ACAGTGTTCC
   CGGTCTAAAC GGAGATTAA GACAAAAAAG GGAATGTAG TGTACAAGG
   .
   .
   .
201 TCTGACACCC TTAGATGGTG AAACCTGGCT TCACCTACTG TCTGTGGATG
    AGACTGTGGG AATCTACCAC TTTGGACCGA AGTGGATGAC AGACACCTAC
    .
    .
    .
251 TCTGCAGGCA GAGTGGGCAC|TCGGGAGCAC ATACAAAGCA CGTGTGCCGT
    AGACGTCCGT CTCACCCGTG AGCCTCTCGTG TATGTTTCGT GCACACGGCA
    .
    .
    .
301 GAACACGTAT GTGCACACAC CTTGATCCTA GCATGGCTTG TTGGACAAGC
    CTTGTGCATA CACGTGTGTG GAACTAGGAT CGTACCGAAC AACCTGTTTCG
    .
    .
    .
551 AAATAGTGCC TGACAGTTAC TGTGTGTCAG GCATTGTTCT AAGCCTTCAG
    TTTATCACGG ACTGTCAATG ACACACAGTC CGTAACAAGA TTCGGAAGTC
  
```

reverse PCR-Primer

Abbildung 3.2: RFLP-Analyse des SNPs *STAT6* 5'flankingSNP1 mittels *Ava* I-Restriktionsverdau. Gezeigt ist das 600 bp große PCR-Fragment. Die für das G-Allel (rot) spezifische *Ava* I-Schnittstelle ist blau markiert. Grün: PCR-Primer.

Für die restlichen neun SNPs des humanen *STAT6*-Gens erfolgte die Genotypisierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (vgl. Abbildung 3.3c und 3.4) oder Sequenzierung, im Fall von *STAT6* 3'UTRSNP2 auch mit beiden Methoden (Tabelle 3.5, Spalte 6).

Neben den 10, durch Sequenzanalyse identifizierten, SNPs wurden noch sechs weitere, aus der öffentlichen SNP-Datenbank bekannte SNPs in der Asthma-Familienstudie untersucht. Drei dieser SNPs sind in Intron 2 lokalisiert (*STAT6* In2SNP1-3, Tabelle 3.5, Spalte 3), zwei in Intron 8 (*STAT6* In8SNP1-2, Tabelle 3.5, Spalte 3) und einer in Intron 12 (*STAT6* In12SNP1, Tabelle 3.5, Spalte 3). Die Genotypisierung erfolgte für alle sechs SNPs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (Tabelle 3.5, Spalte 6). Es konnten jedoch nur die drei SNPs in Intron 2 bestätigt werden (Tabelle 3.5, Spalte 5). Demnach standen insgesamt 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens für weitere statistische Analysen zur Verfügung (Tabelle 3.5, Spalte 5), wobei die Genotypisierungsraten zwischen 88% (*STAT6* 3'UTRSNP5) und 97% (*STAT6* In18SNP1) lagen. Eine graphische Übersicht über die Lage der 13 SNPs entsprechend der Exon/Intron-Grenzen des Gens ist in Abbildung 3.6 wiedergegeben.

Bei keinem der 13 SNPs gab es Unstimmigkeiten zwischen den Genotypen der Eltern und denen der Kinder („Mendel-Check“). Auch waren für die elterlichen Genotypen keine Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht festzustellen (p-Werte > 0,05; Tabelle 3.6), so dass Genotypisierungsfehler weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

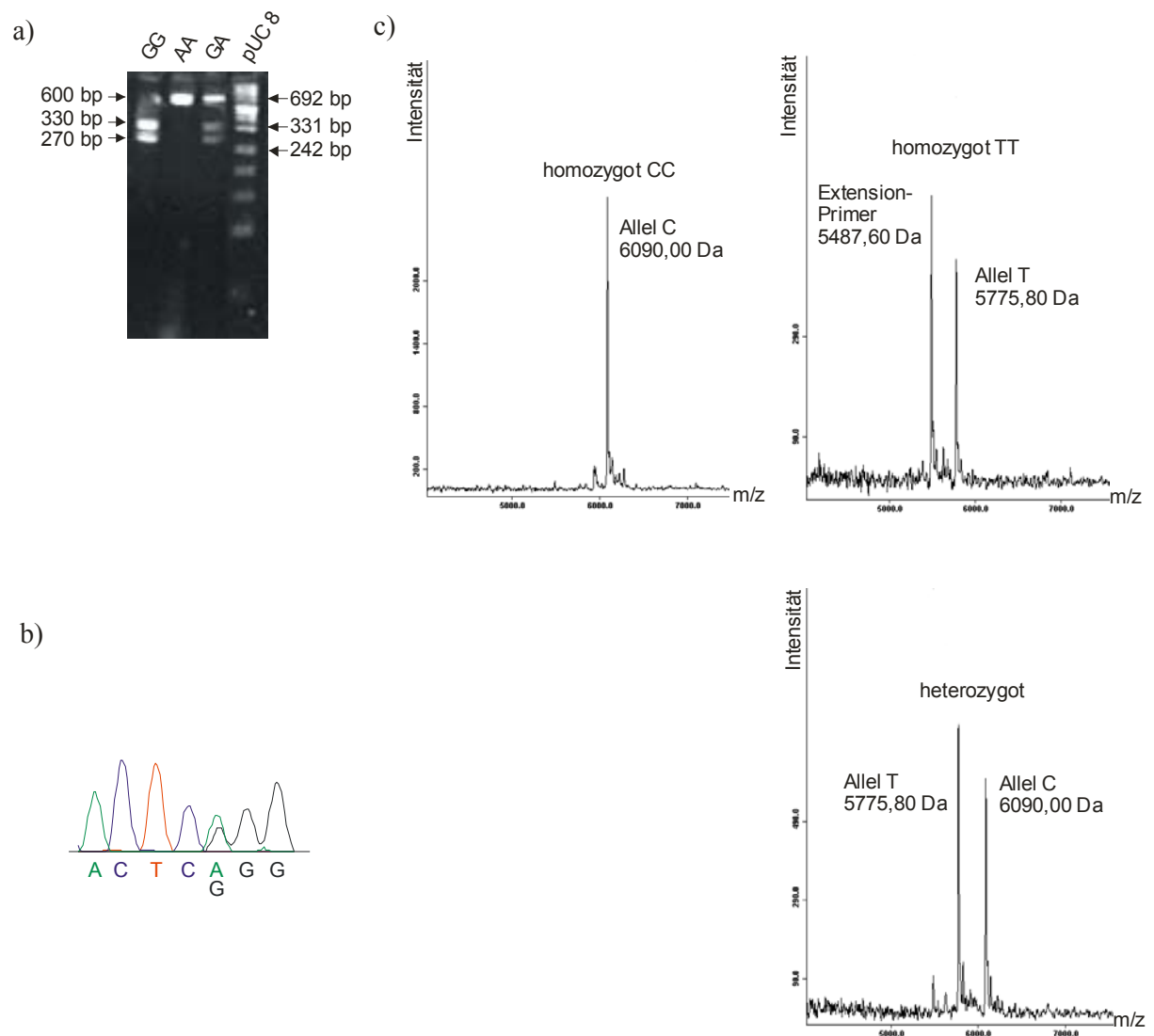


Abbildung 3.3: Übersicht über die drei Genotypisierungsmethoden des SNPs *STAT6* 5'flankingSNP1.

a) Agarosegelelektrophorese des *Ava* I-Restriktionsverdaus (RFLP-Analyse). Spur 1: homozygot GG, Spur 2: homozygot AA, Spur 3: heterozygot GA, Spur 4: pUC 8-Längenstandard. b) Sequenzierung. Gezeigt ist die Sequenz (forward Strang) eines, für den SNP heterozygoten Probanden (G/A-Doppelpeak). c) MALDI-TOF Massenspektrometrie. Gezeigt sind die Massenspektren für die Extensions-Produkte aller drei Allelkombinationen des SNPs. Die Angabe der Allele erfolgt für den reversen Strang (C/T statt G/A) entsprechend des hier verwendeten Extensions-Primers.

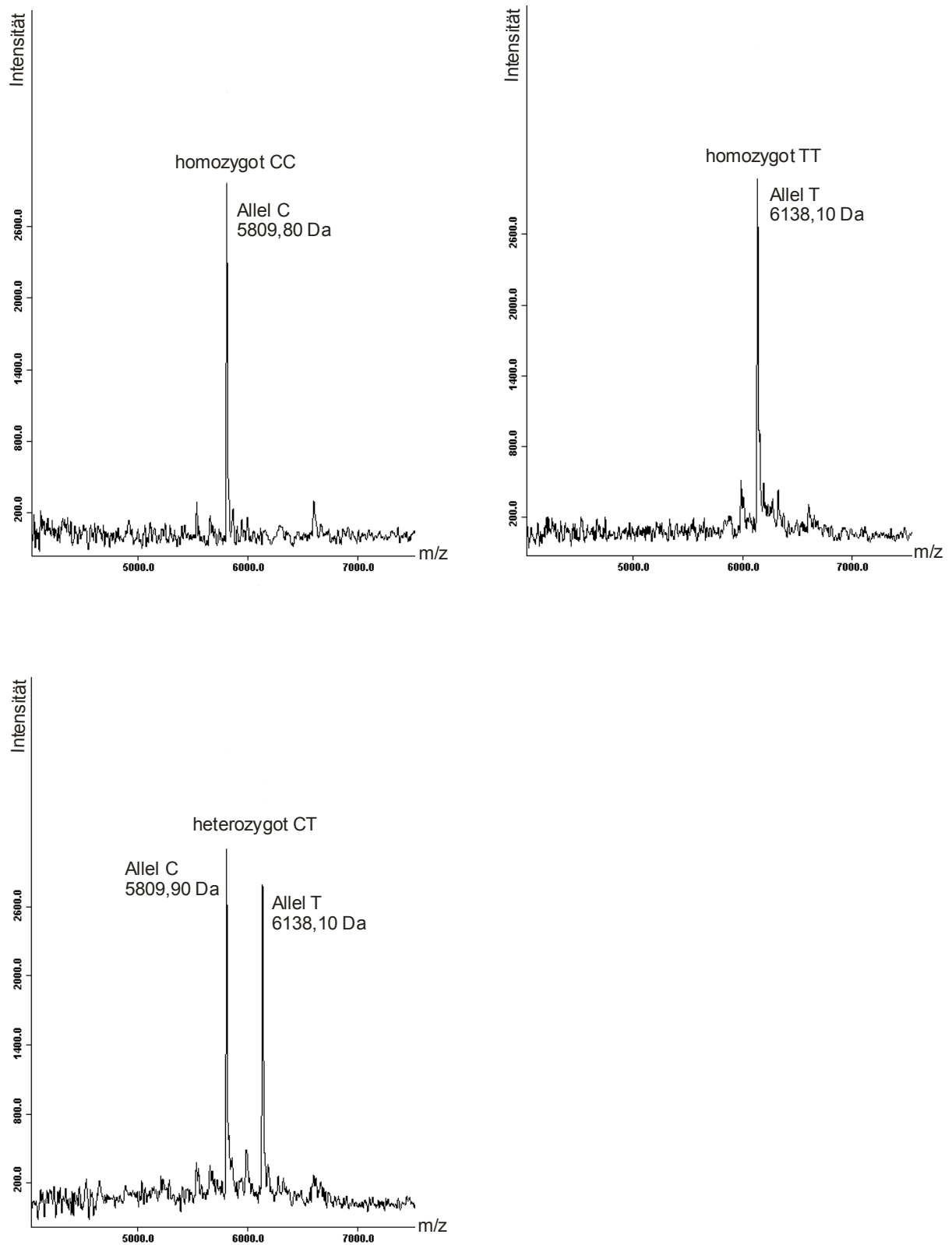


Abbildung 3.4: MALDI-TOF Massenspektrometrie des SNPs *STAT6* In18SNP1. Stellvertretend für alle mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie genotypisierten SNPs sind hier die Massenspektren der Extensions-Produkte für alle drei Allelkombinationen des SNPs in Intron 18, *STAT6* In18SNP1, dargestellt.

SNP	Anzahl der Eltern homozygot Allel 11	Anzahl der Eltern heterozygot Allel 12	Anzahl der Eltern homozygot Allel 22	p-Wert nach Pearson's Test / Elston + Forthofer
STAT6 5'flankingSNP1	170	34	1	0,6128 / 1,0000
STAT6 5'flankingSNP2	185	24	1	0,8165 / 0,5615
STAT6 In2SNP1	67	110	33	0,2719 / 0,3218
STAT6 In2SNP2	53	101	43	0,6940 / 0,7755
STAT6 In2SNP3	63	105	38	0,6189 / 0,6728
STAT6 In16SNP1	200	8	0	0,7773 / 1,0000
STAT6 In17SNP1	75	100	32	0,8884 / 1,0000
STAT6 In18SNP1	173	41	1	0,3835 / 0,7023
STAT6 3'UTRSNP1	123	71	13	0,5261 / 0,5606
STAT6 3'UTRSNP2	51	108	42	0,2763 / 0,3233
STAT6 3'UTRSNP3	172	28	2	0,4797 / 0,3540
STAT6 3'UTRSNP4	83	94	23	0,6411 / 0,7560
STAT6 3'UTRSNP5	172	22	0	0,4025 / 1,0000

Tabelle 3.6: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens. Die p-Werte sind für alle SNPs für den Test nach Pearson als auch die Methode von Elston & Forthofer angegeben (Elston und Forthofer, 1977; <http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>; Spalte 5). P-Werte < 0,05 bedeuten eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Nur die elterlichen Genotypen flossen in den Test ein. Spalte 2: Anzahl der Eltern, die homozygot für das häufigere Allel (Allel 1) des jeweiligen SNPs sind. Spalte 3: Anzahl der, für den jeweiligen SNP, heterozygoten Eltern (Allel 12). Spalte 4: Anzahl der Eltern, die homozygot für das seltenere Allel (Allel 2) des jeweiligen SNPs sind.

3.2.3 Statistische Auswertung der SNPs des humanen *STAT6*-Gens

3.2.3.1 Kopplungs- und Assoziationsanalysen

Um innerhalb der 108 Familien der Asthma-Familienstudie auf Kopplung/Assoziation mit Asthma zu testen wurde für alle 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens der RC-TDT („Reconstruction-Combined Transmission-Disequilibrium-Test“; Knapp, 1999a und b) durchgeführt, wobei alle genotypisierten Kinder aus allen Familien in die Berechnungen einfließen (Loesgen, persönliche Mitteilung). Die Assoziationsanalysen für die quantitativen Merkmale Gesamt-IgE-Spiegel, Eosinophilenzellzahl und SLOPE erfolgten, wie schon erwähnt, mit einem quantitativen TDT, QTDT, (Abecasis et al., 2000a und b) unter Berücksichtigung der Genotypen aller Familienmitglieder (Loesgen, persönliche Mitteilung). Die elterlichen Allelverteilungen sind dabei in absoluten Zahlen sowie als relative Frequenzen in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

Für keinen der 13 SNPs konnte eine Kopplung/Assoziation mit Asthma gefunden werden (p-Werte alle $> 0,05$; Tabelle 3.7, Spalte 6). Auch scheint keiner der SNPs einen Einfluss auf die Eosinophilenzellzahl zu haben (p-Werte alle $> 0,1000$; Tabelle 3.8, Spalte 6). Schwache Assoziationen ergaben sich für *STAT6* 3'UTRSNP3 mit dem Lungenfunktionsparameter SLOPE (p-Wert = 0,0370; Tabelle 3.8, Spalte 8), *STAT6* In2SNP3 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel (p-Wert = 0,0200; Tabelle 3.8, Spalte 4), *STAT6* In17SNP1 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel (p-Wert = 0,0260; Tabelle 3.8, Spalte 4) sowie *STAT6* 3'UTRSNP4 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel (p-Wert = 0,0280; Tabelle 3.8, Spalte 4). Der stärkste Effekt wurde jedoch zwischen dem SNP in Intron 18, *STAT6* In18SNP1, und einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel beobachtet (p-Wert = 0,0070; Tabelle 3.8, Spalte 4).

Aufgrund einer zu geringen Anzahl informativer Genotypen (Allelfrequenz von 1,92% für das seltenere Allel, Tabelle 3.7, Spalte 5) konnten für den SNP in Intron 16, *STAT6* In16SNP1, keine quantitativen Analysen durchgeführt werden (Tabelle 3.8).

SNP	Gesamtzahl der genotypisierten Individuen	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]	RC-TDT p-Wert Asthma
STAT6 5'flankingSNP1	454	1 (G)	374	91,22	1,0000
		2 (A)	36	08,78	
STAT6 5'flankingSNP2	452	1 (C)	394	93,81	0,4514
		2 (T)	26	06,19	
STAT6 In2SNP1	452	1 (C)	244	58,10	0,5032
		2 (T)	176	41,90	
STAT6 In2SNP2	441	1 (C)	209	52,78	0,2971
		2 (T)	187	47,22	
STAT6 In2SNP3	446	1 (C)	231	56,07	0,4043
		2 (T)	181	43,93	
STAT6 In16SNP1	451	1 (A)	408	98,08	0,3018
		2 (C)	8	01,92	
STAT6 In17SNP1	448	1 (A)	250	60,39	0,3161
		2 (G)	164	39,61	
STAT6 In18SNP1	461	1 (C)	387	90,00	0,5716
		2 (T)	43	10,00	
STAT6 3'UTRSNP1	449	1 (G)	317	76,57	0,6160
		2 (A)	97	23,43	
STAT6 3'UTRSNP2	433	1 (A)	210	52,24	0,9458
		2 (G)	192	47,76	
STAT6 3'UTRSNP3	436	1 (A)	372	92,08	0,1237
		2 (G)	32	07,92	
STAT6 3'UTRSNP4	432	1 (A)	260	65,00	0,2930
		2 (G)	140	35,00	
STAT6 3'UTRSNP5	420	1 (A)	366	94,33	1,0000
		2 (G)	22	05,67	

Tabelle 3.7: Kopplungs-/Assoziationsanalyse für die 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens mit Asthma. Die Analysen innerhalb der 108 Familien der Asthma-Familienstudie erfolgten für alle 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens mit dem RC-TDT (Knapp, 1999a und b). Für keinen der 13 SNPs konnte eine Kopplung/Assoziation mit Asthma gefunden werden (p-Werte alle > 0,05, Spalte 6). Die elterlichen Allelverteilungen sind sowohl als absolute Zahlen [N] als auch relative Frequenzen [%] wiedergegeben (Spalte 4 und 5). Die Genotypisierungsraten lagen zwischen 88,6% für *STAT6* 3'UTRSNP5 und 97% für *STAT6* In18SNP1 (Spalte 2).

SNP	Allel 1 / Allel 2	mit erhöhtem Gesamt-IgE assoziiertes Allel	p-Wert Gesamt-IgE	mit erhöhter Eos.zellzahl assoziiertes Allel	p-Wert Eos.zellzahl	mit erhöhtem SLOPE assoziiertes Allel	p-Wert SLOPE
STAT6 5'flankingSNP1	G / A	2 (A)	> 0,1000	1 (G)	> 0,1000	2 (A)	> 0,1000
STAT6 5'flankingSNP2	C / T	2 (T)	> 0,1000	2 (T)	0,0950	2 (T)	> 0,1000
STAT6 In2SNP1	C / T	1 (C)	0,0990	1 (C)	> 0,1000	2 (T)	> 0,1000
STAT6 In2SNP2	C / T	1 (C)	> 0,1000	1 (C)	> 0,1000	2 (T)	> 0,1000
STAT6 In2SNP3	C / T	1 (C)	0,0200	1 (C)	> 0,1000	2 (T)	> 0,1000
STAT6 In16SNP1	A / C	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
STAT6 In17SNP1	A / G	2 (G)	0,0260	2 (G)	> 0,1000	2 (G)	> 0,1000
STAT6 In18SNP1	C / T	2 (T)	0,0070	2 (T)	> 0,1000	2 (T)	> 0,1000
STAT6 3'UTR SNP1	G / A	2 (A)	> 0,1000	2 (A)	> 0,1000	1 (G)	> 0,1000
STAT6 3'UTR SNP2	A / G	2 (G)	> 0,1000	2 (G)	> 0,1000	1 (A)	> 0,1000
STAT6 3'UTR SNP3	A / G	1 (A)	> 0,1000	1 (A)	> 0,1000	1 (A)	0,0370
STAT6 3'UTR SNP4	A / G	2 (G)	0,0280	2 (G)	> 0,1000	2 (G)	> 0,1000
STAT6 3'UTR SNP5	A / G	1 (A)	> 0,1000	2 (G)	> 0,1000	2 (G)	> 0,1000

Tabelle 3.8: Assoziationsanalyse für die 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens mit den quantitativen Merkmalen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und erhöhter SLOPE. Die Analysen erfolgten mit dem QTDT (Abecasis et al., 2000a und b). Signifikante p-Werte sind fett gedruckt (Spalte 4,6 und 8). In Spalte 3,5 und 7 ist der Einfluss des jeweiligen Allels auf den quantitativen Phänotyp in Form einer deskriptiven Statistik wiedergegeben, wobei das jeweils häufigere Allel mit 1, das seltenere mit 2 kodiert ist. Der Einfluss ist nur dann von Bedeutung, wenn auch der p-Wert signifikant ($p < 0,05$) ist.

3.2.3.2 Haplotypenanalyse

Um den, im Vergleich zu SNPs, höheren Informationsgehalt von Haplotypen zu nutzen, wurde für die 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens zusätzlich eine Haplotypenanalyse durchgeführt. Dabei erfolgte die statistische Bestimmung der Haplotypen mit einem modifizierten EM- („Expectation-Maximization“-) Algorithmus unter Einbeziehung der Familieninformation (Rohde und Fuerst, 2001). Allerdings mussten 36 Familien von der Analyse ausgeschlossen werden, so dass von den insgesamt 108 Familien der Studie nur 72 in die Berechnungen einfließen. Der Grund für den Ausschluss war einmal das Auftreten von maternalen und paternalen Haplotypenpaaren, die zwar kompatibel mit den Genotypen der Eltern, nicht jedoch mit denen ihrer Kinder waren. Dies war bei 25 Familien der Fall. Bei den restlichen 11 Familien lag der Grund in der unvollständigen Genotypisierung der Familie (K. Rohde, persönliche Mitteilung).

Die 12 häufigsten Haplotypen und ihre Frequenzen sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Insgesamt machen sie 93,82% aller möglichen Haplotypen aus. Von den restlichen 6,18% hatten alle Haplotypen eine Frequenz $< 0,01\%$. Interessanterweise sind in Haplotyp Nummer 5 (1112112212121; Frequenz 5,65%, Tabelle 3.9, Spalte 2 und 3) und Haplotyp Nummer 10 (1111112212121, Frequenz 2,12%; Tabelle 3.9, Spalte 2 und 3) all diejenigen Allele der einzelnen SNPs vereint, die in den Einzelanalysen eine Assoziation mit einem der quantitativen Phänotypen gezeigt haben (vgl. Tabelle 3.8, Spalten 3,4,7 und 8). Aus diesem Grund wurden diese beiden Haplotypen, zusammen mit den drei häufigsten, auf Assoziation mit den quantitativen Merkmalen getestet. Dabei wurde für keinen der getesteten Haplotypen eine Assoziation gefunden (p -Werte $> 0,06$; K. Rohde, persönliche Mitteilung).

Eine paarweise Testung der 13 SNPs auf Kopplungsungleichgewicht („linkage disequilibrium“, LD) zeigte, dass sich die meisten SNP-Paare in einem signifikanten Kopplungsungleichgewicht befanden (p -Werte $< 0,05$; Daten nicht gezeigt). Für folgende Paare konnte kein Kopplungsungleichgewicht gezeigt werden: *STAT6* 5'flankingSNP1/*STAT6* 5'flankingSNP2 (p -Wert = 0,3606), *STAT6* 5'flankingSNP1/*STAT6* In18SNP1 (p -Wert = 0,0755), *STAT6* In2SNP2/*STAT6* In18SNP1 (p -Wert = 0,1246), *STAT6* In16SNP1/*STAT6* 3'UTRSNP2 (p -Wert = 0,0981), *STAT6* In16SNP1/*STAT6* 3'UTRSNP3 (p -Wert = 0,3106), *STAT6* 5'flankingSNP2/*STAT6* 3'UTRSNP5 (p -Wert = 0,3531), *STAT6* In16SNP1/*STAT6* 3'UTRSNP5 (p -Wert = 0,8554) und *STAT6* 3'UTRSNP1/*STAT6* 3'UTRSNP5 (p -Wert = 0,0559).

Haplotyp-Nummer	Haplotyp	Frequenz [%]
1	1122211111111	34,74
2	1111112122121	17,22
3	2111111111111	08,43
4	1122211111112	05,77
5	1112112212121	05,65
6	1111111112211	05,41
7	1211112122121	04,73
8	1111112112111	04,05
9	1111211111111	02,32
10	1111112212121	02,12
11	1111112112211	02,03
12	1111111112121	01,35

Tabelle 3.9: Übersicht über die 12 häufigsten Haplotypen für die 13 SNPs des humanen *STAT6*-Gens. Die Reihenfolge der 13 SNPs innerhalb der einzelnen Haplotypen ist entsprechend der 5'-3'-Richtung des humanen *STAT6*-Gens angegeben. Von links nach rechts: *STAT6* 5'flankingSNP1, *STAT6* 5'flankingSNP2, *STAT6* In2SNP1, *STAT6* In2SNP2, *STAT6* In2SNP3, *STAT6* In16SNP1, *STAT6* In17SNP1, *STAT6* In18SNP1, *STAT6* 3'UTRSNP1, *STAT6* 3'UTRSNP2, *STAT6* 3'UTRSNP3, *STAT6* 3'UTRSNP4, *STAT6* 3'UTRSNP5. Das häufigere Allel ist mit 1 kodiert, das seltenere mit 2 (vgl. Tabelle 3.8).

3.2.4 Analyse des GT-Repeats in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens

2001 wurde in der 5'UTR (Exon 1) des humanen *STAT6*-Gens ein Dinukleotidpolymorphismus (GT-Repeat) beschrieben (Abbildung 3.5), für den in einer japanischen Studie eine Assoziation mit allergischen Erkrankungen nachgewiesen werden konnte (Tamura et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun getestet, ob auch innerhalb der Asthma-Familienstudie eine Kopplung/Assoziation dieses Polymorphismus mit Asthma und/oder den quantitativen Phänotypen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und erhöhter SLOPE nachzuweisen war.

3.2.4.1 Genotypisierung des GT-Repeats in der Asthma-Familienstudie

Die Genotypisierung der 108 Familien der Studie erfolgte für den GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens mittels Fragmentanalyse, wobei die Genotypisierungsrate bei ca. 94% lag. Insgesamt konnten fünf Allele, Allel 1-5, identifiziert werden (Tabelle 3.10; Abbildung

3.5). Die elterlichen Allelverteilungen sind in absoluten Zahlen [N] und als relative Frequenzen [%] in Tabelle 3.10 wiedergegeben. Interessanterweise waren Allel 1 (Frequenz = 40,14%, Tabelle 3.10, Spalte 5) und Allel 3 (Frequenz = 43,51%, Tabelle 3.10, Spalte 5) nicht nur die häufigsten Allele, sondern die Allelkombination A1/A3 stellte auch den häufigsten Genotyp der Eltern dar (Daten nicht gezeigt).

Allel	Größe des PCR-Produkts in bp	Anzahl der GT-Repeats	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Frequenz der elterlichen Allele [%]	RC-TDT p-Wert Asthma
A1	326	13	167	40,14	0,2488
A2	328	14	13	03,13	0,2478
A3	330	15	181	43,51	0,0536
A4	332	16	30	07,21	0,7825
A5	334	17	25	06,01	1,0000

Tabelle 3.10: Übersicht über die fünf Allele des GT-Repeats in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens. Die elterlichen Allelverteilungen sind als absolute Zahlen [N] (Spalte 4) als auch relative Frequenzen [%] (Spalte 5) wiedergegeben. In Spalte 2 ist die Größe der einzelnen PCR-Fragmente in bp aufgeführt. Spalte 3: Anzahl der GT-Repeats für die jeweiligen Allele. Für keines der fünf Allele konnte eine Kopplung/Assoziation mit Asthma gefunden werden (p-Wert > 0,05; Spalte 6).

Um die Anzahl der GT-Repeats der verschiedenen Allele zu bestimmen, wurden die PCR-Fragmente von, für das jeweilige Allel, homozygoten Probanden sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass Allel 1 13x und Allel 5 17x den Repeat enthielten (Tabelle 3.10, Spalte 3).

3.2.4.2 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen

Wie schon für die SNPs beschrieben, wurde auch im Falle des GT-Repeats ein RC-TDT (Knapp, 1999a und b) verwendet, um innerhalb der Studie auf Kopplung/Assoziation mit Asthma zu testen. Für die quantitativen Merkmale erfolgte die statistische Analyse mittels eines quantitativen TDTs, QTDT (Abecasis et al., 2000a und b).

Während für keines der fünf Allele eine Kopplung/Assoziation mit Asthma, erhöhtem Gesamt-IgE-Spiegel und erhöhtem SLOPE gefunden wurde (p-Werte > 0,05; Tabelle 3.10,

Spalte 6 und Tabelle 3.11, Spalte 2 und 4), war Allel 4 (16xGT) signifikant mit einer erhöhten Eosinophilenzellzahl assoziiert (p-Wert = 0,0010; Tabelle 3.11, Spalte 3).

Aufgrund einer zu geringen Anzahl an informativen Genotypen (Frequenz = 3,13 %, Tabelle 3.10, Spalte 4 und 5) konnten für Allel 2 keine quantitativen Analysen durchgeführt werden (Loesgen, persönliche Mitteilung; Tabelle 3.11).

Allel	p-Wert Gesamt-IgE	p-Wert Eos.zellzahl	p-Wert SLOPE
A1	>0,1000	>0,1000	>0,1000
A2	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
A3	>0,1000	>0,1000	>0,1000
A4	>0,1000	0,0010	>0,1000
A5	0,0510	>0,1000	>0,1000

Tabelle 3.11: Assoziationsanalyse für den GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens mit den quantitativen Merkmalen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und erhöhter SLOPE. Für keines der fünf Allele konnte eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel und erhöhtem SLOPE gefunden werden (p-Werte > 0,05; Spalte 2 und 4). Dagegen ist Allel 4 signifikant mit einer erhöhten Eosinophilenzellzahl assoziiert (p-Wert = 0,0010, Spalte 3). Aufgrund einer zu geringen Anzahl informativer Genotypen konnten für Allel 2 keine quantitativen Analysen durchgeführt werden (Spalte 2,3 und 4).

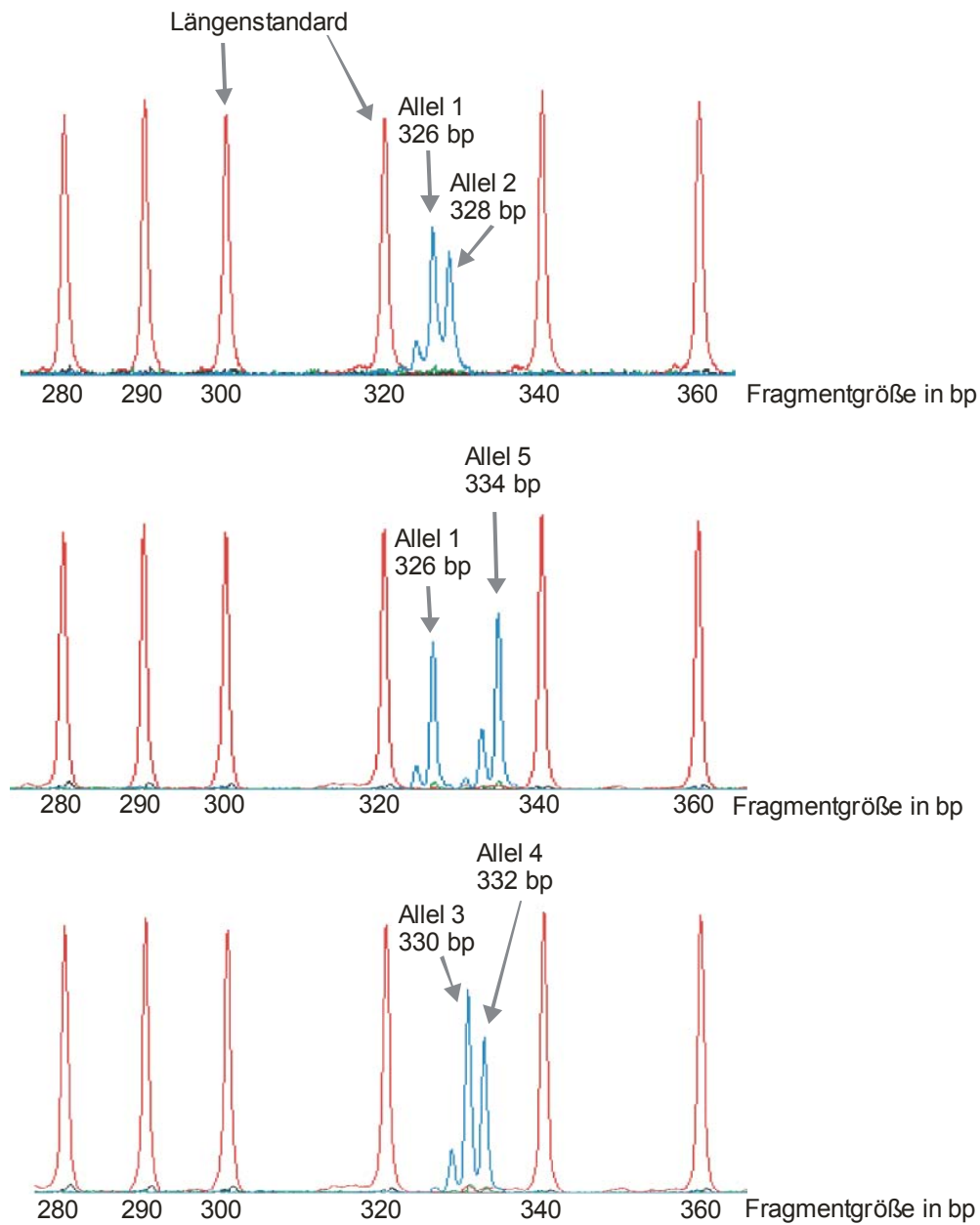


Abbildung 3.5: Fragmentanalyse des GT-Repeats in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens. Insgesamt konnten fünf Allele, Allel 1-5, identifiziert werden. Blau: PCR-Fragmente. Rot: GENESCAN 400HD [ROX]-Längenstandard.

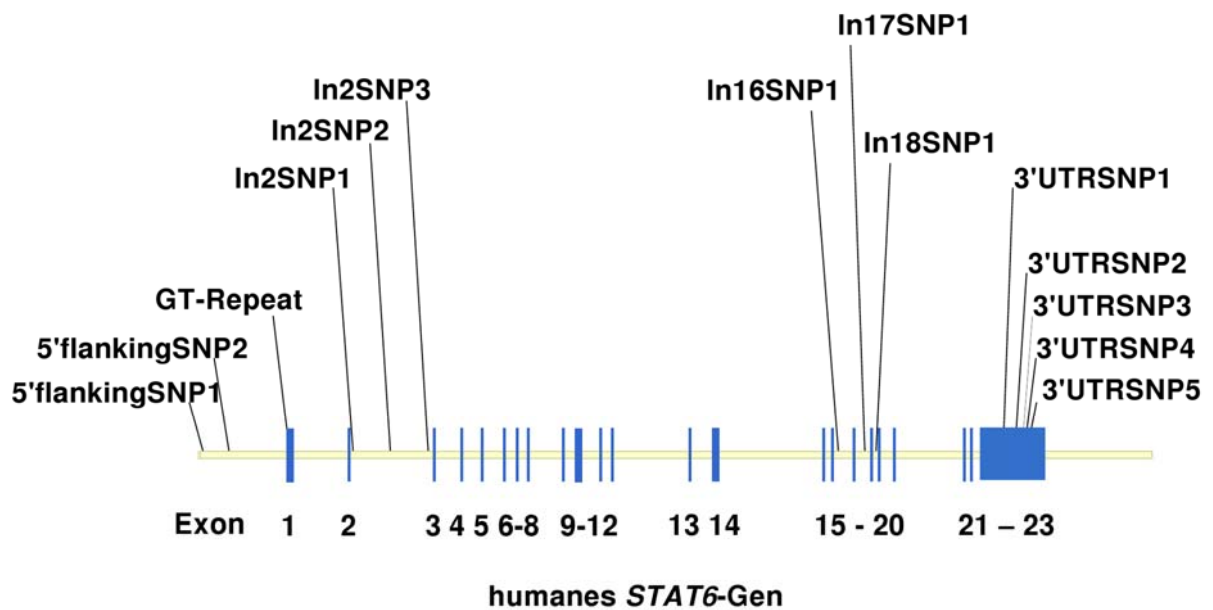


Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der Lage der 13, in der Asthma-Familienstudie analysierten, *STAT6*-SNPs und des GT-Repeats im humanen *STAT6*-Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen. Die Graphik wurde mit dem Programm Vector NTI Suite 6.0 anhand der Originaldaten von Patel und Mitarbeitern (Patel et al., 1998) und den Daten aus den öffentlichen Gen-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) erstellt.

Alle für das humane *STAT6*-Gen, in dieser Arbeit erzielten, Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht und finden sich in Duetsch et al., 2002 wieder.

3.3 Analyse des humanen *NAB2*-Gens

Das humane *NAB2*-Gen, welches aus 7 Exons und 6 Introns besteht, kodiert für das 525 Aminosäure große NGFI-A Bindeprotein 2 (EGR1-Bindeprotein 2) (Svaren et al., 1997). Es ist, wie das humane *STAT6*-Gen, in der chromosomalen Region 12q13.3-q14.1 lokalisiert (Svaren et al., 1996; Svaren et al., 1997). Sowohl Transkriptions- als auch Translationsstartpunkt liegen im ersten Exon, so dass gut zwei Drittel der Gesamtlänge von Exon 1 für die 5'UTR reserviert sind (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens). Die 3'UTR dagegen umfasst etwa drei Viertel von Exon 7 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens).

Die Analyse des humanen *NAB2*-Gens beschränkte sich auf die Untersuchung von bereits bekannten SNPs aus der öffentlichen SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

3.3.1 Genotypisierung von *NAB2*-SNPs in der Asthma-Familienstudie

Für die Analyse des humanen *NAB2*-Gens wurden zunächst acht SNPs aus der öffentlichen SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) ermittelt (Tabelle 3.12). Die Validierung und Genotypisierung innerhalb der Asthma-Familienstudie erfolgte dann für alle SNPs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie im 384 Well-Format. Für Probanden, bei denen eine Genotypisierung im ersten Ansatz fehlschlug, wurde diese im 96 Well-Format wiederholt. Insgesamt konnten vier der acht SNPs validiert werden, drei waren in der Studie nicht vorhanden (Tabelle 3.12, Spalte 4). Mit dem Assay für *NAB2* In6SNP2 wurden keine Ergebnisse erzielt (Tabelle 3.12, Spalte 4).

Drei der vier validierten SNPs sind intronisch, wobei je einer in Intron 2 (*NAB2* In2SNP1), einer in Intron 3 (*NAB2* In3SNP1) und einer in Intron 6 (*NAB2* In6SNP1) lokalisiert ist (Tabelle 3.12, Spalte 3). Der vierte SNP befindet sich in Exon 3 (*NAB2* Ex3SNP1; Tabelle 3.12, Spalte 3). Er führt jedoch zu keinem Aminosäureaustausch (Thr>Thr). Die Position der SNPs im Gen bezüglich der Exon/Intron-Grenzen wurde anhand der Daten aus der Ensembl-Datenbank bestimmt (www.ensembl.org/Homo_sapiens; Ensembl Transkript-ID: ENST00000300131). Eine graphische Übersicht über die Lage der vier SNPs entsprechend der Exon/Intron-Grenzen des Gens ist in Abbildung 3.7 wiedergegeben.

SNP	Position in bp relativ zum Translationsstartpunkt in Exon 1	Lage im Gen entsprechend Exon / Intron- Grenzen	in Asthma- Studie bestätigt	GenBank ref. SNP Id (rs#) / GenBank Assay Id (ss#)	GenBank Contig- Accession-Nr.
<i>NAB2</i> In1SNP1	1477A>T	Intron 1	nein	429669 / 569804	NT_029419
<i>NAB2</i> In2SNP1	2995A>C	Intron 2	ja	324020 / 1971763	NT_029419
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	3240G>A	Exon 3	ja	1057290 / 1537886	NT_029419
<i>NAB2</i> In3SNP1	3609G>A	Intron 3	ja	324019 / 1868469	NT_029419
<i>NAB2</i> In6SNP1	4691G>T	Intron 6	ja	324018 / 1868468	NT_029419
<i>NAB2</i> In6SNP2	4776C>A	Intron 6	nicht funktioniert	324017 / 1868467	NT_029419
<i>NAB2</i> In6SNP3	5133G>C	Intron 6	nein	406270 / 530806	NT_029419
<i>NAB2</i> In6SNP4	5137G>A	Intron 6	nein	412567 / 541436	NT_029419

Tabelle 3.12: Übersicht über die acht, aus der öffentlichen SNP-Datenbank entnommenen, SNPs des humanen *NAB2*-Gens. Die Position der SNPs im Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen wurde anhand der Daten aus der Ensembl-Datenbank bestimmt (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens; Ensembl Transkript-ID: ENST00000300131; Spalte 3). In Spalte 2 ist die Position der SNPs in bp relativ zum Translationsstartpunkt in Exon 1 wiedergegeben. Vier der acht SNPs konnten in der Asthma-Familienstudie validiert werden (Spalte 4). Die jeweiligen SNP-Datenbank-Referenznummern sowie die dazugehörige Contig-Accession-Nummer sind in Spalte 5 und 6 wiedergegeben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

Durch die Rekrutierung weiterer Familien standen für die Genotypisierung der SNPs des *NAB2*-Gens erstmals 172 Familien (748 Probanden: 344 Eltern, 404 Kinder) zur Verfügung. Die Genotypisierungsraten lagen dabei zwischen 92% und 96%.

Für alle vier SNPs stimmten die Genotypen von Eltern und Kindern mit dem mendelschen Erbgang überein („Mendel-Check“). Die elterlichen Genotypen folgten dem zu erwartenden Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (p -Werte $> 0,05$; Tabelle 3.13, Spalte 5), wobei die Berechnungen sowohl für die 172 Familien (S2) als auch die bereits beschriebenen 108 Familien der Anfangsstudie (S1) durchgeführt wurden (Tabelle 3.13, Spalte 2,3 und 4). Beide Kriterien ließen demnach auf eine gute Qualität der Genotypisierung schließen.

SNP	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allel 11	Anzahl der Eltern [N] heterozygot Allel 12	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allel 22	p- Wert nach Pearson's Test / Elston + Forthofer
<i>NAB2</i> In2SNP1	S1: 56 S2: 98	S1: 100 S2: 152	S1: 46 S2: 73	0,9154 / 0,8888 0,3394 / 0,3702
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	S1: 190 S2: 301	S1: 16 S2: 29	S1: 1 S2: 1	0,3090 / 0,3202 0,7357 / 0,5213
<i>NAB2</i> In3SNP1	S1: 78 S2: 118	S1: 98 S2: 161	S1: 31 S2: 54	0,9808 / 1,0000 0,9410 / 1,0000
<i>NAB2</i> In6SNP1	S1: 76 S2: 117	S1: 97 S2: 140	S1: 33 S2: 55	0,8256 / 0,8841 0,2461 / 0,2406

Tabelle 3.13: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die vier validierten SNPs des humanen *NAB2*-Gens. Die p-Werte sind einmal für den Test nach Pearson als auch die Methode von Elston und Forthofer angegeben (Elston und Forthofer, 1977; <http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>; Spalte 5). P-Werte < 0,05 bedeuten eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Nur die elterlichen Genotypen flossen in den Test ein. Getestet wurde einmal für die 172 Familien (S2), aber auch für die bereits beschriebenen 108 Familien (S1). Spalte 2: Anzahl der Eltern, die homozygot für das häufigere Allel (Allel 1) des jeweiligen SNPs sind. Spalte 3: Anzahl für den jeweiligen SNP heterozygote Eltern (Allel 12). Spalte 4: Anzahl der Eltern, die homozygot für das seltenere Allel (Allel 2) des jeweiligen SNPs sind.

3.3.2 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen

Durch die Aufstockung der Asthma-Familienstudie auf 172 Familien standen für die statistischen Analysen insgesamt 64 Familien mehr als bisher zur Verfügung. Um zu testen, inwieweit diese zusätzlichen Familien zu einer Erhöhung der Teststärke (Power) führen, erfolgten die statistischen Analysen für alle vier SNPs des *NAB2*-Gens sowohl mit den 172 Familien (S2) als auch den 108 Familien (S1). Die elterlichen Allelverteilungen sind dabei für beide Stichproben in absoluten Zahlen [N] und als relative Frequenzen [%] in Tabelle 3.14 wiedergegeben.

Im Falle des RC-TDTs (Knapp, 1999a und b) konnte weder für die 108 Familien (S1), noch die 172 Familien (S2) Kopplung/Assoziation zwischen einem der vier SNPs und dem asthmatischen Phänotyp gefunden werden (p-Werte > 0,05; Tabelle 3.15, Spalte 2).

a)

SNP	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]
<i>NAB2</i> In2SNP1	1 (A)	212	52,48
	2 (C)	192	47,52
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	1 (G)	396	95,19
	2 (A)	20	04,81
<i>NAB2</i> In3SNP1	1 (G)	254	61,35
	2 (A)	160	38,65
<i>NAB2</i> In6SNP1	1 (G)	250	60,68
	2 (T)	162	39,32

b)

SNP	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]
<i>NAB2</i> In2SNP1	1 (A)	348	53,87
	2 (C)	298	46,13
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	1 (G)	631	95,03
	2 (A)	33	04,97
<i>NAB2</i> In3SNP1	1 (G)	397	59,61
	2 (A)	269	40,39
<i>NAB2</i> In6SNP1	1 (G)	375	60,10
	2 (T)	249	39,90

Tabelle 3.14: Elterliche Allelverteilungen für die vier validierten SNPs des humanen *NAB2*-Gens. Die elterlichen Allelverteilungen sind in absoluten Zahlen [N] und als relative Frequenzen [%] wiedergegeben (Spalte 3 und 4). a) Angaben für die 108 Familien (S1). b) Angaben für die 172 Familien (S2).

SNP	RC-TDT p-Wert Asthma
<i>NAB2</i> In2SNP1	S1: 0,6079 S2: 0,5110
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	S1: 0,3915 S2: 0,1237
<i>NAB2</i> In3SNP1	S1: 0,3531 S2: 0,6161
<i>NAB2</i> In6SNP1	S1: 0,6117 S2: 0,4655

Tabelle 3.15: Kopplungs-/Assoziationsanalyse für die vier SNPs des humanen *NAB2*-Gens mit Asthma.

Die Analysen erfolgten mit dem RC-TDT (Knapp, 1999a und b) und wurden sowohl für die 108 Familien (S1) als auch die 172 Familien (S2) durchgeführt. Für keine der beiden Stichproben konnte Kopplung/Assoziation zwischen einem der vier SNPs des *NAB2*-Gens und Asthma gefunden werden (p-Werte > 0,05; Spalte 2).

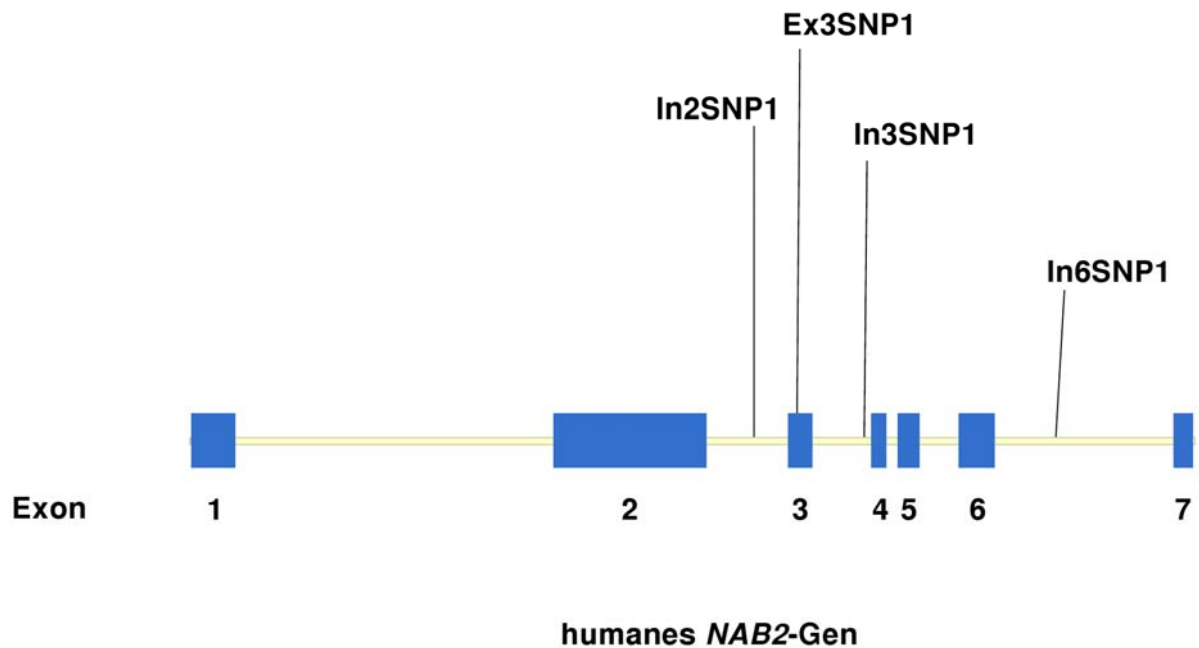


Abbildung 3.7: Graphische Darstellung der Lage der vier, in der Asthma-Familienstudie analysierten *NAB2*-SNPs im humanen *NAB2*-Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen. Die Graphik wurde mit Hilfe des Programms Vector NTI Suite 6.0 anhand der Daten der Ensembl-Datenbank (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens; Ensembl Transkript-ID: ENST00000300131) erstellt.

Zusätzlich zu dem Gesamt-IgE-Spiegel, der Eosinophilenzellzahl und dem SLOPE wurde für die SNPs des *NAB2*-Gens erstmals auch der Lungenfunktionsparameter Peak-Flow (Erklärung siehe Abschnitt 1.3.2) als ein weiteres quantitatives Merkmal in die quantitativen Analysen einbezogen (Tabelle 3.16). Der Peak-Flow ist, wie die anderen quantitativen Merkmale, von Alter und Geschlecht abhängig und ist aufgrund der bei *Asthma bronchiale* vorliegenden Atemwegsobstruktion bei Asthmatikern vermindert (Petro, 1998; Boenisch, 2003; vgl. Abschnitt 1.3.2).

Die Berechnungen erfolgten mit dem QTDT (Abecasis et al., 2000a und b) unter Einbeziehung der Genotypen aller Familienmitglieder (Loesgen, persönliche Mitteilung). Da für die neuen Familien der SLOPE nicht bestimmt wurde (Altmüller/Wjst, persönliche Mitteilung), konnte die statistische Analyse für dieses quantitative Merkmal nur für die 108 Familien durchgeführt werden (Tabelle 3.16). Für die anderen quantitativen Phänotypen erfolgten die statistischen Berechnungen sowohl mit den 172 Familien (S2) als auch den 108 Familien (S1) (Tabelle 3.16). Aufgrund einer zu geringen Anzahl informativer Genotypen erschien, im Falle der 108 Familien, eine Testung der quantitativen Merkmale erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhter SLOPE und verminderter Peak-Flow für *NAB2* Ex3SNP1 als nicht sinnvoll (Loesgen, persönliche Mitteilung; Tabelle 3.16).

Betrachtet man die Ergebnisse der quantitativen Analysen, so zeigt sich, dass für die meisten SNPs des *NAB2*-Gens keine Assoziation mit den quantitativen Phänotypen nachgewiesen wurde (Tabelle 3.16, Spalte 3,5,7 und 9). Lediglich der SNP in Intron 6, *NAB2* In6SNP1, zeigte eine schwache Assoziation des T-Allels (selteneres Allel) mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel. Dabei unterscheidet sich der p-Wert für die 108 Familien (p-Wert = 0,0390; Tabelle 3.16, Spalte 3) nicht wesentlich von demjenigen der 172 Familien (p-Wert = 0,0300; Tabelle 3.16, Spalte 3).

SNP	mit erhöhtem Gesamt-IgE assoziiertes Allel	p-Wert Gesamt-IgE	mit erhöhter Eos.zellzahl assoziiertes Allel	p-Wert Eos.zellzahl	mit erhöhtem SLOPE assoziiertes Allel	p-Wert SLOPE	mit vermindertem Peak-Flow assoziiertes Allel	p-Wert Peak-Flow
<i>NAB2</i> In2SNP1	S1: A S2: A	> 0,1000 > 0,1000	S1: C S2: A	> 0,1000 > 0,1000	S1: C /	> 0,1000 /	S1: A S2: A	> 0,1000 > 0,1000
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	nicht getestet S2: G	nicht getestet > 0,1000	S1: A S2: A	> 0,1000 > 0,1000	nicht getestet /	nicht getestet /	nicht getestet S2: G	nicht getestet > 0,1000
<i>NAB2</i> In3SNP1	S1: A S2: A	0,0480 0,0590	S1: A S2: A	> 0,1000 0,0850	S1: A /	> 0,1000 /	S1: A S2: A	> 0,1000 > 0,1000
<i>NAB2</i> In6SNP1	S1: T S2: T	0,0390 0,0300	S1: T S2: T	> 0,1000 > 0,1000	S1: T /	> 0,1000 /	S1: T S2: T	> 0,1000 > 0,1000

Tabelle 3.16: Assoziationsanalyse für die SNPs des humanen *NAB2*-Gens mit den quantitativen Merkmalen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl, erhöhter SLOPE und verminderter Peak-Flow. Für Gesamt-IgE-Spiegel, Eosinophilenzellzahl und Peak-Flow wurden die Analysen sowohl für die 172 Familien (S2) als auch die 108 Familien (S1) durchgeführt, für SLOPE nur mit den 108 Familien (Spalte 6 und 7). Signifikante p-Werte sind fett gedruckt (Spalte 3). In Spalte 2,4,6 und 8 ist der Einfluss des jeweiligen Allels auf den quantitativen Phänotyp in Form einer deskriptiven Statistik wiedergegeben. Der Einfluss ist nur dann von Bedeutung, wenn auch der p-Wert ein signifikanter ist ($p < 0,05$).

3.4 Analyse des humanen *IGF1*-Gens

Das humane *IGF1*-Gen, ist ein „single-copy“ Gen (nur eine Gen-Kopie im Genom), das für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 („insulin-like growth factor 1“), auch Somatomedin C genannt, kodiert und auf der chromosomalen Region 12q22-q23 lokalisiert ist (Jansen et al., 1983; Rotwein et al., 1986; Mathew et al., 1992). Mehrere molekulare Studien konnten für *IGF1* eine sehr komplexe Genstruktur nachweisen. Während Rotwein und Kollegen in ihrer Veröffentlichung Mitte der 80iger Jahre den *IGF1*-Genlocus als ein aus fünf Exons und vier Introns bestehender beschrieben (Rotwein et al., 1986), ist in neueren Veröffentlichungen von sechs Exons und fünf Introns die Rede, die sich über einen genomischen Bereich von mehr als 85 kb erstrecken (Smith et al., 2002; Bonapace et al., 2003). Laut der Ensembl-Datenbank (www.ensembl.org/Homo_sapiens) befindet sich der Translationsstartpunkt dabei in Exon 2, so dass das gesamte Exon 1 sowie das erste Viertel von Exon 2 die 5'UTR des Gens darstellen (Ensembl Gentranskript-ID: ENST00000392904, Q13429_human; Ensembl Gen-ID: ENSG00000017427). Die 3'UTR dagegen nimmt fast das gesamte Exon 6 ein (Ensembl Gentranskript-ID: ENST00000392904; Q13429_human; Bonapace et al., 2003).

Wie für das *NAB2*-Gen erfolgte die Analyse des humanen *IGF1*-Gens anhand von bereits bekannten SNPs aus der öffentlichen SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

3.4.1 Validierung von *IGF1*-SNPs in der KORA S4-Studie

Für das humane *IGF1*-Gen standen zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen in der öffentlichen SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) Daten für insgesamt 11 SNPs zur Verfügung (Tabelle 3.17). Die Validierung der SNPs erfolgte mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in einem Pool aus genomischer DNA von 286 zufällig ausgewählten adulten Probanden einer deutschen populationsbezogenen Studie (KORA S4-Studie; vgl. Abschnitt 2.1.2) Dabei konnten fünf der 11 SNPs validiert werden, vier waren nicht vorhanden (Tabelle 3.17, Spalte 4). Mit den Assays für *IGF1* In3SNP2 und *IGF1* In5SNP2 wurden keine Ergebnisse erzielt (Tabelle 3.17, Spalte 4).

Von den fünf validierten SNPs befinden sich zwei in Intron 3 (*IGF1* In3SNP1 und *IGF1* In3SNP4, Tabelle 3.17, Spalte 3) und drei in Intron 5 (*IGF1* In5SNP3, *IGF1* In5SNP4 und *IGF1* In5SNP7, Tabelle 3.17, Spalte 3).

Die Bestimmung der Position der SNPs im Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen wurde mit Hilfe des Programms Vector NTI Suite 6 (www.invitrogen.com) anhand der Daten aus öffentlichen Gen-Datenbanken ermittelt (www.ensembl.org/Homo_sapiens; Ensembl-Transkript-ID: ENST00000392904, Q13429_human; <http://ncbi.nlm.nih.gov>; GenBank-ID:

NW_925395). Dabei orientierte man sich an den aktuellsten Veröffentlichungen, in denen der *IGF1*-Genlocus aus sechs Exons bestehend beschrieben wird (Smith et al., 2002; Bonapace et al., 2003).

Häufig findet man in den gängigen Datenbankeinträgen *IGF1*-Transkripte mit nur fünf Exons. Dies hängt wohl damit zusammen, dass für das humane *IGF1*-Gen zwei primäre Translationsprodukte existieren, IGF1A mit 153 Aminosäuren und IGF1B mit 195 Aminosäuren, deren mRNAs aus einem einzigen Primärtranskript durch alternatives Spleißen der beiden letzten Exons hervorgehen (Rotwein et al., 1986; Smith et al., 2002; Bonapace et al., 2003). Erfolgte nun in den Datenbanken die Annotation der *IGF1*-Exons mit der genomischen Sequenz anhand dieser mRNAs, ergeben sich für das *IGF1*-Gen logischerweise nur fünf Exons. In diesen Fällen sind die hier analysierten SNPs nicht mehr in Intron 3 und 5 lokalisiert, sondern finden sich in Intron 2 bzw. 4 wieder, bleiben also intronisch. Daher ist es empfehlenswert, sich für weitere Analysen an den in Tabelle 3.17, Spalte 5 angegebenen rs-Nummern zu orientieren

3.4.2 Genotypisierung der *IGF1*-SNPs in der Asthma-Familienstudie

Für weitere Kopplungs- und Assoziationsanalysen wurden alle fünf, in den genomischen DNA-Pools validierten, SNPs des humanen *IGF1*-Gens in 172 Familien (748 Probanden: 344 Eltern, 404 Kinder) der Asthma-Familienstudie genotypisiert. Die Genotypisierung erfolgte dabei mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie im 384 Well-Format (Abbildung 3.8). Für Probanden, bei denen eine Genotypisierung im ersten Ansatz fehlschlug, wurde diese im 96 Well-Format wiederholt. Es konnten alle fünf SNPs in der Asthma-Studie bestätigt werden, wobei die Genotypisierungsraten zwischen 91% und 96% lagen. Eine graphische Übersicht über die Lage der fünf SNPs entsprechend der Exon/Intron-Grenzen des Gens ist in Abbildung 3.9 wiedergegeben.

Auch für die fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens folgten die ermittelten Genotypen der Eltern und Kinder dem mendelschen Erbgang („Mendel-Check“). Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden ebenfalls keine festgestellt (p-Werte > 0,05; Tabelle 3.18, Spalte 5), wobei die Berechnungen sowohl für die 172 Familien (S2), als auch die 108 Familien der Anfangsstudie (S1) durchgeführt wurden (Tabelle 3.18). Somit konnten Genotypisierungsfehler ausgeschlossen werden.

SNP	Position in bp relativ zum Translationsstartpunkt	Lage im Gen entsprechend Exon / Intron- Grenzen	in KORA-Pool bestätigt	GenBank ref. SNP Id (rs#) / GenBank Assay Id (ss#)	GenBank Contig- Accession- Nr.
<i>IGF1</i> In3SNP1	9736G>T	Intron 3	ja	1019731 / 1483908	NT_019546
<i>IGF1</i> In3SNP2	27076C>T	Intron 3	nicht funktioniert	2033178 / 2942184	NT_019546
<i>IGF1</i> In3SNP3	37688C>T	Intron 3	nein	1015693 / 1479286	NT_019546
<i>IGF1</i> In3SNP4	49265G>A	Intron 3	ja	972936 / 1423511	NT_019546
<i>IGF1</i> In5SNP1	62562C>A	Intron 5	nein	6213 / 7835	NT_019546
<i>IGF1</i> In5SNP2	64302C>G	Intron 5	nicht funktioniert	764911 / 151636	NT_019546
<i>IGF1</i> In5SNP3	71946G>A	Intron 5	ja	978458 / 1430956	NT_019546
<i>IGF1</i> In5SNP4	76878T>C	Intron 5	ja	1520222 / 2357597	NT_019546
<i>IGF1</i> In5SNP5	77328A>G	Intron 5	nein	1520221 / 2357596	NT_019546
<i>IGF1</i> In5SNP6	77380A>C	Intron 5	nein	1549593 / 2392317	NT_019546
<i>IGF1</i> In5SNP7	77649G>C	Intron 5	ja	1520220 / 2357595	NT_019546

Tabelle 3.17: Übersicht über die 11, aus der öffentlichen SNP-Datenbank entnommenen, SNPs des humanen *IGF1*-Gens. Die Position der SNPs im Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen (Spalte 3) wurde anhand der Daten aus den öffentlichen Gen-Datenbanken (www.ensembl.org/Homo_sapiens, Gene-ID: ENSG 0000017427, Transkript-ID: Q13429_human; <http://ncbi.nlm.nih.gov>; Contig-Accession-Nr. siehe Spalte 6) ermittelt. In Spalte 2 ist die Position der SNPs in bp relativ zum Translationsstartpunkt wiedergegeben. Fünf der 11 SNPs konnten in dem genomischen DNA-Pool der KORA S4-Studie validiert werden (Spalte 4). Die jeweiligen SNP-Datenbank-Referenznummern (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) sowie die dazugehörige Contig-Accession-Nummer sind in Spalte 5 und 6 wiedergegeben.

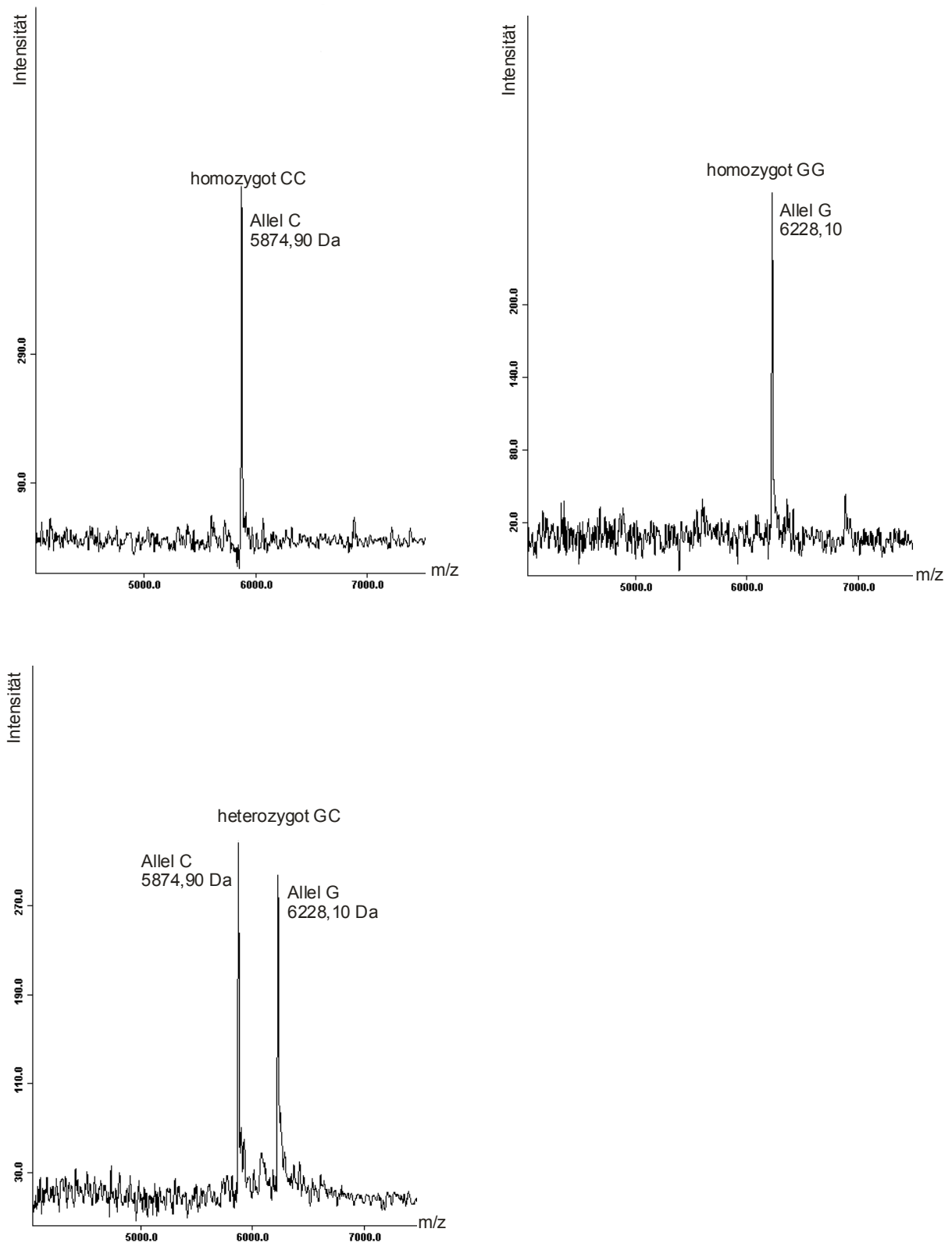


Abbildung: 3.8: MALDI-TOF Massenspektrometrie von *IGF1* In5SNP7. Stellvertretend für alle fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens sind hier die Massenspektren der Extensions-Produkte für alle drei Allelkombinationen des *IGF1* In5SNP7 dargestellt.

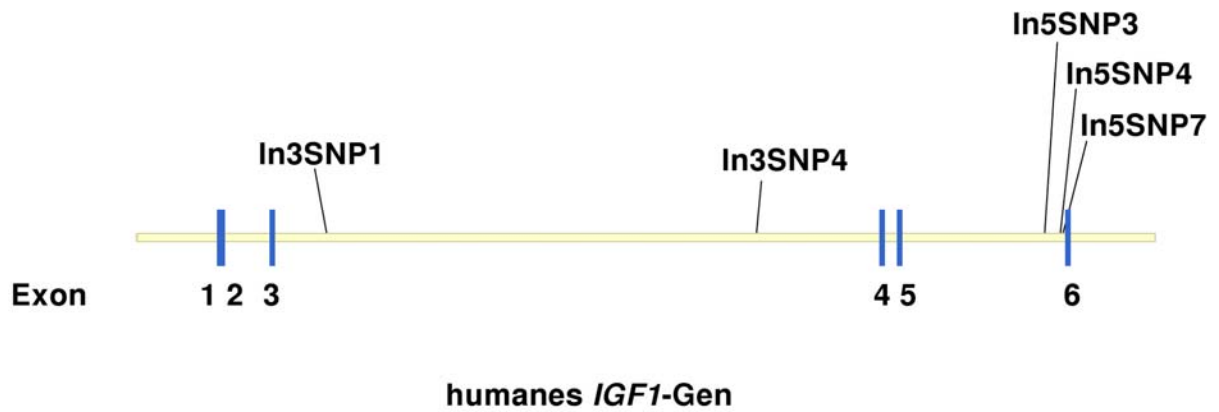


Abbildung 3.9: Graphische Darstellung der Lage der fünf, in der Asthma-Familienstudie analysierten, *IGF1*-SNPs entsprechend der Exon/Intron-Grenzen. Die Graphik wurde mit Hilfe des Programms Vector NTI Suite 6.0 anhand der Daten der Ensembl-Datenbank (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens; Ensembl Transkript-ID: ENST00000392904 und Q13429_human) sowie den Daten aus der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov; NW_925395) erstellt.

SNP	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allel 11	Anzahl der Eltern [N] heterozygot Allel 12	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allele 22	p-Wert nach Pearson's Test / Elston + Forth.
<i>IGF1</i> In3SNP1	S1: 158 S2: 252	S1: 46 S2: 75	S1: 1 S2: 4	0,2214 / 0,3222 0,5465 / 0,8009
<i>IGF1</i> In3SNP4	S1: 106 S2: 171	S1: 82 S2: 132	S1: 17 S2: 24	0,8390 / 0,8635 0,8308 / 0,8904
<i>IGF1</i> In5SNP3	S1: 102 S2: 167	S1: 76 S2: 130	S1: 18 S2: 24	0,4839 / 0,4857 0,8506 / 1,0000
<i>IGF1</i> In5SNP4	S1: 105 S2: 171	S1: 83 S2: 132	S1: 18 S2: 24	0,7824 / 0,7377 0,8308 / 0,8904
<i>IGF1</i> In5SNP7	S1: 132 S2: 215	S1: 56 S2: 88	S1: 9 S2: 11	0,3381 / 0,3495 0,5936 / 0,5604

Tabelle 3.18: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens. Die p-Werte sind einmal für den Test nach Pearson als auch die Methode von Elston und Forthofer angegeben (Elston und Forthofer, 1977; <http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>; Spalte 5). P-Werte < 0,05 bedeuten eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Nur die elterlichen Genotypen flossen in den Test ein. Getestet wurde sowohl für die 172 Familien (S2), als auch für die 108 Familien der Anfangsstudie (S1). Spalte 2: Anzahl der Eltern, die homozygot für das häufigere Allel (Allel 1) des jeweiligen SNPs sind. Spalte 3: Anzahl für den jeweiligen SNP heterozygote Eltern (Allel 12). Spalte 4: Anzahl der Eltern, die homozygot für das seltenere Allel (Allel 2) des jeweiligen SNPs sind.

3.4.3 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen

Für die SNPs des *IGF1*-Gens wurden die statistischen Analysen sowohl mit den 172 Familien (S2) als auch den 108 Familien der Anfangsstudie (S1) durchgeführt. Die Tests erfolgten dabei für die Merkmale Asthma (RC-TDT, Knapp, 1999a und b), erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl, erhöhter SLOPE und verminderter Peak-Flow (QTDT, Abecasis et al., 2000a und b), wobei für SLOPE nur die 108 Familien für die Berechnungen herangezogen wurden (Tabelle 3.21). Die elterlichen Allelverteilungen sind für beide Stichproben als absolute Zahlen [N] sowie relative Frequenzen [%] in Tabelle 3.19a und b wiedergegeben.

Eine Assoziation mit den quantitativen Phänotypen wurde für keinen der fünf SNPs gefunden (Tabelle 3.21, Spalte 3,5,7 und 9). *IGF1* In5SNP7 jedoch zeigte für die 108 Familien eine schwache Kopplung/Assoziation mit Asthma (p-Wert = 0,0363, Tabelle 3.20, Spalte 2), die sich im Fall der größeren Stichprobe (172 Familien) deutlich verstärkte (p-Wert = 0,0046, Tabelle 3.20, Spalte 2).

a)

SNP	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]
<i>IGF1</i> In3SNP1	G	362	88,29
	T	48	11,71
<i>IGF1</i> In3SNP4	G	294	71,53
	A	117	28,47
<i>IGF1</i> In5SNP3	G	280	71,43
	A	112	28,57
<i>IGF1</i> In5SNP4	T	293	71,12
	C	119	28,88
<i>IGF1</i> In5SNP7	G	320	81,22
	C	74	18,78

Tabelle 3.19a: Elterliche Allelverteilungen für die fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens. Die elterlichen Allelverteilungen sind in absoluten Zahlen [N] sowie als relative Frequenzen [%] wiedergegeben (Spalte 3 und 4). Angaben für die 108 Familien (S1).

b)

SNP	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]
<i>IGF1</i> In3SNP1	G	578	87,31
	T	84	12,69
<i>IGF1</i> In3SNP4	G	474	72,37
	A	181	27,63
<i>IGF1</i> In5SNP3	G	464	72,27
	A	178	27,73
<i>IGF1</i> In5SNP4	T	474	72,48
	C	180	27,52
<i>IGF1</i> In5SNP7	G	518	82,48
	C	110	17,52

Tabelle 3.19b: Elterliche Allelverteilungen für die fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens. Die elterlichen Allelverteilungen sind in absoluten Zahlen [N] sowie als relative Frequenzen [%] wiedergegeben (Spalte 3 und 4). Angaben für die 172 Familien (S2).

SNP	RC-TDT p-Wert Asthma
<i>IGF1</i> In3SNP1	S1: 0,5341 S2: 0,0670
<i>IGF1</i> In3SNP4	S1: 0,5310 S2: 0,5370
<i>IGF1</i> In5SNP3	S1: 0,4127 S2: 1,0000
<i>IGF1</i> In5SNP4	S1: 0,6981 S2: 1,0000
<i>IGF1</i> In5SNP7	S1: 0,0363 S2: 0,0046

Tabelle 3.20: Kopplungs-/Assoziationsanalyse für die fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens mit Asthma. Die Analysen erfolgten mit dem RC-TDT (Knapp, 1999a und b) und wurden sowohl für die 108 Familien (S1) als auch die 172 Familien (S2) durchgeführt. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt (Spalte 2).

SNP	mit erhöhtem Gesamt-IgE-assoziertes Allel	p-Wert Gesamt-IgE	mit erhöhter Eos.zellzahl assoziertes Allel	p-Wert Eos.zellzahl	mit erhöhtem SLOPE assoziertes Allel	p-Wert SLOPE	mit vermindertem Peak-Flow assoziertes Allel	p-Wert Peak-Flow
<i>IGF1</i> ln3SNP1	S1: G	0,0830	S1: G	0,0670	S1: G	> 0,1000	S1: G	> 0,1000
	S2: G	> 0,1000	S2: G	0,0490	/	/	S2: G	> 0,1000
<i>IGF1</i> ln3SNP4	S1: A	> 0,1000	S1: A	> 0,1000	S1: A	> 0,1000	S1: A	> 0,1000
	S2: A	> 0,1000	S2: A	> 0,1000	/	/	S2: G	> 0,1000
<i>IGF1</i> ln5SNP3	S1: A	> 0,1000	S1: A	> 0,1000	S1: A	> 0,1000	S1: G	> 0,1000
	S2: A	> 0,1000	S2: A	> 0,1000	/	/	S2: G	> 0,1000
<i>IGF1</i> ln5SNP4	S1: C	> 0,1000	S1: C	> 0,1000	S1: C	> 0,1000	S1: C	> 0,1000
	S2: C	> 0,1000	S2: C	> 0,1000	/	/	S2: T	> 0,1000
<i>IGF1</i> ln5SNP7	S1: C	> 0,1000	S1: C	> 0,1000	S1: C	> 0,1000	S1: C	> 0,1000
	S2: C	> 0,1000	S2: C	> 0,1000	/	/	S2: C	> 0,1000

Tabelle 3.21: Assoziationsanalyse für die fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens mit den quantitativen Merkmalen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl, erhöhter SLOPE und verminderter Peak-Flow. Für Gesamt-IgE-Spiegel, Eosinophilenzellzahl und Peak-Flow erfolgten die Analysen sowohl für die 172 Familien (S2) als auch die 108 Familien (S1), für den SLOPE nur für die 108 Familien (Spalte 6 und 7). Für keinen der fünf SNPs des humanen *IGF1*-Gens konnte eine Assoziation mit den quantitativen Phänotypen gefunden werden (p-Werte > 0,05, Spalte 3,5,7 und 9). In Spalte 2,4,6 und 8 ist der Einfluss des jeweiligen Allels auf den quantitativen Phänotyp in Form einer deskriptiven Statistik wiedergegeben. Der Einfluss ist nur dann von Bedeutung, wenn auch der p-Wert ein signifikanter ist ($p < 0,05$).

3.5 Analyse des humanen *LTA4H*-Gens

Aufgrund der zentralen Rolle der Leukotrien A4 Hydrolase (*LTA4H*) in der Biosynthese von Leukotrien B4 (*LTB4*) (Haeggström, 2000; Haeggström, 2004) stellt das humane *LTA4H*-Gen ein weiteres Asthma-Kandidatengen in der chromosomalen Region 12q13-q24 dar.

Bei dem humanen *LTA4H*-Gen handelt es sich um ein „single-copy“-Gen, welches sich über einen genomischen Bereich von mehr als 35 kb erstreckt (Mancini und Evans, 1995). Es besteht aus 19 Exons mit einer Größe zwischen 24 bp und 312 bp und 18 Introns, die zwischen 0,26 Kb und 5,7 Kb groß sind (Mancini und Evans, 1995). Der Translationsstartpunkt für das 611 Aminosäure umfassende Protein befindet sich in Exon 1, 151 bp downstream des Transkriptionsstartpunkts, welcher ebenfalls in Exon 1 gelegen ist (Mancini und Evans, 1995). Demnach entfallen ca. 3/4 der Länge von Exon 1 auf die 5'UTR. Ungefähr die Hälfte von Exon 19 stellt die 3'UTR des Gens dar (Mancini und Evans, 1995). Mittels *FISH* (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) konnte gezeigt werden, dass das Gen in der chromosomalen Region 12q22 lokalisiert ist (Mancini und Evans, 1995). In einigen öffentlichen Gen-Datenbanken wird die zytogenetische Lokalisation für *LTA4H* jedoch auch mit 12q23.1 angegeben (<http://www.genecardsweizmann.ac.il/geneloc>; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens).

Wie schon für die Gene *NAB2* und *IGF1* beschrieben, beschränkte sich auch die Analyse des humanen *LTA4H*-Gens auf die Untersuchung bereits bekannter SNPs aus der öffentlichen SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

3.5.1 Validierung von SNPs des humanen *LTA4H*-Gens

Für das humane *LTA4H*-Gen wurden zunächst sieben SNPs aus der öffentlichen SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) ermittelt (Tabelle 3.22). Die Validierung erfolgte dann für vier dieser SNPs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in einem Pool aus genomischer DNA von 286 zufällig ausgewählten adulten Probanden einer deutschen populationsbezogenen Studie (KORA S4-Studie; vgl. Abschnitt 2.1.2). Dabei konnte nur der SNP in Intron 6, *LTA4H* In6SNP1, bestätigt werden (Tabelle 3.22, Spalte 4). Der SNP in der 3'UTR des Gens, *LTA4H* Ex19SNP2, war dagegen nicht vorhanden (Tabelle 3.22, Spalte 4). Mit den Assays für *LTA4H* In3SNP1 und *LTA4H* Ex19SNP1 wurden keine Ergebnisse erzielt (Tabelle 3.22, Spalte 4). Für die restlichen drei SNPs des humanen *LTA4H*-Gens (*LTA4* In3SNP2, *LTA4H* In3SNP3 und *LTA4H* In11SNP1), erfolgte die Validierung direkt in der Asthma-Familienstudie mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie im 384 Well-Format (Tabelle 3.22, Spalte 5). Dabei konnten alle drei SNPs bestätigt werden.

SNP	Position in bp relativ zum Translationsstartpunkt in Exon 1	Lage im Gen entsprechend Exon / Intron-Grenzen	in KORA-Pool bestätigt	in Asthma-Studie bestätigt	GenBank ref. SNP Id (rs#) / Assay Id (ss#)	GenBank Contig-Accession-Nr.
<i>LTA4H</i> In3SNP1	9085A>G	Intron 3	nicht funktioniert	nicht getestet	763874 / 150178	NT_019546
<i>LTA4H</i> In3SNP2	9264G>A	Intron 3	nicht getestet	ja	763876 / 150180	NT_019546
<i>LTA4H</i> In3SNP3	9357C>T	Intron 3	nicht getestet	ja	763875 / 150179	NT_019546
<i>LTA4H</i> In6SNP1	15314C>T	Intron 6	ja	nicht funktioniert	1990611 / 2902422	NT_019546
<i>LTA4H</i> In11SNP1	20097T>C	Intron 11	nicht getestet	ja	1978331 / 2883359	NT_019546
<i>LTA4H</i> Ex19SNP1	34494C>G	Exon 19	nicht funktioniert	nicht getestet	1803916 / 2424624	NT_019546
<i>LTA4H</i> Ex19SNP2	34607A>C	Exon 19 (3'UTR)	nein	nicht getestet	1050970 / 1526104	NT_019546

Tabelle 3.22: Übersicht über die sieben, aus der öffentlichen SNP-Datenbank entnommenen, SNPs des humanen *LTA4H*-Gens. Die Position der SNPs im Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen ist in Spalte 3, die Position der SNPs in bp relativ zum Translationsstartpunkt in Exon 1 in Spalte 2 wiedergegeben (vgl. Mancini und Evans, 1995). Die Annotation erfolgte anhand der Originaldaten von Mancini und Evans, 1995 und den Daten aus der Ensembl-Datenbank (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens; Ensembl Transkript-ID: ENST00000228740). Die jeweiligen SNP-Datenbank-Referenznummern sowie die dazugehörige Contig-Accession-Nummer sind in Spalte 6 und 7 angegeben (<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>).

3.5.2 Genotypisierung der *LTA4H*-SNPs in der Asthma-Familienstudie

Die Genotypisierung innerhalb der 172 Familien (748 Probanden: 344 Eltern, 404 Kinder) der Asthma-Familienstudie erfolgte für alle vier validierten SNPs des humanen *LTA4H*-Gens mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie im 384 Well-Format. Für Probanden, bei denen eine Genotypisierung im ersten Ansatz fehlschlug, wurde diese im 96 Well-Format wiederholt. Allerdings konnten für den SNP in Intron 6, *LTA4H* In6SNP1, keine eindeutigen Massenspektren erzielt werden (Tabelle 3.22, Spalte 5), weshalb keine weiteren Analysen durchgeführt wurden. Demnach standen drei SNPs, zwei in Intron 3 (*LTA4H* In3SNP2 und *LTA4H* In3SNP3) und einer in Intron 11 (*LTA4H* In11SNP1), für weitere statistische Analysen zur Verfügung (Tabelle 3.22, Spalte 5). Die Genotypisierungsraten lagen dabei

zwischen 91% und 95%. Eine graphische Übersicht über die Lage der drei SNPs im humanen *LTA4H*-Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen ist in Abbildung 3.10 wiedergegeben.

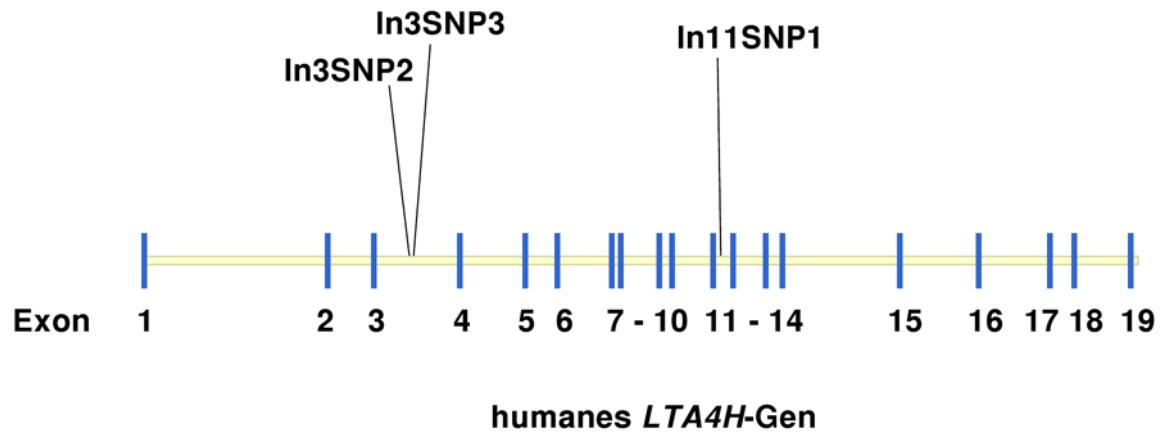


Abbildung 3.10: Graphische Darstellung der Lage der drei, in der Asthma-Familienstudie analysierten *LTA4H*-SNPs im humanen *LTA4H*-Gen entsprechend der Exon/Intron-Grenzen. Die Graphik wurde mit dem Programm Vector NTI Suite 6.0 erstellt anhand der Originaldaten von Mancini und Evans (Mancini und Evans, 1995) und den Daten aus der Ensembl-Datenbank (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens; Ensembl Transkript-ID: ENST00000228740).

Eine Überprüfung der Genotypen ergab für keinen der drei SNPs Unstimmigkeiten zwischen den Genotypen der Eltern und denen ihrer Kinder („Mendel-Check“). Für die elterlichen Genotypen wurden keine Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet (p -Werte $> 0,05$; Tabelle 3.23, Spalte 5), wobei die Tests sowohl für die 172 Familien (S2) als auch die 108 Familien der Anfangsstudie (S1) durchgeführt wurden (Tabelle 3.23). Somit konnten Genotypisierungsfehler weitestgehend ausgeschlossen werden.

SNP	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allel 11	Anzahl der Eltern [N] heterozygot Allel 12	Anzahl der Eltern [N] homozygot Allel 22	p- Wert nach Pearson's Test / Elston + Forthof.
<i>LTA4H</i> In3SNP2	S1: 181 S2: 280	S1: 20 S2: 30	S1: 0 S2: 0	0,4579 / 1,0000 0,3706 / 1,0000
<i>LTA4H</i> In3SNP3	S1: 168 S2: 265	S1: 35 S2: 60	S1: 2 S2: 2	0,9062 / 0,6992 0,4785 / 0,7531
<i>LTA4H</i> In11SNP1	S1: 65 S2: 102	S1: 108 S2: 172	S1: 32 S2: 52	0,2421 / 0,3149 0,1454 / 0,1735

Tabelle 3.23: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für die drei SNPs des humanen *LTA4H*-Gens. Die p-Werte sind einmal für den Test nach Pearson als auch die Methode von Elston und Forthofer angegeben (Elston und Forthofer, 1977; <http://ihg.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>; Spalte 5). P-Werte < 0,05 bedeuten eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Nur die elterlichen Genotypen flossen in den Test ein. Getestet wurde sowohl für die 172 Familien (S2) als auch für die 108 Familien der Anfangsstudie (S1). Spalte 2: Anzahl der Eltern, die homozygot für das häufigere Allel (Allel 1) des jeweiligen SNPs sind. Spalte 3: Anzahl für den jeweiligen SNP heterozygote Eltern (Allel 12). Spalte 4: Anzahl der Eltern, die homozygot für das seltenere Allel (Allel 2) des jeweiligen SNPs sind.

3.5.3 Statistische Auswertung - Kopplungs- und Assoziationsanalysen

Alle drei SNPs des humanen *LTA4H*-Gens wurden in der Familienstudie auf Kopplung/Assoziation mit Asthma, erhöhtem Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhter Eosinophilenzellzahl, erhöhtem SLOPE und vermindertem Peak-Flow untersucht. Mit Ausnahme des SLOPE, für den die Berechnungen nur mit den 108 Familien der Anfangsstudie (S1) durchgeführt wurden, erfolgten die statistischen Analysen für alle Merkmale sowohl mit den 172 Familien (S2) als auch den 108 Familien (S1). Die elterlichen Allelverteilungen sind für beide Stichproben als absolute Zahlen [N] sowie relative Frequenzen [%] in Tabelle 3.24, Spalte 3 und 4 angegeben.

a)

SNP	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]
<i>LTA4H</i> In3SNP2	G	382	95,02
	A	20	04,98
<i>LTA4H</i> In3SNP3	C	371	90,49
	T	39	09,51
<i>LTA4H</i> In11SNP1	T	238	58,05
	C	172	41,95

b)

SNP	Allel	Anzahl der elterlichen Allele [N]	Allelfrequenz der elterlichen Allele [%]
<i>LTA4H</i> In3SNP2	G	590	95,16
	A	30	04,84
<i>LTA4H</i> In3SNP3	C	590	90,21
	T	64	09,79
<i>LTA4H</i> In11SNP1	T	376	57,67
	C	276	42,33

Tabelle 3.24: Elterliche Allelverteilungen für die drei SNPs des humanen *LTA4H*-Gens. Die elterlichen Allelverteilungen sind in absoluten Zahlen [N] und als relative Frequenzen [%] wiedergegeben (Spalte 3 und 4).

a) Angaben für die 108 Familien (S1). b) Angaben für die 172 Familien (S2).

Während keiner der SNPs eine Kopplung/Assoziation mit Asthma zeigte (p-Werte $> 0,05$; Tabelle 3.25, Spalte 2), konnte für *LTA4H* In3SNP2 mit beiden Stichproben eine schwache Assoziation des häufigeren Allels (Allel G) mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel beobachtet werden (p-Werte: 0,0220 und 0,0210; Tabelle 3.26, Spalte 3). Im Falle der kleineren Stichprobe (108 Familien, S1) ergab sich für diesen SNP auch eine schwache Assoziation des häufigeren Allels (Allel G) mit einem verminderten Peak-Flow-Wert (p-Wert = 0,0300; Tabelle 3.26, Spalte 9), die jedoch mit der größeren Stichprobe (172 Familien) nicht bestätigt werden konnte (p-Wert $> 0,1000$; Tabelle 3.26, Spalte 9).

SNP	RC-TDT p-Wert Asthma
<i>LTA4H</i> In3SNP2	S1: 0,1433 S2: 0,3581
<i>LTA4H</i> In3SNP3	S1: 0,4694 S2: 0,2666
<i>LTA4H</i> In11SNP1	S1: 0,3006 S2: 0,2122

Tabelle 3.25: Kopplungs-/Assoziationsanalyse für die drei SNPs des humanen *LTA4H*-Gens mit Asthma.

Die Analysen erfolgten mit dem RC-TDT (Knapp, 1999a und b) und wurden sowohl für die 108 Familien (S1) als auch die 172 Familien (S2) durchgeführt. Keiner der drei SNPs zeigte eine Kopplung/Assoziation mit Asthma (p-Werte $> 0,05$; Spalte 2).

SNP	mit erhöhtem Gesamt-IgE assoziiertes Allele	p-Wert Gesamt-IgE	mit erhöhter Eos.zellzahl assoziiertes Allel	p-Wert Eos.zellzahl	mit erhöhtem SLOPE assoziiertes Allele	p-Wert SLOPE	mit vermindertem Peak-Flow assoziiertes Allele	p-Wert Peak-Flow
<i>LTA4H</i> In3SNP2	S1: G S2: G	0,0220 0,0210	S1: G S2: G	>0,1000 >0,1000	S1: A /	>0,1000 /	S1: G S2: G	0,0300 >0,1000
<i>LTA4H</i> In3SNP3	S1: T S2: T	>0,1000 >0,1000	S1: T S2: C	>0,1000 >0,1000	S1: T /	>0,1000 /	S1: C S2: C	>0,1000 0,0750
<i>LTA4H</i> In11SNP1	S1: T S2: T	>0,1000 >0,1000	S1: C S2: T	>0,1000 >0,1000	S1: T /	>0,1000 /	S1: T S2: T	>0,1000 >0,1000

Tabelle 3.26: Assoziationsanalyse für die drei SNPs des humanen *LTA4H*-Gens mit den quantitativen Merkmalen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl, erhöhter SLOPE und verminderter Peak-Flow. Für Gesamt-IgE-Spiegel, Eosinophilenzellzahl und Peak-Flow erfolgten die Analysen sowohl für die 172 Familien (S2) als auch die 108 Familien (S1), für den SLOPE nur für die 108 Familien (Spalte 6 und 7). Signifikante p-Werte sind fett gedruckt (Spalte 3 und 9). In Spalte 2,4,6 und 8 ist der Einfluss des jeweiligen Allels auf den quantitativen Phänotyp in Form einer deskriptiven Statistik wiedergegeben. Der Einfluss ist nur dann von Bedeutung, wenn auch der p-Wert signifikant ist ($p < 0,05$).

4. Diskussion

Viele genomweite Kopplungsstudien, regional beschränkte Kopplungsanalysen sowie Kandidatengenanalysen konnten für die chromosomale Region 12q13-q24 Kopplung bzw. Assoziation mit *Asthma bronchiale* und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen wie z.B. erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl und bronchiale Hyperreaktivität (BHR) in verschiedenen ethnischen Populationen nachweisen (Zusammenfassungen in z.B. Noguchi und Arinami, 2001 und Wills-Karp und Ewart, 2004). Auch in der, dieser Arbeit zugrunde liegenden, deutschen Asthma-Familienstudie wurde für einige Mikrosatellitenmarker dieser Region Kopplung mit Asthma und Asthma-assoziierten Phänotypen gefunden (Wjst et al., 1999a; Immervoll et al., 2001; vgl. Abschnitt 1.5.3; Abb. 1.5). Ausgehend von den Grob- und Feinkartierungsergebnissen dieser Studie wurden nun im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Asthma-Kandidatengene in der chromosomalen Region 12q auf Polymorphismen, insbesondere SNPs, untersucht und diese im Anschluß, mittels geeigneter statistischer Analysen, auf Assoziation bzw. Kopplung mit Asthma und den Asthma-assoziierten, quantitativen Merkmalen erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel, erhöhte Eosinophilenzellzahl sowie den Lungenfunktionsparametern erhöhter SLOPE und verminderter Peak-Flow getestet (Erklärung der Lungenfunktionsparameter siehe Abschnitt 1.3.2 und 1.5.3). Sowohl aufgrund ihrer Funktion als auch aufgrund ihrer relativen Lage in Bezug auf die untersuchten Mikrosatellitenmarker wurden die Gene *STAT6* („signal transducer and activator of transcription 6“), *NAB2* (*NGFI-A* Bindeprotein 2), *IGF1* (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1, „insulin-like growth factor 1“), *LTA4H* (Leukotrien A 4 Hydrolase) und *NOS1* (neuronal Stickstoffmonoxidsynthase, „neuronal NO-synthase“) ausgewählt.

4.1 Analyse des humanen *NOS1*-Gens

4.1.1 *NOS1*-SNPs zeigen keine Assoziation mit Asthma und Asthma-assoziierten Phänotypen

Für das humane *NOS1*-Gen wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt zwei SNPs untersucht, die erstmals von Grasemann und Kollegen in einer US-amerikanischen Fall-Kontroll-Studie bestehend aus Kaukasiern, auf Assoziation mit Asthma getestet wurden (Grasemann et al., 1999a). Dabei konnte für den SNP in Exon 18, *NOS1* Ex18SNP1, übereinstimmend in sowohl der eigenen Asthma-Familienstudie als auch der Grasemann-Studie keine Assoziation mit Asthma nachgewiesen werden ($p=0,3010$; vgl. Tabelle 3.3;

Grasemann et al., 1999a). Da dieser SNP allerdings zu keinem Aminosäureaustausch führt, ist er von keiner funktionellen Relevanz und hätte, im Falle einer Assoziation, nur einen weiteren Marker dargestellt.

Von weitaus größerer funktioneller Bedeutung ist der zweite *NOS1*-SNP, *NOS1* Ex29SNP1. Dieser SNP ist in der 3'UTR des Gens lokalisiert, einem Bereich, dem eine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression zukommt, wie im Rahmen der *STAT6*-Diskussion in einem späteren Abschnitt ausführlich erläutert wird (vgl. Abschnitt 4.2.5). Allerdings konnte die, für diesen SNP in der Grasemann-Studie gefundene, signifikante Assoziation mit Asthma ($p < 0,05$; Grasemann et al., 1999a) in der eigenen Asthma-Familienstudie nicht bestätigt werden ($p = 0,7971$; vgl. Tabelle 3.3). Auch in einer chinesischen Fall-Kontroll-Studie, bestehend aus asthmatischen und gesunden Kindern, zeigte dieser SNP keine Assoziation mit sowohl Asthma als auch Atopie sowie einem erhöhten NO-Spiegel in der Atemluft (Leung et al., 2005). Da es sich bei der Grasemann-Studie um erwachsene Probanden handelt, die eigene Studie jedoch asthmatische Kinder und deren Eltern umfaßt („affected sib-pair“-Design; vgl. Abschnitt 2.1.3), erwecken diese Ergebnisse den Anschein, dass *NOS1* Ex29SNP1 in der Entwicklung des kindlichen Asthmas keine Rolle spielt. Dies setzt jedoch voraus, dass die erwachsenen Probanden in der Grasemann-Studie nicht bereits im Kindesalter an Asthma erkrankt waren. Die Ergebnisse weiterer, ebenfalls aus erwachsenen Probanden bestehenden, Studien, sprechen ebenfalls gegen diese Vermutung. So konnte weder in einer kolumbianischen Fall-Kontroll-Studie noch in einer tschechischen Fall-Kontroll-Studie eine Assoziation von *NOS1* Ex29SNP1 mit Asthma nachgewiesen werden (Hollá et al., 2004; Martinez et al., 2007). Aufgrund der unterschiedlichen ethnischen Hintergründe der Studien scheinen ethnische Unterschiede bezüglich der Rolle von *NOS1* Ex29SNP1 in der Pathogenese von Asthma ebenfalls nicht in Frage zu kommen.

Die in den verschiedenen Studien erzielten, unterschiedlichen Assoziationsergebnisse für Asthma können jedoch auch damit zusammenhängen, dass die Rekrutierung von Asthmapatienten für genetische Studien keinen einheitlichen medizinischen Standards folgt, was wiederum auf die bis heute fehlende allgemeingültige Standarddefinition von Asthma zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt 1.2). Gerade in der Patienten- und Familienanamnese können die einzelnen Studien mehr oder weniger stark voneinander abweichen, was einen direkten Vergleich der einzelnen Studienergebnisse erschwert.

Daneben spielen auch das unterschiedliche Studiendesign (Fall-Kontroll- versus Familienstudie) sowie Anzahl und Zusammensetzung der, in die statistischen Tests eingeflossenen, Stichproben eine bedeutende Rolle, wie in einem späteren Abschnitt am Beispiel der SNPs in der 3'UTR des humanen *STAT6*-Gens ausführlich diskutiert wird (vgl.

Abschnitt 4.2.3). Letzteres ist vor allem beim Vergleich der Assoziationsergebnisse von quantitativen Merkmalen wie Gesamt-IgE-Spiegel oder Eosinophilie zu berücksichtigen. Während das T-Allel von *NOS1* Ex29SNP1 sowohl in der o.g. chinesischen als auch der tschechischen Studie mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel assoziiert war (Hollá et al., 2004; Leung et al. 2005), ergab sich in der kolumbianischen Studie keine Assoziation (Martinez et al., 2007). In der eigenen Asthma-Familienstudie konnte für *NOS1* Ex29SNP1 ebenfalls keine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel nachgewiesen werden ($p > 0,1000$; vgl. Tabelle 3.4).

Neben den beiden, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, *NOS1*-SNPs waren in den letzten Jahren vor allem ein CA-Dinukleotidrepeat in Exon 29 von *NOS1* sowie ein AAT-Trinukleotidrepeat in Intron 20 Gegenstand einer Reihe von Assoziationsstudien mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund. Dabei konnten für den CA-Repeat in der bereits erwähnten kolumbianischen Studie eine Assoziation mit sowohl Asthma als auch einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gefunden werden (Martinez et al., 2007), in der kaukasischen Studie von Grasemann und Kollegen dagegen war dieser Repeat zwar mit Asthma, nicht aber dem Gesamt-IgE-Spiegel, assoziiert (Grasemann et al., 2000). Der Trinukleotidrepeat in Intron 20 dagegen zeigte in einer kaukasischen Studie eine signifikante Assoziation mit dem NO-Spiegel in der Atemluft von Asthmatikern (Wechsler et al., 2000), die jedoch weder in der o.g. chinesischen Studie (Leung et al., 2005), noch einer australischen Studie (Ali et al., 2003) bestätigt werden konnte. Dafür ergab sich in diesen Studien eine Assoziation dieses Repeats mit dem Merkmal Atopie (Ali et al., 2003) bzw. einem erhöhten Gesamt IgE-Spiegel (Leung et al., 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse wäre eine Untersuchung dieser beiden Repeats auch in dieser Arbeit interessant gewesen. Da jedoch die Analyse des humanen *NOS1*-Gens nicht das Hauptanliegen dieser Arbeit war, sondern lediglich zur Einarbeitung in die Materie und Methodik diente, wurde von der Analyse dieser beiden Repeats sowie weiterer *NOS1*-Polymorphismen Abstand genommen.

4.2 Analyse des humanen *STAT6*-Gens

4.2.1 Die kodierende Region des humanen *STAT6*-Gens ist hoch konserviert

Im Rahmen der Analyse des humanen *STAT6*-Gens wurden alle 23 Exons, jeweils 20-100 bp der angrenzenden Introns sowie die upstream des Gens gelegene Promotorregion mittels direkter Sequenzierung der DNA von 32 genetisch unabhängigen Probanden einer deutschen Studie (vgl. Abschnitt 2.1.1) systematisch auf das Vorhandensein von Polymorphismen untersucht. Dabei wurden 10 Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) identifiziert, von

denen zwei in der Promotorregion (*STAT6* 5'flankingSNP1-2) und fünf in der 3'UTR (Exon 23, *STAT6* 3'UTRSNP1-5) des Gens lokalisiert sind (vgl. Tabelle 3.5). Die restlichen drei SNPs sind alle intronisch (*STAT6* In16SNP1, *STAT6* In17SNP1 und *STAT6* In18SNP1, vgl. Tabelle 3.5).

Im Gegensatz dazu wurden in der kodierenden Region des Gens, Exon 3 bis einschließlich die ersten 186 bp von Exon 23, keine Polymorphismen gefunden. Dies steht im Einklang mit dem Befund einer anderen deutschen Studie, bei der mittels direkter DNA-Sequenzierung die DNA von 41 genetisch unabhängigen, adulten Deutschen untersucht wurde und ebenfalls keine Polymorphismen in der kodierenden Region von *STAT6* identifiziert werden konnten (Heinzmann et al., 2000). Eine DHPLC-Analyse („denaturing high-performance liquid chromatography“-Analyse) mit der DNA von 14 genetisch unabhängigen Probanden einer finnischen Studie lieferte das gleiche Ergebnis (Pykläläinen et al., 2005). Des Weiteren erwiesen sich in einer britischen Population drei, der öffentlichen SNP-Datenbank entnommene, in der kodierenden Region von *STAT6* lokalisierte SNPs als monomorph (Moller et al., 2007).

Das Phänomen einer Polymorphismen-freien kodierenden Region des humanen *STAT6*-Gens scheint dabei keineswegs auf die europäisch-kaukasische Bevölkerung beschränkt zu sein, da auch innerhalb einer nord-indischen Population mittels direkter DNA-Sequenzierung keine Polymorphismen in diesem Bereich entdeckt werden konnten (Nagarkatti und Ghosh, 2002).

Die Ergebnisse dieser Studien lassen auf einen hoch konservierten Charakter der kodierenden Region des humanen *STAT6*-Gens schließen. Dieser stellt möglicherweise das Ergebnis eines starken negativen Selektionsdrucks auf Polymorphismen innerhalb der kodierenden Region dar. So könnte eine SNP-bedingte Veränderung der Aminosäuresequenz zu solch starken funktionellen Beeinträchtigungen des STAT6-Proteins führen, dass selbst ein heterozygoter Zustand fatale Folgen hätte. Interessant wäre demnach, zu untersuchen, ob auch in weiteren ethnischen Populationen keine Polymorphismen in der kodierenden Region des humanen *STAT6*-Gens auftreten.

Aufgrund fehlender Polymorphismen in der kodierenden Region des *STAT6*-Gens ist ein möglicher Einfluß von STAT6 auf die Ätiologie von *Asthma bronchiale* und/oder den Asthma-assoziierten Phänotypen eher auf Polymorphismen zurückzuführen, die z. B. in einer Veränderung der *STAT6*-Transkriptions- oder Translationsrate resultieren als auf eine Veränderung der Aminosäuresequenz.

4.2.2 SNPs in der 3'UTR von *STAT6* zeigen eine schwache Assoziation mit Asthma-assoziierten Phänotypen

Insgesamt wurden fünf, in der 3'UTR (3' untranslatierte Region) des humanen *STAT6*-Gens lokalisierte SNPs, *STAT6* 3'UTRSNP1-5, in der deutschen Asthma-Familienstudie auf Assoziation mit Asthma und Asthma-assoziierten Phänotypen untersucht. Dabei konnte weder für Asthma noch für eine erhöhte Eosinophilenzellzahl (Eosinophilie) eine Assoziation mit einem dieser SNPs gefunden werden ($p > 0,05$; vgl. Tabelle 3.7 und 3.8). Lediglich *STAT6* 3'UTRSNP3 zeigte eine schwache Assoziation mit einem erhöhten SLOPE ($p = 0,0370$; vgl. Tabelle 3.8). Für den benachbarten *STAT6* 3'UTRSNP4 dagegen ergab sich eine, ebenfalls schwache, Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel ($p = 0,0280$; vgl. Tabelle 3.8).

Die meisten der, in der 3'UTR gelegenen, SNPs wurden mittlerweile in weiteren Studien, mit teilweise unterschiedlichem ethnischen Hintergrund, auf Assoziation mit Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen untersucht. Den am häufigsten untersuchten SNP stellt dabei *STAT6* 3'UTRSNP1 dar. Für diesen SNP konnte in der hier verwendeten deutschen Asthma-Familienstudie für keinen der untersuchten Phänotypen eine Assoziation beobachtet werden (vgl. Tabelle 3.7 und 3.8). Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen einer finnischen Familienstudie, die weder für Asthma noch für einen erhöhten Serum-IgE-Spiegel eine Assoziation mit *STAT6* 3'UTRSNP1 finden konnten (Pykäläinen et al., 2005). Gleiche Ergebnisse erzielten auch Gao und Kollegen in einer britischen Fall-Kontroll-Studie. In dieser Studie zeigte *STAT6* 3'UTRSNP1 weder Assoziation mit Asthma ($p = 0,470$) noch einem erhöhten IgE-Spiegel ($p = 0,302$) noch Atopie ($p = 0,442$; Gao et al., 2000). Eine weitere Analyse, bei der die Unterteilung des Phänotyps Asthma in die beiden Formen atopisches Asthma und nicht-atopisches Asthma erfolgte, lieferte in der britischen Studie ebenfalls keine signifikante Assoziation ($p = 0,555$; Gao et al., 2000). Da es sich bei allen drei Studien um Probanden mit annähernd gleichem ethnischen Hintergrund handelt, legen diese Ergebnisse die Vermutung nahe, dass *STAT6* 3'UTRSNP1 in der europäisch-kaukasischen Bevölkerung keinen Einfluß auf die Ätiologie von Asthma bzw. einem erhöhten IgE-Spiegel hat und zwar unabhängig davon, ob es sich um kindliches Asthma (deutsche und finnische Familienstudie) oder adultes Asthma (britische Studie) handelt.

Etwas anders sieht es da in der japanischen Bevölkerung aus. So konnten Gao und Kollegen in einer großen japanischen Fall-Kontroll-Studie eine signifikante Assoziation von *STAT6* 3'UTRSNP1 mit dem Phänotyp leichtes, atopisches Erwachsenen-Asthma nachweisen ($p = 0,0043$; Gao et al., 2000). Für die Phänotypen schweres atopisches Erwachsenen-Asthma, schweres atopisches kindliches Asthma, intrinsisches (nicht-atopisches) Erwachsenen-

Asthma, erhöhter IgE-Spiegel sowie Atopie dagegen konnten in der gleichen Studie keine Assoziationen mit *STAT6* 3'UTRSNP1 gefunden werden (p-Werte alle $>0,1$; Gao et al., 2000). In einer anderen japanischen Fall-Kontroll-Studie, bei der die Fälle aus Kindern mit einer atopischen Erkrankung (atopisches Asthma, atopisches Ekzem und lebensmittelinduzierte Anaphylaxie) bestanden, war *STAT6* 3'UTRSNP1 ebenfalls mit keinem der untersuchten Phänotypen assoziiert (p-Werte zwischen 0,01369 und 0,4974; Tamura et al., 2001; Tamura et al., 2003). Zusammen weisen diese Ergebnisse auf eine, bereits seit langem postulierte (vgl. Abschnitt 1.5.1), genetische Heterogenität von Asthma und Asthma-assoziierten Phänotypen hin. Die Ergebnisse der japanischen Studien erwecken zusätzlich den Anschein, dass diese genetische Heterogenität nicht nur auf unterschiedliche ethnische Gruppen beschränkt zu sein scheint, sondern auch innerhalb einer ethnischen Gruppe auftreten kann. So könnten für die verschiedenen Asthmatypen innerhalb einer Population unterschiedliche Polymorphismen im *STAT6*-Gen verantwortlich sein.

Wie bereits im Rahmen der *NOS1*-Diskussion erwähnt (vgl. Abschnitt 4.1.1), gibt es neben einer genetischen Heterogenität noch weitere Gründe, mit denen sich unterschiedliche Assoziationsergebnisse für ein und denselben Polymorphismus in verschiedenen Studien erklären lassen, wie im nächsten Abschnitt am Beispiel der SNPs *STAT6* 3'UTRSNP3 und *STAT6* 3'UTRSNP4 näher erläutert wird.

4.2.3 Verschiedene Studien zeigen unterschiedliche Assoziationsergebnisse - eine Analyse am Beispiel zweier SNPs in der 3'UTR von *STAT6*

Die für das humane *STAT6*-Gen in der Asthma-Familienstudie erzielten und 2002 in Duetsch et al. veröffentlichten Ergebnisse waren der Anlaß, die für einzelne *STAT6*-SNPs nachgewiesenen Assoziationen in zwei weiteren deutschen Studien zu replizieren (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004). Bei beiden Studien handelt es sich dabei um große, populationsbezogene Fall-Kontroll-Studien, wobei sich die erste Studie aus insgesamt 1.120 deutschstämmigen Schulkindern aus München (n=528) und Leipzig (n=592) zusammensetzte (Schedel et al., 2004). Die zweite Studie hingegen bestand aus Erwachsenen im Alter zwischen 24 und 74 Jahren (KORA C-Studie; Weidinger et al., 2004). Weiterhin umfaßte das zu untersuchende SNP-Panel in beiden Studien nicht alle 13, in dieser Arbeit untersuchten, *STAT6*-SNPs, sondern beschränkte sich hauptsächlich auf solche *STAT6*-SNPs, für die in der Asthma-Familienstudie eine Assoziation mit Asthma-assoziierten Phänotypen gefunden wurde (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; vgl. Tabelle 3.8). Neben den intronischen SNPs *STAT6* In2SNP3 und *STAT6* In18SNP1 waren dies vor allem die beiden, in der 3'UTR

lokalisierten, SNPs *STAT6* 3'UTRSNP3 und *STAT6* 3'UTRSNP4 (vgl. Tabelle 3.8). Dabei stimmten für alle vier SNPs die, in den beiden deutschen Fall-Kontroll-Studien erzielten, Allelfrequenzen mit den elterlichen Allelfrequenzen der Asthma-Familienstudie weitestgehend überein (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; vgl. Tabelle 3.7). Diese Übereinstimmung und die Tatsache, dass sich alle elterlichen Genotypen der Asthma-Familienstudie im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden (vgl. Tabelle 3.6), spricht für eine gute Qualität der Genotypisierung, so dass Genotypisierungsfehler ausgeschlossen werden können.

Übereinstimmungen ergaben sich auch hinsichtlich der für Asthma erzielten Assoziationsergebnisse. So konnte sowohl in der Kinderstudie von Schedel und Kollegen als auch der Erwachsenenstudie von Weidinger und Kollegen weder für *STAT6* 3'UTRSNP3 noch *STAT6* 3'UTRSNP4 eine signifikante Assoziation mit Asthma nachgewiesen werden, was mit den eigenen Ergebnissen konform geht (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; Klopp, persönliche Mitteilung; vgl. Tabelle 3.7).

Die in der Asthma-Familienstudie gefundene schwache Assoziation von *STAT6* 3'UTRSNP4 mit einem erhöhten Gesamt IgE-Spiegel ($p=0,0280$; vgl. Tabelle 3.8) konnte dagegen in keiner der beiden Fall-Kontroll-Studien bestätigt werden (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004). Dafür war *STAT6* 3'UTRSNP3 in der Kinderstudie signifikant mit einem erhöhten Serum (Gesamt)-IgE-Spiegel assoziiert ($p=0.003$; Schedel et al., 2004). Dies konnte sowohl in der gesamten Population (München und Leipzig) als auch den beiden Subpopulationen, München bzw. Leipzig, beobachtet werden (Schedel et al., 2004). Sowohl in der eigenen Asthma-Familienstudie als auch in der Studie von Weidinger und Kollegen war dieser SNP hingegen nicht mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel assoziiert (Weidinger et al., 2004; vgl. Tabelle 3.8). Da die beiden SNPs jedoch nur 61 bp voneinander entfernt liegen (vgl. Tabelle 3.5) und sich in der Asthma-Familienstudie in einem signifikanten Kopplungsungleichgewicht befanden (vgl. Abschnitt 3.2.3.2), sind diese Unterschiede jedoch nur dann von Bedeutung, wenn es sich bei einem der SNPs um einen funktionellen (kausalen) SNP handeln würde. Sind sie nicht kausal und stellen lediglich genetische Marker dar, ist es aufgrund des bestehenden Kopplungsungleichgewichts unbedeutend ob nun *STAT6* 3'UTRSNP3 oder *STAT6* 3'UTRSNP4 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel assoziiert ist. Ob, und wenn ja, welcher der beiden SNPs von funktioneller Relevanz für die Entwicklung eines erhöhten Gesamt-IgE-Spiegels ist, muß sowieso in funktionellen Studien geklärt werden.

Die unterschiedlichen Assoziationsergebnisse sind am ehesten auf das unterschiedliche Studiendesign der einzelnen Studien zurückzuführen. So handelt es sich bei der, in dieser

Arbeit untersuchten, Studie um eine Familienstudie, bei der sich die einzelnen Familien aus jeweils den Eltern und mindestens zwei an Asthma erkrankten Kindern zusammensetzen („affected sib-pair“-Design; Wjst et al., 1999a; Immervoll et al., 2001; vgl. Abschnitt 2.1.3). Aufgrund dieses Studiendesigns flossen in die statistischen Tests (TDT und QTDT, vgl. Abschnitte 2.3.2.3 und 2.3.2.4) jeweils nur die Familien ein, bei denen mindestens ein Elternteil heterozygot für den zu untersuchenden SNP war. Es bestand somit die Möglichkeit, dass aufgrund einer zu geringen Anzahl an informativen Genotypen (heterozygoten Eltern) die in die statistischen Tests eingeflossene Stichprobe so klein war, daß die statistische Power (Aussagekraft) nicht ausreichte um eine Assoziation zu entdecken (falsch negatives Ergebnis). Dies könnte für den *STAT6* 3'UTRSNP3 der Fall sein, da die Allelfrequenz der elterlichen Allele für das seltenere Allel in der Familienstudie nur 07,92% betraf (vgl. Tabelle 3.7). Bei den anderen beiden Studien dagegen handelt es sich um Fall-Kontroll-Studien. Hier bestehen sowohl die Fälle (erkrankte Personen) als auch die Kontrollen aus genetisch unabhängigen Individuen (vgl. Abschnitt 1.5.2.1). Die Stichproben, die in die statistischen Tests einfließen sind bei diesem Studiendesign in der Regel größer als diejenigen von Familienstudien, vor allem wenn es sich wie hier um sehr große Studien handelt. Dies würde erklären, warum *STAT6* 3'UTRSNP3 in der Kinderstudie eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gezeigt hat, in der Asthma-Familienstudie dagegen nicht. Ein weiterer Punkt ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Stichproben, die in die IgE-Analysen einfließen. Während für die Untersuchungen in der Familienstudie gezielt Familien mit asthmatischen Kindern herangezogen wurden, bestand die Stichprobe in beiden Fall-Kontroll-Studien sowohl aus Asthmatikern als auch aus Probanden mit anderen atopischen Erkrankungen (Heuschnupfen, atopisches Ekzem) (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004). Darüberhinaus hängt die Höhe des Gesamt-IgE-Spiegels im Serum von Alter und Geschlecht des Probanden ab. Demnach gelten für die einzelnen Altersstufen nicht nur unterschiedliche Soll-Werte, der Wert, ab dem ein erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel vorliegt ist ebenfalls ein anderer. Allerdings wurde in allen drei Studien der Gesamt-IgE-Spiegel für die statistischen Tests auf Alter und Geschlecht adjustiert, so dass die Altersabhängigkeit des Gesamt-IgE-Spiegels keinen Einfluß auf das Ergebnis hatte.

Ein unterschiedliches Studiendesign ist wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass die, in der eigenen Studie beobachtete, Assoziation von *STAT6* 3'UTRSNP4 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel nicht auch in einer finnischen Studie nachgewiesen werden konnte (Pykäläinen et al., 2005). Zwar handelt es sich bei dieser Studie ebenfalls um eine Familienstudie, das Studiendesign wich jedoch von demjenigen der eigenen Studie erheblich ab. So umfaßte die finnische Studie auch Familien bei denen ein Elternteil an Asthma

erkrankt war, die jeweiligen Kinder jedoch nicht (Laitinen et al., 1997). Auch wurden asthmatische Verwandte zweiten Grades in die Studie aufgenommen und das Durchschnittsalter der asthmatischen Studienteilnehmer lag deutlich über dem der Probanden der eigenen Studie (Laitinen et al., 1997).

4.2.4 Ein SNP in der 3'UTR von *STAT6* zeigt eine schwache Assoziation mit einem erhöhten SLOPE

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 erwähnt, konnte für den SNP *STAT6* 3'UTRSNP3 in der Asthma-Familienstudie eine schwache Assoziation mit einem erhöhten SLOPE nachgewiesen werden ($p=0,0370$; vgl. Tabelle 3.8). Da er jedoch der einzige *STAT6*-SNP ist, der eine Assoziation mit diesem Merkmal zeigte, und aufgrund des grenzwertigen p-Wertes, ist es fraglich, ob man hier nicht doch von einem falsch positiven Ergebnis ausgehen muß. Da der SLOPE in anderen Studien nicht untersucht wurde, liegen für dieses Merkmal auch keine Vergleichswerte vor. Gegen ein falsch positives Ergebnis spricht jedoch die Tatsache, dass das humane *STAT6*-Gen in derselben chromosomalen Region lokalisiert ist, wie Mikrosatellitenmarker, für die die Feinkartierung der Asthma-Familienstudie eine Assoziation mit einem erhöhten SLOPE ergab (vgl. Abb. 1.5 sowie Abschnitt 1.5.3 und 1.5.4.2). Zur endgültigen Abklärung wären daher Untersuchungen in einer Replikationsstudie sowie in weiteren Studien mit unterschiedlichem Studiendesign und/oder unterschiedlichem ethnischen Hintergrund hilfreich.

4.2.5 Polymorphismen in der 3'UTR von Genen können die Regulation der Genexpression beeinflussen

Seit längerem ist bekannt, dass die 3'UTRs (3' untranslatierten Regionen) von Genen eine bedeutende Rolle in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression spielen (Mignone et al., 2002; Mazumder et al., 2003). Die Effekte reichen dabei über die Modulation des Transports der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma, der Regulation ihrer subzellulären Lokalisation und Stabilität sowie der Translationseffizienz (Mignone et al., 2002; Mazumder et al., 2003). Von großer Wichtigkeit ist dabei die Regulation der mRNA-Stabilität, da von ihr abhängt, wieviel Protein letztendlich synthetisiert werden kann. Die Regulation der mRNA-Stabilität wird dabei hauptsächlich durch bestimmte *cis*-agierende Elemente, welche in der 3'UTR lokalisiert sind, vermittelt (Mignone et al., 2002). In jüngster Zeit konnte für das TNF-alpha-Rezeptor 2-Gen (*TNFR2*-Gen) gezeigt werden, dass ein bestimmter Haplotyp, bestehend aus zwei SNPs in der 3'UTR des Gens, die Stabilität der

mRNA herabsetzt (Puga et al., 2005). Untersuchungen mit zwei SNPs in der 3'UTR des humanen *CRTH2*-Gens, welches für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kodiert, untermauern diese Beobachtungen. Hier konnte für einen bestimmten Haplotyp eine signifikant schnellere Abbaurate der mRNA beobachtet werden, während die mRNA-Stabilität bei einem anderen Haplotyp signifikant erhöht war (Huang et al., 2004). Darüberhinaus zeigte dieser Haplotyp eine signifikante Assoziation mit Asthma sowohl in einer afrikanisch-amerikanischen Population ($p=0,004$) als auch in einer chinesischen Population ($p<0,001$; Huang et al., 2004).

Eine Beeinflussung der *STAT6*-mRNA-Stabilität könnte nun auch für den *STAT6* 3'UTR SNP4 angenommen werden. Er ist unweit eines 78 bp umfassenden Sequenzbereichs in der 3'UTR von *STAT6* lokalisiert, in welchem sich ein Sequenzmotiv befindet, das den schnellen Abbau der mRNA vermittelt (Svaren et al., 1997; vgl. Abschnitt 4.3.1). Darüberhinaus wurde in der Asthma-Familienstudie eine Assoziation des selteneren G-Allels dieses SNPs mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gefunden ($p=0,0280$; vgl. Tabelle 3.8). Basierend auf diesen Daten kann spekuliert werden, dass die mRNA-Stabilität durch das G-Allel erhöht wird. Eine Erhöhung der mRNA-Stabilität könnte bedeuten, dass in, für das G-Allel heterozygoten bzw. homozygoten, Probanden die *STAT6*-mRNA länger für die Translationsmaschinerie zur Verfügung steht. In Folge dessen würden mehr STAT6-Proteine gebildet werden, welche an den Promotor des *IgE*-Gens binden und diesen aktivieren können. Dadurch käme es zu einer erhöhten Transkription des *IgE*-Gens was wiederum eine vermehrte Bildung von IgE zur Folge hätte. STAT6-Bindestellen im Keimbahn-Promotor des *IgE*-Gens wurden bereits identifiziert (Messner et al., 1997; Linehan et al., 1998).

4.2.6 Intronische *STAT6*-SNPs sind mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel assoziiert

Von den insgesamt sechs, in der Asthma-Familienstudie validierten und analysierten, intronischen *STAT6*-SNPs zeigten *STAT6* In2SNP3 und *STAT6* In17SNP1 eine schwache, *STAT6* In18SNP1 eine moderate Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel ($p=0,0200$; $0,0260$ und $0,0070$; vgl. Tabelle 3.8). Für die Merkmale Asthma, Eosinophilie und erhöhter SLOPE dagegen, konnten keine Assoziationen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3.7 und 3.8).

Zwei dieser SNPs, *STAT6* In2SNP3 und *STAT6* In18SNP1, wurden in der Zwischenzeit in drei weiteren kaukasischen Studien untersucht. Bei diesen Studien handelt es sich um die beiden deutschen Fall-Kontroll-Studien sowie die finnische Familienstudie, die im Rahmen

der Diskussion um die, in der 3'UTR von *STAT6* lokalisierten, SNPs in Abschnitt 4.2.3 bereits beschrieben wurden. Dabei konnte weder für *STAT6* In2SNP3 noch *STAT6* In18SNP1 in einer der drei Studien eine Assoziation mit Asthma nachgewiesen werden (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; Klopp, persönliche Mitteilung; Pykäläinen et al., 2005), was mit den eigenen Ergebnissen konform geht.

Von weitaus größerer Bedeutung sind jedoch die, in den einzelnen Studien, für das Merkmal erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel erzielten Assoziationsergebnisse. Trotz des unterschiedlichen Studiendesigns und der unterschiedlichen Stichproben, die in die statistischen Tests einfließen, zeigte *STAT6* In2SNP3 übereinstimmend in allen drei deutschen Studien eine schwache Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel mit annähernd gleichen p-Werten ($p=0,014$, Schedel et al., 2004; $p=0,015$, Weidinger et al., 2004; $p=0,0200$, vgl. Tabelle 3.8). Von insgesamt sechs, in allen drei deutschen Studien analysierten, *STAT6*-SNPs ist dieser SNP damit der einzige, der so ein Ergebnis verzeichnen kann. Dies ist umso interessanter, da es sich bei diesem SNP tatsächlich um einen kausalen handeln könnte, wie im nächsten Abschnitt näher erläutert wird. Allerdings ist zu vermerken, dass sowohl in der Studie von Schedel und Kollegen als auch derjenigen von Weidinger und Kollegen das seltenere T-Allel das Risikoallel für einen erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel darstellte und nicht, wie in der eigenen Asthma-Familienstudie, das häufigere C-Allel (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; vgl. Tabelle 3.8). Dies kann jedoch tatsächlich mit dem unterschiedlichen Studiendesign zusammenhängen, sollte jedoch in weiteren Replikationsstudien überprüft werden. Auch wäre es von Vorteil herauszufinden, warum die, in den deutschen Studien gefundene, Assoziation von *STAT6* In2SNP3 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel nicht auch in der finnischen Familienstudie nachgewiesen werden konnte (Pykäläinen et al., 2005).

Im Gegensatz zu den Assoziationsergebnissen für *STAT6* In2SNP3 konnte die, in der eigenen Studie gefundene, moderate Assoziation von *STAT6* In18SNP1 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel in keiner der drei Studien bestätigt werden (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; Pykäläinen et al., 2005) und das, obwohl die Allelfrequenzen für diesen SNP in den beiden deutschen Studien identisch mit den elterlichen Allelfrequenzen der eigenen Studie waren (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; vgl. Tabelle 3.7). Als Gründe für diese abweichenden Ergebnisse kommen die gleichen in Frage, die bereits in Abschnitt 4.2.3 für die unterschiedlichen Ergebnisse der SNPs in der 3'UTR von *STAT6* ausführlich erläutert wurden. Auch ist *STAT6* In18SNP1 inmitten von Intron 18 lokalisiert, so dass er höchstwahrscheinlich von keiner funktionellen Relevanz ist und deshalb als kausaler Polymorphismus für einen erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel nicht in Frage kommt. Es ist nämlich keineswegs so, dass

kausale Polymorphismen auch automatisch die stärkste Assoziation für das untersuchte Merkmal zeigen. Gleiches ist auch für *STAT6* In17SNP1 anzunehmen. Aufgrund dieser Tatsachen ist davon auszugehen, dass es sich bei *STAT6* In18SNP1 und *STAT6* In17SNP1 um genetische Marker handelt, die mit dem/n eigentlichen kausativem/n *STAT6*-Polymorphismus/en in einem Kopplungsungleichgewicht stehen. Als kausative SNPs kommen dabei die SNPs in der 3'UTR (vgl. Abschnitt 4.2.5), aber auch *STAT6* In2SNP3, wie in Abschnitt 4.2.7 näher erläutert, in Frage. Tatsächlich befanden sich sowohl *STAT6* In18SNP1 als auch *STAT6* In17SNP1 in der Asthma-Familienstudie sowohl mit allen fünf SNPs in der 3'UTR als auch *STAT6* In2SNP3 in einem signifikanten Kopplungsungleichgewicht (vgl. Abschnitt 3.2.3.2).

4.2.7 *STAT6* In2SNP3 ist inmitten einer NF- κ B-Bindestelle lokalisiert

Obwohl mitten in Intron 2 des humanen *STAT6*-Gens lokalisiert, deutet die, für *STAT6* In2SNP3, übereinstimmend in allen drei deutschen Studien gefundene Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel darauf hin, dass es sich hier um einen funktionellen SNP handeln könnte. Die Nähe von Intron 2 zu der upstream von *STAT6* gelegenen Promotorregion und die Tatsache, dass Exon 1 und Exon 2 die 5'UTR des Gens darstellen (vgl. Abschnitt 3.2), untermauern diese Vermutung. Es ist nämlich so, dass Introns, welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu Promotorregionen befinden, Enhancerelemente in Form von z.B. Transkriptionsfaktorbindestellen beinhalten können. Intronische Polymorphismen, die zu einer Veränderung der Bindungseigenschaften solcher Bindestellen führen, hätten demnach einen mehr oder weniger starken Einfluss auf die Genexpression.

Eine Beeinflussung der Genexpression von *STAT6* durch Veränderung der Bindungseigenschaften einer Transkriptionsfaktorbindestelle ist nun auch für *STAT6* In2SNP3 anzunehmen, wie Schedel und Kollegen mit Hilfe von *in silico*-Analysen herausfanden. So konnten sie in Intron 2 von *STAT6* zwei vermeintliche Bindestellen für NF- κ B („nuclear factor- κ B“) identifizieren (Schedel et al., 2004), einem Transkriptionsfaktor, dem eine bedeutende Funktion in einer Reihe immunologischer Prozesse sowie der Regulation von Entzündungen zukommt (Zusammenfassungen in Hoffmann und Baltimore, 2006; Tergaonkar, 2006; www.nf-kb.org). Die beiden NF- κ B-Bindestellen befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander und weisen eine hohe Sequenzkonservierung zwischen verschiedenen Primatenspezies auf (Schedel et al., 2004). Eine dieser NF- κ B-Bindestellen beinhaltet *STAT6* In2SNP3 (Schedel et al., 2004).

Dieses Ergebnis ist umso bedeutender, da Untersuchungen an sowohl Nagern als auch humanen Zelllinien darauf hindeuten, dass STAT6 und NF- κ B bei dem IL-4 vermittelten *class-switching* zu IgE funktionell synergistisch wirken (Messner et al., 1997; Tinnell et al., 1998; Stütz und Woisetschläger, 1999). So konnten im sowohl murinen als auch humanen Keimbahn-Promotor des *IgE*-Gens Bindestellen für beide Transkriptionsfaktoren gefunden werden (Tinnell et al., 1998; Stütz und Woisetschläger, 1999). Diese Befunde und die, in allen drei deutschen Studien gefundene, Assoziation von *STAT6* In2SNP3 mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel erwecken nun den Anschein, dass dieser SNP von weitaus größerer funktioneller Relevanz für die Entwicklung eines IgE-vermittelten allergischen (atopischen) Asthmas zu sein scheint als die SNPs in der 3'UTR von *STAT6*.

Über den genauen Mechanismus, wie das Vorhandensein des Risikoallels von *STAT6* In2SNP3 letztendlich zu einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel beiträgt, kann nur spekuliert werden. So besteht die Möglichkeit, dass das Risikoallel die Bindungseigenschaften der NF- κ B-Bindestelle erhöht und es somit zu einer stärkeren und längeren Bindung von NF- κ B kommt, was wiederum zu einer erhöhten STAT6-Expression führen würde. Folglich ständen mehr STAT6-Proteine für eine Bindung an den *IgE*-Promotor zur Verfügung was wiederum in einer verstärkten IgE-Expression resultieren könnte.

Bindestellen für sowohl STAT6 als auch NF- κ B sind jedoch auch im *IL-4*-Promotor zu finden, wie verschiedene Studien unter Verwendung von Inhibitionsassays herausfanden (Betelli et al., 2005; Zhou et al., 2007; Kwon et al., 2008). Dies führt wiederum zu der Annahme einer genau aufeinander abgestimmten Ko-Regulation der STAT6-Expression mit dem IL-4-induzierten *class-switching* zu IgE (vgl. Abschnitt 1.4 und 1.5.4.2). Als möglicher Regulationsmechanismus käme hierbei eine negative Rückkopplung („feedback“) in Frage, die im Falle einer *STAT6* In2SNP3-bedingten veränderten *STAT6*-Expressionsrate nicht mehr 100%ig greifen würde. Um diese Vermutungen zu untermauern bedarf es jedoch weiterführender, funktioneller Studien.

4.2.8 *STAT6*-Haplotypen zeigen keine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel

Betrachtet man die zwölf häufigsten Haplotypen, die sich für die 13 SNPs von *STAT6* ergaben (Tabelle 3.9), so zeigt sich, dass die Haplotypen mit der Nummer 5 und 10 all diejenigen Allele der verschiedenen SNPs beinhalten, die in den Einzelanalysen eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gezeigt haben (vgl. Tabelle 3.8). Deswegen wäre nun auch für diese beiden Haplotypen eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel

zu erwarten gewesen, was jedoch nicht der Fall war (p -Werte $> 0,06$; K. Rohde, persönliche Mitteilung).

Diese negativen Ergebnisse könnten damit zusammenhängen, dass nur eine kleine Anzahl informativer Familien in die statistischen Tests einfließen und somit die statistische Teststärke (Power) nicht ausreichte, um eine Assoziation nachzuweisen. Demnach könnte es sich bei den Assoziationsergebnissen der Haplotypen Nummer 5 und 10 um falsch negative Ergebnisse handeln. Der Grund für die kleine Anzahl an informativen Familien ist zum Einen die sehr niedrige Frequenz dieser beiden Haplotypen. So wurde für den Haplotyp Nummer 5 eine Frequenz von gerade mal 5,65% geschätzt, für den Haplotyp Nummer 10 lag diese sogar bei nur 2,12% (vgl. Tabelle 3.9). Zum Anderen mußten eine ganze Reihe von Familien von der Analyse ausgeschlossen werden, da die geschätzten Haplotypen zwar kompatibel mit den Genotypen der Eltern, nicht jedoch mit denen der Kinder waren (K. Rohde, persönliche Mitteilung).

Da Genotypisierungsfehler weitestgehend ausgeschlossen werden können, besteht die Möglichkeit, dass diese Inkompatibilitäten auf Rekombinationsereignisse innerhalb des *STAT6*-Gens zurückzuführen sind. Dafür würden auch die, für einzelne SNP-Paare gefundenen, Abweichungen vom Kopplungsungleichgewicht („linkage disequilibrium“, LD) sprechen (vgl. Abschnitt 3.2.3.2). Die meisten Kopplungsungleichgewichte konnten dabei für die SNPs *STAT6* In16SNP1 und *STAT6* 3'UTRSNP5 beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.2.3.2). Diese Beobachtungen, sowie Ergebnisse aus weiteren Haplotypentests, bei denen nach Rekombinationsereignissen zwischen den einzelnen SNPs gesucht wurde, legen die Vermutung nahe, dass in der Mitte des Gens (Exon 16 bis 18) bzw. innerhalb der 3'UTR (im Bereich von *STAT6* 3'UTRSNP5) eine oder mehrere Rekombinationen stattgefunden haben könnten (K. Rohde, persönliche Mitteilung).

Abweichungen vom LD können jedoch auch durch eine unzureichende Teststärke (Power) bedingt sein, die vor allem dann zustande kommt, wenn es sich bei den zu testenden SNPs um solche handelt, bei denen ein Allel in einer sehr niedrigen Frequenz vorkommt (Bickeböller, persönliche Mitteilung). So weisen die selteneren Allele derjenigen SNPs, für die sich in der Asthma-Familienstudie die meisten LD-Abweichungen ergaben, tatsächlich Frequenzen von $\leq 10\%$ auf (vgl. Tabelle 3.7 und Abschnitt 3.2.3.2). Vor allem für die SNPs *STAT6* In16SNP1 und *STAT6* 3'UTRSNP5 lagen die Allelfrequenzen der selteneren Allele bei nur 1,92% bzw. 5.67% (vgl. Tabelle 3.7).

4.2.9 *STAT6*-Haplotypen in anderen Assoziationsstudien

STAT6-Haplotypen wurden mittlerweile in weiteren Studien auf Assoziation mit Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse lieferten dabei die beiden deutschen Fall-Kontroll-Studien, welche bereits im Rahmen der Diskussion um die SNPs in der 3'UTR von *STAT6* ausführlich beschrieben wurden (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; vgl. Abschnitt 4.2.3).

In beiden Studien wurden sowohl die Einzel-SNP-Analysen als auch die Haplotypenanalysen jedoch für nur sechs, der insgesamt 13, im Rahmen dieser Arbeit analysierten, *STAT6*-SNPs durchgeführt. Bei diesen sechs SNPs handelte es sich um die beiden in der Promotorregion von *STAT6* lokalisierten SNPs, *STAT6* 5'flanking SNP1 und 2, die beiden intronischen SNPs *STAT6* In2SNP3 und *STAT6* In18SNP1 sowie den, in der 3'UTR gelegenen SNPs, *STAT6* 3'UTRSNP3 und 4 (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; vgl. Abschnitt 4.2.3). Mit dieser SNP-Gruppe wurden in der Kinderstudie von Schedel und Kollegen insgesamt sieben Haupt-Haplotypen mit Frequenzen von >3% ermittelt (Schedel et al., 2004), welche auch in der Erwachsenenstudie von Weidinger und Kollegen die sieben häufigsten Haplotypen darstellten (Weidinger et al., 2004). Dabei konnten für alle sieben Haplotypen in beiden Studien annähernd gleiche Frequenzen erzielt werden (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004). Interessanterweise sind alle sieben Haplotypen auch Bestandteil von einem oder mehreren der 12 häufigsten Haplotypen der Asthma-Familienstudie (vgl. Tabelle 3.9). In diesen Fällen stimmen die geschätzten Frequenzen der Haplotypen der Asthma-Familienstudie ebenfalls mit denjenigen der anderen Haplotypen überein (vgl. Tabelle 3.9). Da es sich bei allen drei Studien um Studien mit gleichem ethnischen Hintergrund handelt, scheinen die berechneten Haplotypen somit tatsächlich die häufigsten *STAT6*-Haplotypen in der deutschen Bevölkerung darzustellen. Auch bekräftigen diese Übereinstimmungen das Argument, dass die in der Asthma-Familienstudie, für einzelne Familien, beobachteten Unstimmigkeiten zwischen einzelnen Haplo- und Genotypen nicht auf Genotypisierungsfehler zurückzuführen sind (vgl. Abschnitt 4.2.8). Der, in der Studie von Weidinger und Kollegen ermittelte, achte Haplotyp mit einer Frequenz von nur 1,28% war dagegen in keinem der 12 häufigsten Haplotypen der Asthma-Familienstudie vertreten (Weidinger et al., 2004; vgl. Tabelle 3.9).

Betrachtet man die, in den einzelnen Studien für die *STAT6*-Haplotypen erzielten Assoziationsergebnisse, findet man weit weniger Übereinstimmungen. Während in der Asthma-Familienstudie für keinen der untersuchten Haplotypen eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gefunden wurde (vgl. Abschnitt 3.2.3.2 und 4.2.8), war in der Kinderstudie von Schedel und Kollegen das Vorhandensein des häufigsten Haplotypen

signifikant mit einem erhöhten Risiko für eine Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels assoziiert ($p=0,015$; $p=0,032$; $p=0,015$; Schedel et al., 2004). Zu gleichem Ergebnis kamen auch Weidinger und Kollegen, auch in ihrer Studie war eine signifikante Assoziation zwischen diesem Haplotyp und einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel zu beobachten ($p=0,015$; $p=0,032$; $p=0,007$; Weidinger et al., 2004). Die Autoren führen diese positiven Assoziationen in erster Linie auf das Vorhandensein des T-Risikoallels von *STAT6* In2SNP3 in dem Haplotyp zurück, welches in beiden Studien in den Einzel-SNP-Analysen eine signifikante Assoziation mit einem erhöhtem Gesamt-IgE-Spiegel zeigte (Schedel et al., 2004; Weidinger et al., 2004; vgl. Abschnitt 4.2.6 und 4.2.7). Dies könnte auch erklären, warum der häufigste Haplotyp der Asthma-Familienstudie, welcher den IgE-Risikohaplotyp der beiden anderen Studien beinhaltet, keine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gezeigt hat. Denn in der Asthma-Familienstudie stellte nicht das T- sondern das C-Allel das Risikoallel für einen erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel dar (vgl. Tabelle 3.8 und Abschnitt 4.2.6).

Daneben ist zu berücksichtigen, dass die Haplotypenberechnungen für die Asthma-Familienstudie unter Einbeziehung aller 13 validierten *STAT6*-SNPs durchgeführt wurden, in den beiden anderen deutschen Studien die Haplotypen jedoch anhand von nur sechs SNPs konstruiert wurden. Weitere Gründe für die negativen Assoziationsergebnisse in der Asthma-Familienstudie wurden bereits in Abschnitt 4.2.8 genannt.

Auch für das Merkmal Asthma wurden in den verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Während in der Schedel-Studie für keinen der untersuchten Haplotypen eine Assoziation mit Asthma nachgewiesen werden konnte (Schedel et al., 2004), stellte in der Weidinger-Studie der Haplotyp mit der Nummer 8 einen signifikanten genetischen Risikofaktor für die Entwicklung von Asthma dar ($p=0,005$; Weidinger et al., 2004). Zusammen mit der Tatsache, dass dieser Haplotyp nicht in den 12 häufigsten Haplotypen der Asthma-Familienstudie vertreten ist, führt dieses Ergebnis zu der Annahme, dass an der Entwicklung des kindlichen Asthmas (früh-einsetzendes Asthma) andere *STAT6*-Polymorphismen beteiligt sind als an der Entwicklung eines Asthmas im Erwachsenenalter (spät-einsetzendes Asthma). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der finnischen Familienstudie (Pykäläinen et al., 2005). Auch in dieser Studie konnte weder für einzelne *STAT6*-SNPs noch die resultierenden *STAT6*-Haplotypen eine Assoziation mit kindlichem Asthma beobachtet werden (Pykäläinen et al., 2005). Da in der eigenen Asthma-Familienstudie in den Einzelanalysen keiner der 13 validierten *STAT6*-SNPs eine Assoziation mit Asthma zeigte, wurde darauf verzichtet, dieses Merkmal in die Haplotypenanalysen einzubeziehen, weshalb diesbezüglich keine Ergebnisse vorliegen.

4.2.10 Ein GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens ist hoch polymorph

Im Rahmen der Analyse des humanen *STAT6*-Gens wurde zusätzlich zu den 13 SNPs auch ein, in Exon 1 (5'UTR) des humanen *STAT6*-Gens lokalisierter, Dinukleotidrepeat (GT-Repeat) untersucht.

Erstmals 2001 von Tamura und Kollegen beschrieben, erwies sich der GT-Repeat in einer japanischen Allergie-Studie mit insgesamt vier identifizierten Allelen, Allel 1 (13xGT) - Allel 4 (16xGT), als hoch polymorph (Tamura et al., 2001). Alle vier, in der japanischen Studie identifizierten, Allele konnten auch in der Asthma-Familienstudie bestätigt werden (vgl. Tabelle 3.10, Abbildung 3.5). Darüberhinaus wurde noch ein weiteres Allel mit 17xGT (Allel 5) gefunden (vgl. Tabelle 3.10, Abbildung 3.5). Die Existenz eines zusätzlichen fünften Allels in der Asthma-Familienstudie, welches in der japanischen Studie nicht vorkommt, läßt auf Unterschiede bezüglich der Allelverteilung des GT-Repeats in den unterschiedlichen ethnischen Populationen schließen. Mittlerweile liegen Daten aus einer Reihe von Studien mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund vor, die genau diese Vermutung untermauern. Während sowohl in der japanischen als auch in der chinesischen Bevölkerung nur die von Tamura und Kollegen beschriebenen vier Allele des GT-Repeats (13xGT - 16xGT) auftreten (Tamura et al., 2001; Tamura et al., 2003; Shao et al., 2004; Moller et al., 2007; Yabiku et al., 2007), weisen Kaukasier und Inder ein weitaus breiteres Allel-Spektrum auf. Demnach konnte in der britischen Bevölkerung (Kaukasier) neben den Allelen 1-4 sowohl das, in der Asthma-Familienstudie identifizierte, Allel 5 (17xGT) als auch ein weiteres Allel 6 mit 18xGT identifiziert werden (Gao et al., 2004a; Moller et al., 2007). Letzteres war bei weißen Amerikanern nicht vorhanden, dafür aber ein Allel, welches nur 12x das GT-Dinukleotid enthielt (Gao et al., 2004a). Die meisten Allele waren jedoch in einer nord-indischen Population zu finden. Hier traten neben den Allelen 1-6, noch Allele mit 19xGT, 20xGT, 22xGT und 24xGT auf, wenn auch nur in sehr niedriger Frequenz (Nagarkatti et al., 2004). Erstaunlicherweise waren in den meisten Studien, inklusive der Asthma-Familienstudie, Allel 1 (13xGT) und Allel 3 (15xGT) die häufigsten Allele (Tamura et al., 2001; Tamura et al., 2003; Gao et al., 2004a; Shao et al., 2004; Moller et al., 2007; Yabiku et al., 2007; Tabelle 3.10). Lediglich in der nord-indischen Population lagen Allel 3 und Allel 5 bei der Frequenz vorne (Nagarkatti et al., 2004).

Doch nicht nur bezüglich der Einzelallel-Frequenzen waren Allel 1 und Allel 3 am häufigsten anzutreffen, auch was die Frequenz der Genotypen betrifft, waren sowohl in der Asthma-Familienstudie als auch in den beiden japanischen Studien die Genotypen Allel 1/Allel 3 und Allel 3/Allel 3 die häufigsten (Tamura et al., 2001; Tamura et al., 2003; Shao et al., 2004).

Die hier für den GT-Repeat im humanen *STAT6*-Gen beschriebenen, unterschiedlichen Allelverteilungen in verschiedenen ethnischen Populationen sind keine Seltenheit und wurden bereits für Repeatpolymorphismen in einer Reihe anderer Gene nachgewiesen (z.B. Mateu et al., 1999; Kharrat et al., 2007; Liu et al., 2007), darunter auch die beiden Repeats im *NOS1*-Gen, die in diversen Studien eine Assoziation mit Asthma oder Asthma-assoziierten Phänotypen aufwiesen (Grasemann et al., 1999b, Leung et al., 2005; vgl. Abschnitt 4.1.1).

4.2.11 Die Assoziationsergebnisse des *STAT6*-Dinukleotidrepeats im Vergleich zu anderen Studien

Von allen in dieser Arbeit analysierten Polymorphismen zeigte der GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens den stärksten Effekt. Mit einem p-Wert von $p=0,001$ konnte in der Asthma-Familienstudie eine signifikante Assoziation zwischen Allel 4 (16xGT) des Repeats und einer erhöhten Eosinophilenzellzahl nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3.11).

In den letzten Jahren war der GT-Repeat Studienobjekt einer ganzen Reihe von Assoziationsstudien mit zum Teil recht gegensätzlichen Ergebnissen. Während in der hier untersuchten Asthma-Familienstudie keine Assoziation zwischen dem GT-Repeat und dem asthmatischen Phänotyp gefunden wurde (vgl. Tabelle 3.10), war die Allelfrequenz von Allel 1 (13xGT) in einer britischen Fall-Kontroll-Studie in der Gruppe der atopischen Asthmatiker im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,027$; Gao et al., 2004a). Für Allel 4 (16xGT) hingegen war der umgekehrte Effekt zu beobachten ($p=0,018$; Gao et al., 2004a). Auch in einer nord-indischen Fall-Kontroll-Studie war Allel 4 in der Kontrollgruppe signifikant häufiger zu finden als in der Gruppe der Asthmatiker ($p<10^{-5}$; Nagarkatti et al., 2004). Diese Ergebnisse weisen auf einen protektiven Effekt von Allel 4 auf die Entwicklung eines *Asthma bronchiale* hin. Die in der Asthma-Familienstudie gefundene signifikante Assoziation dieses Allels mit einer erhöhten Eosinophilenzellzahl, einem Merkmal des sowohl allergischen als auch nicht-allergischen Asthmas (vgl. Abschnitt 1.3.1), in Verbindung mit der Annahme von Eosinophilen als eine der Haupt-Effektorzellen der allergischen Reaktion (vgl. Abschnitt 1.4.3), sprechen allerdings eher gegen einen protektiven Effekt von Allel 4.

Uneinigkeit herrscht auch darüber, welches Allel des GT-Repeats letztendlich mit einem erhöhten Risiko an Asthma zu erkranken assoziiert ist. So konnte in der nordindischen Studie eine signifikante Assoziation ($p<10^{-4}$) zwischen Asthma und Allel 3 (15xGT) des Repeats und nicht, wie in der britischen Studie von Gao und Kollegen mit Allel 1 (13xGT), nachgewiesen werden (Nagarkatti et al., 2004). Dem gegenüber stehen die von Shao und Kollegen in einer

japanischen Fall-Kontroll-Studie erzielten Ergebnisse. Zwar konnte in dieser Studie der signifikante Unterschied in der Gesamtellevverteilung zwischen Asthmatikern und der Kontrollgruppe primär auf die unterschiedliche Frequenz von Allel 3 zurückgeführt werden. Allerdings war die Frequenz dieses Allels in der Patientengruppe signifikant *niedriger* als in der Kontrollgruppe ($p=0,0044$; Shao et al., 2004) und nicht umgekehrt, wie es für die nord-indische Studie zutraf. Darüberhinaus hatten für das Allel 3 homozygote Probanden ein signifikant niedrigeres Risiko an Asthma zu erkranken als Probanden mit anderen Genotypen ($p=0,0035$; Shao et al., 2004). Demzufolge scheint in der japanischen Bevölkerung Allel 3 des GT-Repeats das für die Entwicklung eines *Asthma bronchiale* protektive Allel darzustellen und nicht Allel 4, wie sowohl für die britische als auch die nord-indische Studie angenommen. Auch in einer zweiten japanischen Fall-Kontroll-Studie trat der Genotyp Allel 3/Allel 3 in der Kontrollgruppe häufiger auf als in der Patiengruppe, jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,046$; Tamura et al., 2001). Der Genotyp Allel 1/Allel 3 dagegen war signifikant mit Allergie assoziiert ($p=0,0002$ und $p=0,006$; Tamura et al., 2001; Tamura et al., 2003). Allerdings bestand in dieser Studie die Fallgruppe nicht nur aus Asthmatikern mit allergischem Asthma, sondern umfaßte auch Patienten mit atopischer Dermatitis und lebensmittelinduzierter Anaphylaxie (Tamura et al., 2001; Tamura et al., 2003; vgl. Abschnitt 4.2.2). In der nord-indischen Population hingegen war der Genotyp Allel 3/Allel 5 in Asthmatikern überrepräsentiert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p<0,0001$; Nagarkatti et al., 2004).

Auch bezüglich der Assoziation des GT-Repeats mit dem Gesamt-IgE-Spiegel im Serum ist aus den Ergebnissen der einzelnen Studien kein einheitlicher Trend zu beobachten. Während weder in der Asthma-Familienstudie, noch in der nord-indischen Studie, noch der japanischen Allergie-Studie Assoziation des GT-Repeats mit dem Gesamt-IgE-Spiegel gefunden werden konnte (Tamura et al., 2001; Nagarkatti et al., 2004; vgl. Tabelle 3.11), wiesen in der britischen Studie Probanden mit Allel 1 (13xGT) einen signifikant höheren Gesamt-IgE-Spiegel auf als Probanden mit Allel 4 (16xGT) ($p=0,004$; Gao et al., 2004a).

Für das quantitative Merkmal erhöhte Eosinophilenzellzahl liegen aus anderen Studien keine Daten vor, so dass hier kein direkter Vergleich mit den, in der Asthma-Familienstudie erzielten, Assoziationsergebnissen gezogen werden kann.

Vergleicht man die, in den einzelnen Studien gewonnenen, Ergebnisse so scheint es, dass in den verschiedenen ethnischen Populationen unterschiedliche Allele des GT-Repeats in Exon 1 von *STAT6* einen unterschiedlichen Einfluß auf Asthma und die Asthma-assoziierten Phänotypen zu haben scheinen, was jedoch eher unwahrscheinlich ist. Vielmehr können die unterschiedlichen Ergebnisse, wie bereits in Kapitel 4.2.3 für die SNPs in der 3'UTR von

STAT6 ausführlich diskutiert, auf die unterschiedlichen Studiendesigns (Familienstudie versus Fall-Kontroll-Studie) und den damit verbundenen unterschiedlichen statistischen Tests (RC-TDT/QTDT versus Tests für Fall-Kontroll-Studien) zurückzuführen sein. Daneben spielen die Art und Größe der, in die Tests eingeflossenen, Stichproben eine Rolle (vgl. Abschnitt 4.1.1 und 4.2.3). So handelte es sich sowohl bei der nord-indischen als auch der britischen Studie um erwachsene Probanden (Nagarkatti et al., 2004; Shao et al., 2004), bei der japanischen Allergiestudie dagegen waren die Probanden Kinder (Tamura et al., 2001; Tamura et al., 2004). Die zweite japanische Fall-Kontroll-Studie wiederum setzte sich aus Kindern und Erwachsenen zusammen (Shao et al., 2004).

Trotz dieser unterschiedlichen Ergebnisse zeichnet sich eines deutlich ab: der GT-Repeat in der 5'UTR des humanen *STAT6*-Gens scheint von funktioneller Bedeutung für die Pathogenese von Asthma und Asthma-assoziierten Phänotypen zu sein.

4.2.12 Der GT-Repeat in Exon 1 beeinflusst die Promotoraktivität von *STAT6*

Seit langem ist bekannt, dass Dinukleotidrepeats von funktioneller Relevanz sein können, vor allem wenn sie in regulatorischen Bereichen wie der 5'- bzw. 3'UTR oder der Promotorregion von Genen lokalisiert sind. Der Einfluss ist mannigfaltig und reicht über die Beteiligung an der Organisation des Chromatins sowie der DNA-Replikation, über die Beeinflussung von Spleißvorgängen (Gabellini, 2001) bis hin zur Bereitstellung von spezifischen Rekombinationsstellen (Majewski und Ott, 2000; Übersichten in Travers und Klug, 1990; Li et al., 2002). Von besonderer Bedeutung ist jedoch der regulatorische Einfluss solcher Repeats auf die Transkriptionsrate von Genen durch Veränderung der Promotoraktivität, wie bereits für eine Reihe von Genen beobachtet werden konnte (z. B. Rothenburg et al., 2001a; Borrmann et al., 2003; Funke-Kaiser et al., 2003; Wang et al., 2005; Chen et al., 2007). Abhängig von der Repeatlänge wird die Promotoraktivität dabei entweder verstärkt oder vermindert. Der gängigen Hypothese zufolge ist ein solcher Effekt in erster Linie auf die Eigenschaft von Dinukleotidrepeats zur Bildung einer linkshändigen Z-DNA-Konformation zurückzuführen (Travers und Klug, 1990; Rich, 1993; Rothenburg et al., 2001a und b; Wong et al., 2007).

Der hier untersuchte GT-Repeat in Exon 1 des humanen *STAT6*-Gens ist in der 5'UTR, in unmittelbarer Nachbarschaft zur upstream gelegenen Promotorregion von *STAT6*, lokalisiert (Patel et al., 1998; Tamura et al., 2001; vgl. Abbildung 3.6). Demnach wäre auch für diesen Repeat ein Einfluss auf die Promotoraktivität von *STAT6* zu erwarten. Diese Vermutung wurde von Gao und Kollegen vor einigen Jahren bestätigt (Gao et al., 2004a). So konnten die

Autoren unter Verwendung von Reporter-gen-Assays in drei verschiedenen humanen Zelllinien (Mastzelllinie HMC-1, Jurkat T-Zelllinie und bronchiale Epithelzelllinie BEAS-2b) für Allel 1 (13xGT) eine, im Vergleich zu anderen Allelen [12xGT, Allel 4 (16xGT) und Allel 5 (17xGT)], signifikant höhere Transkriptionsaktivität nachweisen (Gao et al., 2004a). Dagegen zeigte das Allel mit 12xGT eine durchwegs niedrigere Aktivität (Gao et al., 2004a). Darüberhinaus variierten die relativen Transkriptionsaktivitäten für alle vier untersuchten Allele in den verschiedenen Zelllinien, weshalb die Autoren eine Zelltyp-spezifische Regulation der Promotoraktivität von *STAT6* durch den GT-Repeat annehmen (Gao et al., 2004a).

Gel-shift-Assays zeigten zudem für alle vier untersuchten Allele die Bildung von DNA-Protein-Komplexen mit einem jeweils ähnlichen Bindungsmuster der nukleären Proteine an die verschiedenen Repeat-Allele (Gao et al., 2004a). Allerdings scheint die Stabilität dieser Komplexe für verschiedene Allele unterschiedlich stark zu sein. So wiesen in reziproken, kompetitiven Assays die beiden längeren Allele des Repeats, Allel 4 (16xGT) und Allel 5 (17xGT) eine stabilere Bindung an nukleäre Proteine auf als die beiden kurzen Allele mit 12x bzw. 13xGT (Gao et al., 2004a).

Neben der Beeinflussung der Promotoraktivität scheint der GT-Repeat auch bei der Aktivierung des *STAT6*-Proteins eine Rolle zu spielen, wie die Ergebnisse von Yabiku und Kollegen vermuten lassen. Sie konnten zeigen, dass kultivierte, für das Allel 1 (13xGT) homozygote, humane B-Lymphozyten nach einer Stimulierung mit IL-4 bzw. IL-13 bei gleicher Gesamtmenge an *STAT6*-Protein eine bis zu 2fach größere Menge an phosphoryliertem, und damit aktiviertem, *STAT6* aufwiesen als Zellen mit anderen Genotypen ($p < 0,05$; Yabiku et al., 2007).

Eine gesteigerte Aktivierung von *STAT6* bedeutet, dass mehr aktive *STAT6*-Proteine für eine Bindung an den *IgE*-Promotor zur Verfügung stehen, was wiederum eine gesteigerte Transkription von *IgE* zur Folge hätte (vgl. Abschnitt 1.4.1 und 4.2.5). Weiterhin ist anzunehmen, dass ein stabiler DNA-Protein-Komplex die Aktivität des *STAT6*-Promotors erhöht bzw. verlängert. Dies würde ebenfalls in einer erhöhten Anzahl von *STAT6*-Proteinen resultieren. Aufgrund dieser Überlegungen wäre auch in der Asthma-Familienstudie eine Assoziation der entsprechenden Allele (Allel 1, 4 und 5) mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel zu erwarten gewesen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Die signifikante Assoziation von Allel 4 mit einer erhöhten Eosinophilenzellzahl in dieser Studie dagegen, geht schon eher mit einer verstärkenden Wirkung dieses Allels auf den *STAT6*-Promotor konform. Da für die Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen jedoch in erster Linie IL-5 das verantwortliche Zytokin ist, wäre ein Einfluss von Allel 4 auf

die Entwicklung einer Eosinophilie jedoch von eher indirekter Natur. So ist, wie bereits erwähnt, STAT6 ein wichtiger Baustein im IL-4-Signaltransduktionsweg, einem Zytokin, welches die Differenzierung von Th2-Lymphozyten, fördert (vgl. Abschnitt 1.4.4 und 1.5.4.2). Aufgrund dessen würde nun eine gesteigerte STAT6-Produktion zu einer vermehrten Bildung von Th2-Lymphozyten führen, welche ihrerseits IL-5 ausschütten. Eine vermehrte IL-5-Ausschüttung aufgrund einer gesteigerten Th2-Lymphozytenbildung wiederum würde zu einer verstärkten Differenzierung und Rekrutierung von Eosinophilen führen die letztendlich in der, für Asthma typischen, Eosinophilie gipfelt. Um diese Hypothese in eine Wahrheit zu verwandeln bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Das Hauptziel sollte dabei die Validierung der gefundenen Assoziation in einer Replikationsstudie sowie in weiteren Studien mit einem anderen Studiendesign und/oder einem anderen ethnischen Hintergrund sein.

4.3 Analyse des humanen *NAB2*-Gens

4.3.1 *NAB2* als unmittelbarer Nachbar von *STAT6* - ein Interpretationsversuch der *NAB2*-Assoziationsergebnisse

Die Entscheidung, im Rahmen dieser Arbeit auch das humane *NAB2*-Gen in die Analysen miteinzubeziehen, erfolgte in erster Linie aufgrund der besonderen Lage des *NAB2*-Gens. So befindet sich der *NAB2*-Gen-Locus in unmittelbarer Nachbarschaft zum *STAT6*-Gen-Locus (Svaren et al., 1997; Patel et al., 1998). Die Besonderheit besteht dabei darin, dass die 3'UTRs der beiden Gene einen 58 bp großen Überlappungsbereich aufweisen, so dass die beiden Transkripte konvergieren und die Stop-Codons nur 1.852 bp voneinander entfernt sind (Svaren et al., 1997). Dieser Überlappungsbereich wiederum befindet sich innerhalb einer 78 bp umfassenden Sequenz, die streng konserviert ist zwischen Mensch und Maus (Svaren et al., 1997). Interessanterweise beherbergt diese Sequenz neben Polyadenylierungssignalen auch ein Sequenzmotiv, welches einen schnellen Abbau von mRNAs, einschließlich derjenigen von Zytokinen und „immediate-early“-Genen, vermittelt (Lagnado et al., 1994; Zubiaga et al., 1995; Svaren et al., 1997). Eine Beeinflussung der Genexpression durch Motive in der 3'UTR ist, wie bereits in Abschnitt 4.2.5 diskutiert, seit längerem bekannt.

Die geschilderten Besonderheiten führen zu der Annahme einer gemeinsamen, koordinierten Regulation der Expression von *NAB2* und *STAT6* (Svaren et al., 1997). Aufgrund dieser Vermutung könnten nun Polymorphismen in der 3'UTR von *NAB2* einen Einfluß auf die Expression von *NAB2* als auch auf diejenige von *STAT6* haben und umgekehrt.

In letzter Zeit konnte gezeigt werden, dass *NAB2* als Ko-Aktivator bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine Rolle spielt, indem es die NGFI-A-vermittelte IL-2-Produktion fördert

(Collins et al., 2006 und 2008; vgl. Abschnitt 1.5.4.3). Eine Verstärkung oder Verminderung der *NAB2*-Genexpression bedingt durch Polymorphismen in der 3'UTR könnte demnach zu einer verstärkten oder verminderten Ausschüttung von IL-2 führen. Da IL-2 die Differenzierung und Effektorfunktion von Th2-Lymphozyten sowie den Klassenwechsel zu IgE hemmt, die Differenzierung von Th1-Lymphozyten dagegen fördert, würde die Entwicklung eines allergischen Asthmas entweder begünstigt oder erschwert werden (vgl. Abschnitt 1.4). Gleiches gilt für eine veränderte *STAT6*-Genexpression, nur in umgekehrter Weise. Als wichtiges Glied im IL-4-Pathway ist STAT6 an der Differenzierung zu Th2-Lymphozyten und dem Klassenwechsel zu IgE beteiligt (vgl. Abschnitt 1.4). Unter diesen Gesichtspunkten erscheint eine gemeinsame, koordinierte Regulation der Expression von *NAB2* und *STAT6* als äußerst sinnvoll.

Allerdings waren alle, im Rahmen dieser Arbeit analysierten, *NAB2*-Polymorphismen in Introns bzw. Exons lokalisiert (vgl. Tabelle 3.12 und Abb. 3.7). Dies hängt damit zusammen, dass die SNP-Daten aus der öffentlichen SNP-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) entnommen wurden und zum damaligen Zeitpunkt noch keine Informationen über SNPs in der 3'UTR des *NAB2*-Gens vorlagen. Ein SNP in Intron 6 von *NAB2*, *NAB2* In6SNP1, zeigte dabei in der Asthma-Familienstudie für beide Stichproben eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel ($p=0,0390$ bzw. $p=0,0300$; vgl. Tabelle 3.16). Da der ermittelte p-Wert für die größere Stichprobe ($p=0,0300$), und der damit verbundenen größeren statistischen Teststärke, gegenüber der kleineren Stichprobe ($p=0,0390$) leicht erniedrigt war, kann dieses Ergebnis als echte Assoziation und nicht als falsch positiv gewertet werden.

NAB2 In6SNP1 ist jedoch mitten im Intron, weit entfernt von jeglichen Spleißstellen, lokalisiert, womit er als kausaler SNP für eine Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels ausscheidet. Vielmehr könnte die, für diesen SNP gefundene, Assoziation ein Hinweis auf das Vorhandensein weiterer, in der Nähe des SNPs lokalisierter, Polymorphismen sein, welche die eigentlichen funktionellen Polymorphismen darstellen. Aufgrund der Überlappung der 3'UTRs von *NAB2* und *STAT6*, kämen als kausale Polymorphismen demnach die in der 3'UTR von *STAT6* identifizierten SNPs in Frage (vgl. Abschnitt 4.2.5). Ein Vergleich der für das *NAB2*-Gen gewonnenen Ergebnisse mit denjenigen von *STAT6* und die Ergebnisse aus weiteren Assoziationsstudien (vgl. Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3) untermauern diese Vermutung.

Von allen untersuchten *NAB2*-SNPs ist *NAB2* In6SNP1 derjenige, der die geringste Entfernung zu demjenigen SNP in der 3'UTR von *STAT6* aufweist, für den in der Asthma-Familienstudie ebenfalls eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gefunden wurde: *STAT6* 3'UTRSNP4 (vgl. Tabelle 3.8 und Abschnitt 4.2.3). So liegen die beiden SNPs nur ca. 2.000 bp voneinander entfernt. Mit einem p-Wert von $p=0,0280$ (vgl. Tabelle 3.8)

wies das seltenere Allel von *STAT6* 3'UTRSNP4 eine ähnlich „starke“ Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel auf wie das seltenere Allel von *NAB2* In6SNP1 (s.o.). Auch bezüglich der elterlichen Allelfrequenzen konnte für die beiden SNPs ein ähnliches Verteilungsmuster beobachtet werden. Demnach lag die Allelfrequenz des selteneren Allels von *NAB2* In6SNP1 für beide Stichproben bei 39,32% bzw. 39,90% (vgl. Tabelle 3.14a und b), die des selteneren Allels von *STAT6* 3'UTRSNP4 bei 35% (vgl. Tabelle 3.7). Betrachtet man die für die anderen *NAB2*-SNPs erzielten Assoziationsergebnisse, dann zeigt sich, dass die p-Werte mit zunehmender Entfernung der SNPs von der 3'UTR ansteigen (vgl. Tabelle 3.16). Bereits für den SNP in Intron 3, *NAB2* In3SNP1 konnte in der Asthma-Familienstudie keine Assoziation mehr mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel gefunden werden ($p=0,0480$ bzw. $p=0,0590$, vgl. Tabelle 3.16). Dies lässt wiederum vermuten, dass *NAB2* In6SNP1 in einem Kopplungsungleichgewicht („linkage disequilibrium“, LD) mit den SNPs in der 3'UTR von *STAT6* stehen könnte und somit den Endpunkt eines LD-Blocks darstellen würde. Allerdings wurden dazu im Rahmen dieser Arbeit keine Berechnungen gemacht. Auch existieren für das humane *NAB2*-Gen bisher keine weiteren Assoziationsstudien, deren Ergebnisse als Vergleich herangezogen werden könnten. Daneben wäre die Untersuchung weiterer, vor allem in der 3'UTR des *NAB2*-Gens lokalisierter, Polymorphismen in Verbindung mit funktionellen Assays sinnvoll.

4.4 Analyse des humanen *IGF1*-Gens

4.4.1 Ein SNP in Intron 5 des humanen *IGF1*-Gens ist mit Asthma assoziiert

Seit langem wird vermutet, dass der insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1, IGF1, eine Rolle in der Pathogenese von Asthma spielt (vgl. Abschnitt 1.5.4.4). Umso verwunderlicher ist, dass in der öffentlichen Literaturdatenbank bisher keine Veröffentlichungen über genetische Studien zu finden sind, die Assoziation und/oder Kopplung zwischen Polymorphismen im *IGF1*-Gen und Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen untersucht haben. Lediglich für diverse Arten von Krebs und Wachstum bzw. Entwicklung diverser Organismen liegen unzählige Daten vor. Unter diesem Aspekt stellt die hier dargestellte Arbeit eine Pionierleistung dar, die umso mehr an Bedeutung gewinnt, betrachtet man die erzielten Ergebnisse.

Von ursprünglich 11 ausgewählten SNPs im humanen *IGF1*-Gen zeigte ein SNP im fünften Intron, *IGF1* In5SNP7, eine signifikante Assoziation mit Asthma ($p=0,0363$ bzw. $p=0,0046$, vgl. Tabelle 3.20). Da der p-Wert bei annähernd gleicher Allelverteilung (vgl. Tabelle 3.19a und b) für die größere Stichprobe signifikant niedriger war als für die kleinere Stichprobe

(vgl. Tabelle 3.20), kann von einer „echten“ Assoziation ausgegangen werden. Demnach ist *IGF1* In5SNP7 von allen, in dieser Arbeit untersuchten, Polymorphismen der einzige, für den in der Asthma-Familienstudie eine Assoziation mit dem Merkmal Asthma gefunden wurde.

Die positive Assoziation von *IGF1* In5SNP7 mit Asthma und die Tatsache, dass für keinen der untersuchten *IGF1*-SNPs eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel und/oder Eosinophilie nachgewiesen werden konnte (vgl. Tabelle 3.21), verstärken den seit langem gehegten Verdacht, dass IGF1 eher in Mechanismen involviert ist, die bei dem als „airway remodeling“ bekannten Prozeß oder der Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur eine Rolle spielen und weniger in der initialen Entstehung einer Entzündung, auch wenn Studienergebnisse existieren, die auf eine Rolle von IGF1 bei der Entwicklung von T-Lymphozyten hinweisen (vgl. Abschnitt 1.4.3 und 1.5.4.4). Gestützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse zahlreicher Studien (vgl. Abschnitt 1.5.4.4). So konnten z. B. Gosens und Kollegen an Präparationen der glatten Muskulatur aus humanen Bronchien durch Applikation von IGF1 eine sich langsam entwickelnde, anhaltende Kontraktion dieser Muskeln erzeugen, welche Rho-Kinase abhängig war (Gosens et al., 2004). Ein anderes Forscherteam wiederum induzierte in zuvor immunisierten Mäusen durch Inhalation von Ovalbumin eine IGF1-Expression im Bereich der Atemwege (Yamashita et al., 2005). Die sich als Folge dessen entwickelnde Verdickung der Atemwegswand (vgl. Abschnitt 1.4.3) konnte durch die Injektion eines neutralisierenden anti-IGF1-Antikörpers inhibiert werden (Yamashita et al., 2005).

4.4.2 *IGF1*-Polymorphismen und IGF1-Spiegel

Untersuchungen haben ergeben, dass die zirkulierenden IGF1-Spiegel individuell verschieden sind und unter anderem von Alter, Geschlecht, ethnischer Herkunft sowie Ernährungsstatus abhängen (Harrela et al., 1996; Jernström et al. 2001; DeLellis et al., 2003). Zu einem nicht unerheblichen Anteil sind diese Varianzen aber auch genetischen Faktoren zuzuschreiben, wie Zwillingsstudien gezeigt haben (Harrela et al., 1996). Eine Assoziation zwischen Polymorphismen im humanen *IGF1*-Gen und den gemessenen IGF1-Spiegeln wäre demnach zu erwarten.

Tatsächlich konnte vor kurzem in einer britischen, populationsbezogenen Studie eine signifikante Assoziation zwischen dem zirkulierenden IGF1-Spiegel und einem SNP im humanen *IGF1*-Gen gefunden werden (Al-Zahrani et al., 2006). Es handelt sich dabei um den gleichen SNP, der in der Asthma-Familienstudie eine signifikante Assoziation mit Asthma gezeigt hat, *IGF1* In5SNP7 (vgl. Abschnitt 4.4.1). In der britischen Studie war das seltenere

C-Allel mit einem erhöhten IGF1-Spiegel assoziiert, allerdings nur in der weiblichen Kohorte, nicht der männlichen (p-trend=0,003; Al-Zahrani et al., 2006). So wiesen für das C-Allel heterozygote Probandinnen einen um durchschnittlich 11% erhöhten IGF1-Spiegel auf, bei homozygoten Probandinnen dagegen lag der IGF1-Spiegel um durchschnittlich 17% höher (Al-Zahrani et al., 2006). Darüberhinaus war das C-Allel in einer britischen Fall-Kontroll-Studie mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert (p-trend=0,03; Al-Zahrani et al., 2006).

Da *IGF1* In5SNP7 jedoch mitten in Intron 5 von *IGF1* lokalisiert ist, ist es eher unwahrscheinlich, dass er von funktioneller Bedeutung ist und somit einen regulatorischen Einfluß auf die Transkription bzw. Translation des *IGF1*-Gens hat. Allerdings handelt es sich bei *IGF1* In5SNP7, was die kaukasische Population betrifft, um einen sog. „tag“-SNP (Al-Zahrani et al., 2006). Tag-SNPs sind repräsentative SNPs, die in einer genomischen Region mit hohem Kopplungsungleichgewicht („linkage disequilibrium“, LD), einem sog. LD-Block, liegen und mit einer Vielzahl von benachbarten SNPs im Kopplungsungleichgewicht stehen (vgl. Abschnitt 1.5.2.2.2). Demnach besteht eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, dass *IGF1* In5SNP7 mit einem anderen, in der Nähe gelegenen, Polymorphismus im Kopplungsungleichgewicht steht, welcher den eigentlichen kausalen Polymorphismus für eine Beeinflussung des IGF1-Spiegels darstellt. Als solcher bietet sich ein, in der 3'UTR (Exon 6) des Gens identifizierter SNP an, für den ein Patient mit einem extrem niedrigen IGF1-Spiegel homozygot war (Bonapace et al., 2003). Bei diesem SNP handelt es sich um eine, mitten in der Konsensussequenz des Polyadenylierungssignals lokalisierte, T>A-Transition, die laut Autoren zu einer fehlerhaften Reifung der *IGF1*-mRNA führt und deshalb für den extrem niedrigen IGF1-Spiegel verantwortlich sein könnte (Bonapace et al., 2003). Eine Beeinflussung des IGF1-Spiegels wird aber auch einem, in der Promotorregion des *IGF1*-Gens lokalisierten, CA-Repeat-Polymorphismus zugeschrieben, wie Kinoshita und Kollegen in einer japanischen Studie mit Kleinkindern herausfanden (Kinoshita et al., 2007).

Zwar machen diese Ergebnisse und die, in der Asthma-Familienstudie gefundene, Assoziation von *IGF1* In5SNP7 mit Asthma eine Beteiligung von IGF1 an der Pathogenese von Asthma wahrscheinlich, für einen endgültigen Beweis reicht es jedoch noch lange nicht. Weitere Assoziationsstudien mit weiteren *IGF1*-Polymorphismen in ethnisch unterschiedlichen Populationen in Verbindung mit verschiedenen funktionellen Assays sind notwendig, um *IGF1* zu einem „echten“ Asthmagen zu machen.

4.5 Analyse des humanen *LTA4H*-Gens

4.5.1 Die kodierende Region des humanen *LTA4H*-Gens ist hoch konserviert

Trotz der bedeutenden Rolle von Leukotrienen in der Entwicklung inflammatorischer Erkrankungen konnten in den öffentlichen Literaturdatenbanken bis jetzt nur zwei Publikationen ausfindig gemacht werden, die eine Assoziation von *LTA4H*-Polymorphismen mit Asthma und/oder Asthma-assoziierten Phänotypen zum Thema haben.

Eine davon ist die, bereits im Zusammenhang mit *STAT6* erwähnte, Studie von Heinzmann und Kollegen (Heinzmann et al., 2000; vgl. Abschnitt 4.2.1). Die Autoren untersuchten die DNA von 41 genetisch unabhängigen, adulten Deutschen auf das Vorhandensein von Polymorphismen in der kodierenden Region des *LTA4H*-Gens. Interessanterweise konnten sie, wie auch für die kodierende Region von *STAT6* beschrieben, keine Polymorphismen finden (Heinzmann et al., 2000). Sie schließen daher auf einen hoch konservierten Charakter der kodierenden Region von *LTA4H* (Heinzmann et al., 2000). Eine Analyse der aktuellen SNP-Datenbankeinträge unterstützt diese Vermutung, zumindest was die kaukasische Bevölkerung anbelangt. So findet man in der aktuellen Version der SNP-Datenbank des NCBI-Servers (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) für die kodierende Region des humanen *LTA4H*-Gens Daten zu insgesamt nur sechs SNPs, von denen fünf allerdings zu keinem Aminosäureaustausch führen. Drei dieser SNPs erwiesen sich in der kaukasischen Bevölkerung als nicht polymorph, für die anderen drei SNPs fehlen Angaben über die Frequenzen in den einzelnen Populationen. Bei einem dieser drei SNPs ohne Frequenzangaben handelt es sich um *LTA4H* Ex19SNP1 (rs1803916; vgl. Tabelle 3.22), der im Rahmen der *LTA4H*-Analyse zunächst in einem genomischen DNA-Pool auf Vorhandensein untersucht wurde (vgl. Tabelle 3.22 und Abschnitt 3.5.1). Die DNAs dieses Pools stammten dabei von Probanden, die den gleichen ethnischen Hintergrund haben wie die Probanden der Heinzmann-Studie (vgl. Abschnitt 2.1.2 und 4.2.1). Unter der Prämisse einer hohen Konserviertheit der kodierenden Region des *LTA4H*-Gens in der kaukasischen Bevölkerung wäre nun zu erwarten gewesen, dass *LTA4H* Ex19SNP1 sich auch in dem genomischen DNA-Pool als nicht polymorph (monomorph) erweist. Leider konnte mit dem Assay für diesen SNP kein Ergebnis erzielt werden (vgl. Tab. 3.22), so dass auf eine weitere Analyse dieses SNPs in der Asthma-Familienstudie verzichtet wurde. Für eine Festigung der Hypothese einer hohen Konserviertheit der kodierenden Region des *LTA4H*-Gens bedarf es deshalb weiterer, populationsübergreifender, Analysen.

4.5.2 Ein SNP in Intron 3 von *LTA4H* ist mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel assoziiert

Von insgesamt drei, in der Asthma-Familienstudie analysierten, *LTA4H*-SNPs, zeigte ein SNP in Intron 3, *LTA4H* In3SNP2, für das häufigere G-Allel eine Assoziation mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel. Da die p-Werte dabei für beide Stichproben (108 Familien und 172 Familien) fast identisch sind ($p=0,0220$ und $p=0,0210$; vgl. Tabelle 3.26), ist es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein falsch positives Ergebnis handelt. Es kann daher von einer „echten“, wenn auch schwachen, Assoziation ausgegangen werden. Dagegen stellt die, ebenfalls für diesen SNP, in der kleineren Stichprobe beobachtete, schwache, Assoziation mit einem verminderten Peak-Flow ($p=0,0300$; vgl. Tabelle 3.26) tatsächlich ein falsch positives Ergebnis dar. Sie konnte in der größeren Stichprobe nämlich nicht bestätigt werden ($p>0,100$; vgl. Tabelle 3.26).

Die erzielten Ergebnisse sind zwar ein erster Hinweis auf einen möglichen Einfluß von *LTA4H*-Polymorphismen auf den Gesamt-IgE-Spiegel, für eine gesicherte Aussage reichen sie jedoch nicht aus. Dazu wurden zu wenige, vor allem funktionell relevante, Polymorphismen untersucht. Dies hängt damit zusammenhängt, dass zum Zeitpunkt der Analysen für nur wenige *LTA4H*-SNPs Daten in der öffentlichen SNP-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) zur Verfügung standen. Darüberhinaus lieferten die Assays für drei der sieben initial ausgewählten *LTA4H*-SNPs keine Ergebnisse, so dass diese von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden (vgl. Tabelle 3.22). Der in der 3'UTR des Gens lokalisierte SNP *LTA4H* Ex19SNP2, dagegen, erwies sich in der Teststudie als nicht polymorph und scheidete damit ebenfalls aus (vgl. Tabelle 3.22).

Ein weiteres Manko ist das Fehlen von Daten aus anderen Studien, die als Vergleich für die in der Asthma-Familienstudie erzielten Ergebnisse herangezogen werden können. So beschränkte, wie bereits ausführlich beschrieben, eine Forschergruppe ihre Analysen lediglich auf die Suche nach Polymorphismen in der kodierenden Region von *LTA4H* (vgl. Abschnitt 4.5.1; Heinzmann et al., 2000).

Vielversprechender sind da schon die Ergebnisse, die Lima und Kollegen erzielten. Die Forscher untersuchten, in wieweit Polymorphismen in Genen des Leukotrien-Pathways das Risiko für eine Verschlechterung von Asthma-Symptomen beeinflussen (Lima et al., 2006). Für die Assoziationsanalysen diente eine Studie bestehend aus 61 weißen (kaukasischen), adulten Asthma-Patienten, die seit sechs Monaten ein Medikament erhielten, welches die Wirkung von Leukotrienen unterdrückt (Lima et al., 2006; vgl. Abschnitt 1.5.4.5). Dabei konnte für einen SNP mit der Datenbanknummer rs2660845 eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für eine Verschlechterung der Asthma-Symptome gefunden werden (Lima et

al., 2006). Allerdings ist dieser SNP nicht im *LTA4H*-Gen selbst lokalisiert, sondern liegt ca. 12 kb upstream der 5'UTR, wie Datenbankanalysen ergaben (<http://genome.ucsc.edu>). Er befand sich jedoch in einem moderaten Kopplungsungleichgewicht mit einem SNP, welcher ca. 7 kb downstream der 3'UTR von *LTA4H* lokalisiert ist (Lima et al., 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass, zumindest was die kaukasische Bevölkerung betrifft, das humane *LTA4H*-Gen innerhalb eines LD-Blocks lokalisiert ist.

Untermauert wird diese Vermutung durch die Befunde von Helgadottir und Kollegen, die *LTA4H*-Varianten im Zusammenhang mit dem Risiko, einen Herzinfarkt zu erleiden, untersuchten. So war in einer isländischen Kohorte das Herzinfarkttrisiko mit dem Vorkommen eines bestimmten Haplotypen assoziiert, der sich aus den Allele von fünf SNPs zusammensetzte ($p=0,034$; Helgadottir et al., 2006). Interessanterweise handelt es sich bei einem dieser fünf SNPs um den SNP mit der Nummer rs2660845. Er war im Haplotyp genau mit demjenigen Allel vertreten, welches in der Lima-Studie eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für eine Verschlechterung von Asthma-Symptomen gezeigt hat (Helgadottir et al., 2006; Lima et al., 2006). Auch ein Allel eines, in der Asthma-Familienstudie untersuchten, SNPs findet sich in besagtem Haplotypen wieder. Dies ist zwar nicht, wie erhofft, das G-Allel von *LTA4H* In3SNP2, dafür aber das häufigere Allel von *LTA4H* In11SNP1, der in den öffentlichen SNP-Datenbanken unter der Nummer rs1978331 zu finden ist (Helgadottir et al., 2006; vgl. Tabelle 3.22). Da es sich bei beiden Studien um Probanden mit gleichem ethnischen Hintergrund handelt, europäische Kaukasier, erhöhen diese Befunde die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines LD-Blocks in der kaukasischen Bevölkerung. Für eine endgültige Klärung dieser Frage bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Da *LTA4H* In3SNP2 mitten in Intron 3 des *LTA4H*-Gens lokalisiert ist, ist es unwahrscheinlich, dass er den kausalen SNP für eine Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegels darstellt. Unter der Annahme des Vorhandenseins eines, das *LTA4H*-Gen, umspannenden LD-Blocks jedoch, besteht die Möglichkeit, dass er mit dem eigentlichen kausalen Polymorphismus in einem Kopplungsungleichgewicht steht. Ein kausaler Polymorphismus ist vor allem in den Bereichen des Gens zu suchen, die Motive enthalten, welche einen regulatorischen Einfluß auf die Genexpression oder den Spleißmechanismus haben. Hier bietet sich unter anderem die ca. 4 kb upstream des Transkriptionsstartpunkts lokalisierte Promotorregion des Gens an (Haeggström, 2000). Da es sich bei der *LTA4H* um ein Enzym handelt, sind weiterhin Polymorphismen von großer Bedeutung, die entweder zu einer veränderten Enzymaktivität führen oder die Stabilität des Enzyms bzw. dessen Wechselwirkung mit seinem Substrat beeinflussen. Dieses wären in erster Linie

Polymorphismen, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Unter der Prämisse einer hoch konservierten kodierenden Region, wie sie Heinzmann und Kollegen postulieren (vgl. Abschnitt 4.5.1), wäre die Beeinflussung des Gesamt-IgE-Spiegels jedoch am ehesten durch eine veränderte *LTA4H*-Genexpression zu erklären.

4.5.3 *LTA4H*-Polymorphismen beeinflussen den Gesamt-IgE-Spiegel - ein möglicher Mechanismus

Gesetzt den Fall, es existieren funktionelle Polymorphismen in den relevanten regulatorischen Bereichen des *LTA4H*-Gens oder dessen kodierender Region, die in verschiedenen Studien eine Assoziation mit dem Gesamt-IgE-Spiegel gezeigt hätten. Wie könnte es dann zu einer Beeinflussung desselbigen kommen?

Ein möglicher Mechanismus ergibt sich aus der Erkenntnis, dass neben Th2-Lymphozyten ($CD4^+$ -T-Lymphozyten), denen eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung des allergischen Asthma zukommt (vgl. Abschnitt 1.4), auch $CD8^+$ -T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten) eine Rolle in inflammatorischen Prozessen sowie der Entwicklung einer bronchialen Hyperreaktivität spielen (z.B. Hamelmann et al., 1996; Miyahara et al., 2004; Zusammenfassung in Kay, 1997). Normalerweise besteht die Aufgabe dieser, im Zytosol lokalisierten, $CD8^+$ -T-Lymphozyten darin, mit Viren infizierte Zellen gezielt zu töten (Janeway und Travers, 1997; Kapitel 1). Studien mit Allergensensibilisierten Mäusen sowie mit, aus Blut isolierten, $CD8^+$ -T-Lymphozyten von atopischen Asthmatikern konnten jedoch nachweisen, dass $CD8^+$ -T-Lymphozyten in einem allergischen Milieu so umgepolt werden können, dass sie ein Th2-spezifisches Zytokinspektrum, d.h. IL-4, IL-13 und sogar IL-5, sezernieren (Schaller et al., 2005; Stanciu et al., 2005; Koya et al., 2007). Die Ausschüttung von Th2-spezifischen Zytokinen durch $CD8^+$ -T-Lymphozyten scheint dabei wesentlich von dem Vorhandensein von IL-4 während der Sensibilisierungsphase bzw. Stimulation abzuhängen (Schaller et al., 2005; Stanciu et al., 2005; Koya et al., 2007).

In den letzten Jahren konnten eine Reihe von *in vitro*-Studien zeigen, dass die chemoattraktive Rekrutierung eines bestimmten Subtyps von $CD8^+$ -T-Lymphozyten, den sog. T-Effektorzellen (T_{EFF}), zum Entzündungsherd LTB₄-abhängig ist und dass diese T-Effektorzellen den für LTB₄ hoch-affinen BTL1-Rezeptor exprimieren (Goodarzi et al., 2003; Ott et al., 2003; Miyahara et al., 2005; Taube et al., 2006). Wie bereits erwähnt entsteht LTB₄ durch die *LTA4H*-vermittelte stereospezifische Hydrierung von LTA₄ und wird u.a. von

aktivierten Mastzellen während der IgE-vermittelten frühen Phase der allergischen Reaktion sezerniert (vgl. Abschnitt 1.4.2 und 1.5.4.5).

Kommt es nun aufgrund von Polymorphismen in den regulatorischen Bereichen des *LTA4H*-Gens zu einer Überexpression von LTA4H, stehen für die LTB₄-Synthese mehr LTA4H-Proteine als unter normalen Bedingungen zur Verfügung. Eine daraus resultierende vermehrte Bildung von LTB₄ wiederum würde den LTB₄-Spiegel immens erhöhen und somit zu einer verstärkten Rekrutierung von CD8⁺-T-Effektorzellen führen, die, in einem IL-4 geprägten Milieu, Th2-spezifische Zytokine sezernieren. Dies wiederum hätte eine immense Erhöhung des IL-4- und IL-13-Spiegels zur Folge, zumal diese Zytokine auch von aktivierten Th2-Lymphozyten sezerniert werden. Da sowohl IL-4 als auch IL-13 in B-Lymphozyten das *class-switching* zu IgE induzieren (vgl. Abschnitt 1.4.1), würde ein erhöhter Spiegel dieser Zytokine zu einer vermehrten Bildung von IgE führen, was wiederum eine Assoziation von *LTA4H*-Polymorphismen mit einem erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel erklären würde.

Daneben fördert IL-4 aber auch die Reifung von Th2-Lymphozyten (vgl. Abschnitt 1.4.1 und 1.4.4), weshalb eine erhöhte LTB₄-Synthese indirekt auch zu einer Erhöhung der Anzahl von Th2-Lymphozyten beitragen würde. Aber auch auf die LTB₄-Synthese selbst scheinen IL-4 und IL-13 einen Einfluß zu haben. So konnten Zaitzu und Kollegen in Versuchen mit kultivierten humanen polymorphkernigen Leukozyten nachweisen, dass eine Inkubation mit IL-4 bzw. IL-13 die Aktivität der LTA4H signifikant erhöhte und damit die LTB₄-Synthese ankurbelte (Zaitzu et al., 2000). In Verbindung mit der vermehrten Aktivierung und Rekrutierung von Eosinophilen aufgrund der a) durch aktivierte CD8⁺-T-Lymphozyten bedingten, vermehrten Ausschüttung von IL-5 und b) der chemoattraktiven Wirkung von LTB₄ auf Eosinophile (vgl. Abschnitt 1.4.3 und 1.5.4.5), käme es so zu einem Aufschaukelungsprozeß, einem *circulus vitiosus*, der, ohne therapeutisches Eingreifen, zwangsläufig zu einer Verschlechterung der Asthma-Symptome führen würde.

Eine Erhöhung des LTB₄-Spiegels kann jedoch auch durch eine verstärkte LTA4H-Enzymaktivität, aufgrund von Polymorphismen in der kodierenden Region des Gens, verursacht werden. Dabei kann es jedoch nur dann zu einer vermehrten LTB₄-Produktion kommen, wenn auch genügend LTA4-Substrat zur Verfügung steht. Gleiches gilt natürlich auch für die vermehrte Bildung von LTB₄ aufgrund einer erhöhten Menge an funktionellem LTA4H-Protein. Der oben beschriebene Mechanismus der Beeinflussung des Gesamt-IgE-Spiegels setzt demnach das Vorhandensein einer unbegrenzten bzw. ausreichend hohen Menge an LTA4-Substrat voraus.

4.6 Abschlussbetrachtung

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, Ergebnisse vieler anderer Studien sowie die Identifizierung von bis dato mehr als 100 prädisponierenden Asthma-Kandidatengenen lassen vermuten, dass einzelne Polymorphismen nur einen kleinen Effekt auf die Entwicklung von Asthma bzw. Asthma-assoziierten Phänotypen haben, was die Hypothese einer Beteiligung von vielen Genen an der Asthma-Pathogenese (vgl. Abschnitt 1.5.1) untermauert. Additiv betrachtet erhöhen diese vielen kleinen Effekte das Risiko für Asthma oder eine Erhöhung des Gesamt-IgE-Spiegel jedoch beträchtlich, wie Kabesch und Kollegen am Beispiel von Polymorphismen in vier Hauptgenen des IL-4/IL-13-Pathways zeigen konnten (Kabesch et al., 2006).

Zum Nachweis kleiner Effekte sind jedoch große Studien mit einer ausreichend großen statistischen Teststärke (Power) nötig, um das Risiko von falsch positiven bzw. negativen Ergebnissen zu minimieren. Aufgrund der wesentlich schwierigeren Rekrutierung geeigneter Studienteilnehmer ist eine solche Teststärke mit Familienstudien oftmals nicht zu erreichen. Aus diesem Grund ist man in den letzten Jahren immer mehr dazu übergegangen, für die Analyse komplexer Erkrankungen - auch für initiale genomweite Suchen - große Fall-Kontroll-Studien heranzuziehen (vgl. Abschnitt 1.5.2.2.2). Die Auswahl der Probanden muß bei diesem Studiendesign allerdings sehr sorgfältig geschehen, um die Gefahr von Populationsstratifikationen, welche die Ergebnisse verfälschen können, so gering wie möglich zu halten (vgl. Abschnitt 1.5.2.2.2).

Oberstes Ziel für zukünftige Forschungen sollte demnach die Bestätigung der, in der Asthma-Familienstudie erzielten, Assoziationen in großen Studien mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund sein, wie es für die *STAT6*-Polymorphismen zum Teil bereits geschehen ist (vgl. Abschnitt 4.2). Die rasante Weiter- und Neuentwicklung von „High-Throughput“-Genotypisierungstechniken in den letzten Jahren bietet mittlerweile die Möglichkeit, viele Polymorphismen parallel in einem Assay, schnell und effizient, auch in sehr großen Studien zu genotypisieren.

Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Forschungen sollte außerdem in der verstärkten *in vitro*- (z.B. Zellkulturmodelle) und, wenn möglich, *in vivo*-Analyse (z.B. Mausmodelle) funktionell relevanter, mit Asthma-assoziiierter Polymorphismen liegen.

Für die Entwicklung einer neuen, effizienteren und individuell angepaßten Asthma-Medikation ist darüberhinaus das Verständnis, wie letztendlich das Zusammenspiel zwischen prädisponierenden Genen und Umweltfaktoren zu so einem komplexen und heterogenen Phänotyp wie Asthma führt, von essentieller Bedeutung.

5. Literaturverzeichnis

- Abecasis G.R.**, Cardon L.R. and Cookson W.O. (2000a). A general test of association for quantitative traits in nuclear families. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 279-292.
- Abecasis G.R.**, Cookson W.O. and Cardon L.R. (2000b). Pedigree tests of transmission disequilibrium. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**: 545-551.
- Akimoto T.**, Numata F., Tamura M., Takata Y., Higashida N. et al. (1998). Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducer and activators of transcription (*STAT*)6-deficient mice. *J. Exp. Med.* **187**(9): 1537-1542
- Ali M.**, Khoo S.K., Turner S., Stick S., Le Souef P. et al. (2003). NOS1 polymorphism is associated with atopy but not exhaled nitric oxide levels in healthy children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **14**(4): 261-265
- Allen J.T.**, Bloor C.A., Kedia R.K., Knight R.A. and Spiteri M.A. (2000). Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in human lungs. *Neuropeptides* **34**(2): 98-107
- Allen M.**, Heinzmann A., Noguchi E., Abecasis G., Broxholme J. et al. (2003). Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat. Genet.* **35**(3): 258-263
- Altmüller J.**, Palmer L.J., Fischer G., Scherb H. and Wjst M. (2001). Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 936-950
- Alving K.**, Weitzberg E. and Lundberg J.M. (1993). Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur. Respir. J.* **6**: 1368-1370
- Al-Zahrani A.**, Sandhu M.S., Luben R.N., Thompson D., Baynes C. et al. (2006). IGF1 and IGFBP3 tagging polymorphisms are associated with circulating levels of IGF1, IGFBP3 and risk of breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* **15**(1): 1-10
- Anderson G.G** and Cookson W.O.C.M. (1999). Recent advances in the genetics of allergy and asthma. *Molecular Medicine Today* **5**: 264-273.
- Asano K.**, Chee C.B., Gaston B., Lilly C.M., Gerard C. et al. (1994). Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10089-10093
- Asher M.I.**, Keil U., Anderson H.R., Beasley R., Crane J. et al. (1995). International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur. Respir. J.* **8**: 483-491.
- Barbee R.A.**, Halonen M., Lebowitz M. and Burrows B. (1981). Distribution of IgE in a community population sample: correlations with age, sex and allergen skin test reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **68**: 106-111
- Barnes K.C.**, Neely J.D., Duffy D.L., Freidhoff L.R., Breazeale D.R. et al. (1996). Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* **37**: 41-50

- Barnes K.C.** and Marsh D.G. (1998). The Genetics and Complexity of Allergy and Asthma. *Immunology Today* **19**: 325-331
- Barnes K.C.** (1999). Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. *Clin. Exp. Allergy* **29 (Suppl. 4)**: 47-51
- Barnes K.C.** (2000). Atopy and asthma genes – where do we stand? *Allergy* **55**: 803-817
- Barnes P.J.** (1996). NO or no NO in asthma? *Thorax* **51(2)**: 218-220
- Betelli E.**, Dastrange M. and Oukka M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102(14)**: 5138-5143
- Bigby T.D.**, Lee D.M., Meslier N. and Gruenert D.C. (1989). Leukotriene A₄ hydrolase activity of human airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 1-7
- Bigby T.D.**, Lee D.M., Minami M., Ohishi N., Shimizu T. et al. (1994). Characterization of human airway epithelial cell leukotriene A₄ hydrolase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **11**: 615-624
- Bjorksten B.**, Dumitrascu D., Foucard T., Khetsuriani N., Khaitov R. et al. (1998). Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe. *Eur. Respir. J.* **12**: 432-437
- Boenisch, G.**, Fischer H., Fleischer W. and Wenske H. (2003). Pneumologische Notizen – Die Lungenfunktionsprüfung in der Praxis. 7. Auflage. Medizinisch-wissenschaftliches Periodikum der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, KG. Verlag Gedon & Reuss. S. 8-14. ISSN 1430-6840
- Bonapace G.**, Concolino D., Formicola S. and Strisciuglio P. (2003). A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J. Med. Genet.* **40**: 913-917
- Borrmann L.**, Seebeck B., Rogalla P. and Bullerdiek J. (2003). Human HMGA2 promoter is coregulated by a polymorphic dinucleotide (TC-)-repeat. *Oncogene* **22(5)**: 756-760
- Bousquet J.P.**, Chanez P., Lacoste J.Y., White R., Vic P. et al. (1992). Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* **47(1)**: 3-11
- Bousquet J.**, Jeffery P.K., Busse W.W., Johnson M. and Vignola A.M. (2000). Asthma. From Bronchoconstriction to Airways Inflammation and Remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**: 1720-1745
- Bradding P.**, Roberts J.A., Britten K.M., Montefort S., Djukanovic R. et al. (1994). Interleukin-4, -5 and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**: 471-480
- Brewster C.E.P.**, Howarth P.H., Djukanovic R., Wilson J., Holgate S.T. et al. (1990). Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**: 507-511

- Brock T.G.**, Maysanski E., McNish R.W. and Peters-Golden M. (2001). Co-localization of leukotriene A₄ hydrolase with 5-lipoxygenase in nuclei of alveolar macrophages and rat basophilic leukemia cells but not neutrophils. *J. Biol. Chem.* **276**(37): 35071-35077
- Brock T.G.**, Young-Jik L., Maysanski E., Marburger T.L., Luo M. et al. (2005). Nuclear localization of leukotriene A₄ hydrolase in type II alveolar epithelial cells in normal and fibrotic lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol.* **289**: L224-L232
- Buetow K.H.**, Edmonson M., MacDonald R., Clifford R., Yip P. et al. (2001). High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 581-584
- Burke W.**, Fesinmeyer M., Reed K., Hampson L. and Carlsten C. (2003). Family history as a predictor of asthma risk. *Am. J. Prev. Med.* **24**(2): 160-169
- Burney P.G.**, Luczynska C., Chinn S. and Jarvis D. (1994). The European Community Respiratory Health Survey. *Eur. Respir. J.* **7**(5): 954-960
- Burr M.L.** (1993). Epidemiology of Asthma. Epidemiology of Clinical Allergy. *Monogr. Allergy* **31**: 80-102
- Burrows B.**, Halonen M., Barbee R.A. and Lebowitz M.D. (1981). The relationship of serum IgE to cigarette smoking. *Am. Rev. Respir. Dis.* **124**: 523-525
- Cambrey A.D.**, Kwon O.J., Gray A.J., Harrison N.K., Yacoub M. et al. (1995). Insulin-like growth factor I is a major fibroblast mitogen produced by primary cultures of human airway epithelial cells. *Clin. Science (Lond.)* **89**: 611-617
- Carleton M.**, Haks M.C., Smeele S.A.A., Jones A., Belkowski S.M. et al. (2002). Early growth response transcription factors are required for development of CD4⁺CD8⁻ thymocytes to the CD4⁺CD8⁻ stage. *J. Immunol.* **168**(4): 1649-1658
- Chen T.M.**, Kuo P.L., Hsu C.H., Tsai S.J., Chen M.J. et al. (2007). Microsatellite in the 3' untranslated region of human fibroblast growth factor 9 (FGF9) gene exhibits pleiotropic effect on modulating FGF9 protein expression. *Hum. Mutat.* **28**(1): 98
- Choudhry S.**, Taub M., Mei R., Rodriguez-Santana J., Rodriguez-Cintron W. et al. (2008). Genome-wide screen for asthma in Puerto Ricans: evidence for association with 5q23 region. *Hum. Genet.* **123**(5): 455-468
- Christodouloupoulos P.**, Cameron L., Nakamura Y., Lemiere C., Muro S., et al. (2001). TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**(4): 586-591
- Clark R.** (1997). The somatogenic hormones and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. *Endocr. Rev.* **18**(2): 157-179
- Cohn L.**, Elias J.A. and Chupp G.L. (2004). Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 789-815

- Collins D.S.**, Dupuis R., Gleich G.J., Bartemes K.R., Koh Y.Y. et al. (1993). Immunoglobulin E-mediated increase in vascular permeability correlates with eosinophilic inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 677-683
- Collins S.**, Wolfrain L.A., Drake C.G., Horton M.R. and Powell J.D. (2006). Cutting edge: TCR-induced NAB2 enhances T cell function by coactivating IL-2 transcription. *J. Immunol.* **177**: 8301-8305
- Collins S.**, Lutz M.A., Zarek P.E., Anders R.A., Kersh G.J. et al. (2008). Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3. *Eur. J. Immunol.* **38**: 528-536.
- Constant S.L.** and Bottomly K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 297-322
- Cooke R.A.** and van der Veer A. (1916). Human sensitization. *J. Immunol.* **16**: 201-205
- Cookson W.O.**, Young R.P., Sandford A.J., Moffatt M.F., Shirakawa T. et al. (1992). Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* **340(8816)**: 381-384
- Cookson W.O.C.M.** and Moffatt M.F. (1997). Asthma – An Epidemic in the Absence of Infection. *Science* **275**: 41-42
- Cookson W.O.** (1999). The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* **402 (Suppl)**: B5-B11
- Cookson W.O.** (2002). Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunological Reviews* **190**: 195-206
- Cookson W.** (2004). The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Human Genetics* **4**: 978-988
- Corry D.B.** and Kheradmand F. (1999). Induction and regulation of the IgE response. *Nature* **402 (Suppl)**: B18-B23
- DeLellis K.**, Ingles S., Kolonel L., McKean-Cowdin R., Henderson B. et al. (2003). *IGF1* genotype, mean plasma level and breast cancer risk in the Hawaii/Los Angeles multiethnic cohort. *Br. J. Cancer* **88(2)**: 277-282
- De Mello Coelho V.**, Villa-Verde D.M.S., Farias-de-Oliveira D.A., de Brito J.M., Dardenn M. et al. (2002). Functional insulin-like growth factor-1/insulin-like growth factor-1 receptor-mediated circuit in human and murine thymic epithelial cells. *Neuroendocrinology* **75**: 139-150
- De Monchy J.G.**, Kauffman H.F., Venge P., Koeter G.H., Jansen H.M. et al. (1985). Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**: 373-376
- De Sanctis G.T.**, Mehta S., Kobzik L., Yandava Ch., Jiao A. et al. (1997). Contribution of type I NOS to expired gas NO and BHR in mice. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* **17**: L883-L888

- De Sanctis G.T.**, MacLean J.A., Hamada K., Mehta S., Scott J.A. et al. (1999). Contribution of nitric oxide synthases 1,2, and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. *J. Exp. Med.* **189**: 1621-1630
- Dewar J.C.** and Wheatley A.P. (1996). The Heritability of Allergic Disease. In Genetics of Asthma. I.P. Hall, ed. Basel: Karger: 4-34
- Dodge R.R.** and Burrows B. (1980). The prevalence and incidence of asthma and asthma-like symptoms in a general population sample. *Am. Rev. Respir. Dis.* **122**: 567-575
- Dold S.**, Wjst M., von Mutius E., Reitmeir P. and Stiepel E. (1992). Genetic risk for asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis. *Archives of Disease in Childhood* **67**: 1018-1022
- Drazen J.M.** (1999). Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **111**(6): 547-559
- Drinkwater H.** (1909). Mendelian heredity in asthma. *Br. Med. J.* **i**: 88
- Duetsch G.**, Illig T., Loesgen S., Rohde K., Klopp N. 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.**, Martin N.G., Battistutta D., Hopper J.L. and Mathews J.D. (1990). Genetics of asthma and hayfever in Australian twins. *American Review of Respiratory Disease* **142**: 1351-1358
- Elston R.** and Forthofer R. (1977). Testing for Hardy-Weinberg Equilibrium in Small Samples. *Biometrics* **33**: 536-543
- Excoffier L.** and Slatkin M. (1995). Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 921-927
- Filipiak B.**, Heinrich J., Nowak D. and Wichmann H.E. (2001). The distribution in specific IgE and the prevalence of allergic symptoms in 25-64-years old inhabitants of an eastern and a western German city - Results from Augsburg and Erfurt. *Eur J Epidemiol* **17**: 77-84
- Fireman P.** (2003). Symposium: Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* **24**(2): 79-83
- Förstermann U.**, Boissel J.-P. and Kleinert H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoform of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The FASEB Journal* **12**: 773-789
- Ford-Hutchinson A.W.**, Bray MA., Doig MV., Shipley M.E. and Smith M.J. (1980). Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **286**: 264-265
- Forster J.**, Schäfer T., Behrendt H. und Koller U. (1999). Allergische Erkrankungen. Wenn der Körper verrückt spielt. *Mensch und Umwelt* **15**: 5-7

- Funke-Kaiser H.**, Thomas A., Bremer J., Kovacevic S.D., Scheuch K., Bolbrinker J. et al. (2003). Regulation of the major isoform of human endothelin-converting enzyme-1 by a strong housekeeping promoter modulated by polymorphic microsatellites. *J. Hypertens.* **21(11)**: 2111-2124
- Gabellini N.** (2001). A polymorphic GT repeat from the human cardiac $Na^+Ca_2^+$ exchanger intron 2 activates splicing. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1076-1083
- Gao P.S.**, Mao X.Q., Roberts M.H., Arinobu Y., Akaiwa M. et al. (2000). Variants of *STAT6* (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J. Med. Genet.* **37**: 380-382
- Gao P.S.**, Heller N.M., Walker W., Chen C.H., Moller M. et al. (2004a). Variation in dinucleotide (GT) repeat sequence in the first exon of the *STAT6* gene is associated with atopic asthma and differentially regulates the promoter activity *in vitro*. *J. Med. Genet.* **41**: 535-539
- Gao P.S.** and Huang S.K. (2004). Genetic aspects of asthma. *Panminerva Med.* **46**: 121-134
- Gaston B.**, Drazen J.M., Loscalzo J. and Stamler J.S. (1994). The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149 (2Pt1)**: 538-551
- Gemsa D.**, Konden J.R. und Resch K. (1997). Immunologie. Grundlagen, Klinik, Praxis. Thieme Verlag. New York
- GINA (Global Initiative for Asthma) (2002).** GINA Workshop Report. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (updated 2004). NIH Publication No. 02-3659. www.ginasthma.org
- Goodarzi K.**, Goodarzi M., Tager A.M., Luster A.D. and von Adrian U.H. (2003). Leukotriene B₄ and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat. Immunol.* **4(10)**: 965-973
- Gosens R.**, Schaafsma D., Grootte Bromhaar M.M., Vrugt B., Zaagsma J. et al. (2004). Growth factor-induced contraction of human bronchial smooth muscle is Rho-kinase-dependent. *Eur. J. Pharmacol.* **494(1)**: 73-76
- Grasemann H.**, Yandava C.N. and Drazen J.M. (1999a). *Neuronal NO synthase (NOS1)* is a major candidate gene for asthma. *Clin. Exp. Allerg.* **29. Suppl. 4**: 39-41
- Grasemann H.**, Drazen J.M., Deykin A., Israel E., de Sanctis G.T. et al. (1999b). Simple tandem repeat polymorphisms in the *neuronal nitric oxide synthase* gene in different ethnic populations. *Hum. Hered.* **49**: 139-141
- Grasemann H.**, Yandava C.N., Storm van's Gravesande K., Deykin A., Pillari A. et al. (2000). A neuronal NO synthase (*NOS1*) gene polymorphism is associated with asthma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272(2)**: 391-394
- Griffin T.J.** and Smith L.M. (2000). Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol.* **18**: 77-84

- Guo C.B.**, Liu M.C., Galli S.J., Bochner B.S., Kagey-Sobotka A. et al. (1994). Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**: 384-390
- Gustafsson L.E.**, Leone A.M., Persson M.G., Wiklund N.P. and Moncada S. (1991). Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs, and humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 852-857
- Gut I.G.** (2001). Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* **17**: 475-492
- Haeggström J.Z.** (2000). Structure, function, and regulation of leukotriene A₄ hydrolase. *Am. J. Respir. Cr. Care Med.* **161**: S25-S31
- Haeggström J.Z.** (2004). Leukotriene A₄ hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B₄ biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**(49): 50639-50642
- Hakonarson H.** and Halapi E. (2002). Genetic analyses in asthma. Current concepts and future directions. *Am. J. Pharmacogenomics* **2**(3): 155-166
- Halapi E.** and Hakonarson H. (2003). Recent development in genomic and proteomic research for asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **10**: 22-30
- Hall A.V.**, Antoniou H., Wang Y., Cheung A.H., Arbus A.M. et al. (1994). Structural organization of the human *neuronal nitric oxide synthase* gene (*NOS1*). *J. Biol. Chem.* **269**: 33082-33090
- Hamelmann E.**, Oshiba A., Paluh J., Bradley K., Loader J. et al. (1996). Requirement for CD8⁺ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J. Exp. Med.* **183**: 1719-1729
- Hanson B.**, McGue M., Roitman-Johnson B., Segal N.L., Bouchard T.J. et al. (1991). Atopic disease and immunoglobulin E in twins reared apart and together. *Am. J. Hum. Genet.* **48**: 873-879
- Harrela M.**, Koistinen H., Kaprio J., Lehtovirta M., Tuomilehto J. et al. (1996). Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J. Clin. Invest.* **98**: 2612-2615
- Heinrich J.**, Nowak D., Wassmer G., Jörres G., Wjst M. et al. (1998). Age-dependent differences in the prevalence of allergic rhinitis and atopic sensitization between an eastern and a western German city. *Allergy* **53**: 89-93
- Heinrich J.**, Richter K., Frye C., Meyer I., Wölke G. et al. (2002). European Respiratory Health Survey in adults (ECRHS). *Pneumologie* **56**(5): 297-303
- Heinzmann A.**, Grotherr P., Jerkic S.P., Lichtenberg A., Braun S. et al. (2000). Studies on linkage and association of atopy with the chromosomal region 12q13-24. *Clin. Exp. Allergy* **30**: 1555-1561
- Heinzmann A.** and Deichmann K.A. (2001). Genes for atopy and asthma. *Curr. Opin. Allergy and Clin. Immunol.* **1**: 387-392

- Helgadottir A.**, Manolescu A., Helgason A., Thorleifsson G., Thorsteinsdottir U. et al. (2006). A variant of the gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. *Nat. Genet.* **38**(1): 68-74
- Hoffjan S.** and Ober C. (2002). Present status on the genetic studies of asthma. *Current Opinion in Immunology* **14**: 709-717
- Hoffmann A.** and Baltimore D. (2006). Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunol. Rev.* **210**(1): 171-186
- Holgate S.T.**, Roche W., Djukanovic R., Wilson J. Britten K. et al. (1991). The need for a pathological classification of asthma. *Eur. Respir. J. Suppl.* **13**: 113s-122s
- Holgate S.** (1993). Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax* **48**: 103-109
- Holgate S.T.** (1999). Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**(6): 1139-1146
- Hollá L. I.**, Schüller M., Bucková D. and Vácha J. (2004). Neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism and IgE-mediated allergy in the Central European population. *Allergy* **59**: 548-552.
- Holle R.**, Happich M., Löwel H. and Wichmann H.E., for the KORA Study Group (2005). KORA - A research platform for population based health research. *Gesundheitswesen* **67** S1: S19-S25.
- Holt P.G.**, Macauba C., Stumbles P.A. and Sly P.D. (1999). The role of allergy in the development of asthma. *Nature* **402** (Suppl.): B12-B17
- Hoshino M.**, Nakamura Y. and Sim J.J. (1998a). Expression of growth factors and remodelling of the airway wall in bronchial asthma. *Thorax* **53**: 21-27
- Hoshino M.**, Nakamura Y., Sim J.J., Yamashiro Y., Uchida K. et al. (1998b). Inhaled corticosteroid reduced lamina reticularis of the basement membrane by modulation of insulin-like growth factor (IGF)-I expression in bronchial asthma. *Clin. Exp. Allergy* **28**: 568-577
- Huang J.-L.**, Gao P.-S., Mathias R.A., Yao T.-Ch., Chen L.-Ch. et al. (2004). Sequence variants of the gene encoding chemoattractant receptor expressed on Th2 cells (*CRT2*) are associated with asthma and differentially influence mRNA stability. *Hum. Mol. Genet.* **12** (21): 2691-2697
- Hui J.**, Oka A., James A., Palmer L.J., Musk A.W. et al. (2008). A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. *Hum. Genet.* **123**(3): 297-306
- Humbert M.**, Grant J.A., Taborda-Barate L., Durham S.R., Pfister R. et al. (1996). High-affinity IgE-receptor (Fc ϵ RI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and non-atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**: 1931-1937
- Humbert M.** (2000). Does "intrinsic" asthma exist? *Rev. Mal. Respir.* **17** (1Pt 2): 245-254

- Illig T.** and Wjst M. (2002). Genetics of asthma and related phenotypes. *Paediatric Respiratory Reviews* **3**: 47-51
- Imada K.** and Leonard W.J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol. Immunol.* **37**: 1-11
- Immervoll T.,** Loesgen S., Dutsch G., Gohlke H. Herbon N. et al. (2001). Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Hum. Mutat.* **18**: 327-336
- International Human Genome Sequencing Consortium** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921
- Janeway C.A.** und Travers P. (1997). Kapitel 1: "Grundbegriffe der Immunologie"; "Erkennungs- und Effektormechanismen der adaptiven Immunität". Kapitel 6: "Der Thymus und die Entwicklung der T-Lymphozyten". Kapitel 11: "Allergie and Hypersensibilität". In "Immunologie". Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Jansen M.,** van Schaik F.M., Richer A.T., Bullock B., Woods D.E. et al. (1983). Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor 1 precursor. *Nature* **306**: 609-611
- Jarvis D.** and Burney P. (1998). ABC of allergies. The epidemiology of allergic disease. *BMJ* **316**: 607-610
- Jernström H.,** Chu W., Vesprini D., Tao Y., Majeed N. et al. (2001). Genetic factors related to racial variation in plasma levels of insulin-like growth factor-1: implications for premenopausal breast cancer risk. *Mol. Genet. Metab.* **72(2)**: 144-154
- Johansson S.G.,** Hourihane J.O., Bousquet J., Bruijnzeel-Koomen C., Dreborg S. et al. (2001). A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **56**: 813-824
- Johnson E.W.,** Jones L.A. and Kozak R.W. (1992). Expression and function of insulin-like growth factor receptors on anti-CD23-activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* **148(1)**: 63-71
- Jurinke C.,** van den Boom D., Collazo V., Luchow A., Jacob A. et al. (1997). Recovery of nucleic acids from immobilizes biotin-streptavidin complexes using ammonium hydroxide and applications in MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**: 904-910
- Jurinke C.,** van den Boom D., Cantor C.R. and Koster H. (2001). Automated genotyping using the DNA MassArray technology. *Methods Mol. Biol.* **170**: 103-116
- Kabesch M.,** Schedel M., Carr D., Woitsch B., Fritzsche C. et al. (2006). IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**: 269-274
- Karas M.** and Hillenkamp F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**: 2299-2301

- Kay A.B.** (1997). T cells as orchestrators of the asthmatic response. *Ciba Found Symp.* **206**: 56-67; discussion 67-70, 106-110
- Kelly-Welch A.E.**, Hanson E.M., Boothby M.R. and Keegan A.D. (2003). Interleukin-4 and Interleukin-13 Signaling Connections Maps. *Science* **300**: 1527-1528
- Kharitonov S.A.**, Yates D., Robbins R.A., Logan-Sinclair R., Shinebourne E.A. et al. (1994). Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* **343(8890)**: 133-135
- Kharitonov S.A.**, Yates D., Springall D.R., Buttery L., Polak L. et al. (1995). Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest* **107(Suppl. 3)**: S156-S157
- Kharrat N.**, Al'Fadhli S., Rebai M., Aifa M.S., Kallel I. et al., (2007). (AC) dinucleotide repeat polymorphism in intron 1 of human EGFR shows ethnic specificities and high evidence for association with breast cancer. *Int. J. Bio. Markers* **22(4)**: 258-264
- Kinoshita Y.**, Kizaki Z., Ishihara Y., Nakajima H., Adachi S. et al. (2007). The relationship in Japanese infants between a genetic polymorphism in the promoter region of the insulin-like growth factor I gene and the plasma level. *Neonatalogy* **92(2)**: 116-119
- Kirperkar F.**, Nordhoff E., Larsen L.K., Kristiansen K., Roepstorff P. et al. (1998). DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2554-2559
- Knapp, M.** (1999a). The transmission/disequilibrium test and parental-genotype reconstruction: the reconstruction-combined transmission/disequilibrium test. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 861-870
- Knapp M.** (1999b). Using exact P-values to compare the power between the reconstruction-combined transmission/disequilibrium test and the sib transmission/disequilibrium test. *Am. J. Hum. Genet.* **65**: 1208-1210
- Kooijman R.**, Scholtens L.E., Rijkers G.T. and Zegers B.J. (1995). Type I insulin-like growth factor receptor expression in different developmental stages of human thymocytes. *J. Endocrinol.* **147**: 203-209
- Koppelman G.H.**, Los H. and Postma D.S. (1999). Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. *Eur. Respir. J.* **13**: 2-4
- Koya T.**, Miyahara N., Takeda K., Matsubara S., Matsuda H. et al. (2007). CD8⁺T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation is dependent on CD4⁺IL-4⁺T cells. *J. Immunol.* **179(5)**: 2787-2796
- Krishnaraju K.**, Nguyen H.Q., Liebermann D.A. and Hoffman B. (1995). The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hemtopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* **15(10)**: 5499-5507
- Krishnaraju K.**, Hoffman B. and Liebermann D.A. (2001). *Early growth response gene 1* stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood* **97(5)**: 1298-1305

- Kuperman D.**, Schofield B., Wills-Karp M. and Grusby M.J. (1998). Signal transducer and activator of transcription factor 6 (*Stat6*)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperreactivity and mucus production. *J. Exp. Med.* **187**(6): 939-948
- Kwon H.K.**, So J.S., Lee C.G., Sahoo A., Yi H.J. et al. (2008). Foxp3 induces IL-4 gene silencing by affecting nuclear translocation of NFkappaB and chromatin structure. *Mol. Immunol.*; **Apr 4**, in press
- Lagnado C.A.**, Brown C.Y. and Goodall G.J. (1994). AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7984-7995
- Laitinen T.**, Kauppi P., Ignatius J., Ruotsalainen T., Daly M.J. et al. (1997). Genetic control of serum IgE levels and asthma: linkage and linkage disequilibrium studies in an isolated population. *Hum Mol. Genet.* **6**: 2069-2076
- Laitinen T.**, Polvi A., Rydman P., Vendelin J., Pukkinen V. et al. (2004). Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* **304**(5668): 300-304
- Laird N.M.** and Lange Christoph (2006). Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. *Nat. Rev. Genet.* **7**(5): 385-394
- Lam S.**, Chan H., LeRiche J.C., Chan-Yeung M. and Salari H. (1988). Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**(4): 711-717
- Landreth K.S.**, Narayanan R. and Dorshkind K. (1992). Insulin-like growth factor-I regulates pro-B-cell differentiation. *Blood* **80**: 1-6
- Lander E.** and Kruglyak L. (1995). Genetic dissection of complex traits. Guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat. Genet.* **11**: 241-247
- Leff A.R.** (1994). Inflammatory mediation of airway hyperresponsiveness by peripheral blood granulocytes. The case for the eosinophil. *Chest* **106**: 1202-1208
- Leigh D.** and Marley E. (1967). Bronchial Asthma. A Genetic, Population and Psychiatric Study. Pergamon Press. London
- Le Roith D.**, Bondy C., Yakar S., Liu J.L. and Butler A. (2001). The somatomedin hypothesis:2001. *Endoc. Rev.* **22**(1): 53-74
- Leung T.F.**, Liu E.K.H., Tang N.L.S., Ko F.W.S., Li C.Y. et al. (2005). Nitric oxide synthase polymorphisms and asthma phenotypes in Chinese children. *Clin. Exp. Allergy* **35**: 1288-1294
- Leushner J.** and Chiu N.H. (2000). Automated mass spectrometry: a revolutionary technology for clinical diagnostics. *Mol. Diagn.* **5**: 341-348
- Levine S.J.** (1995). Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J. Investig. Med.* **43**(3): 241-249

- Li Y.C.**, Korol A.B., Fahima T., Beiles A. and Nevo E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecology* **11**: 2353-2465
- Lima J.J.**, Zhang S., Grant A., Shao L., Tantisira K.G. et al. (2006). Influence of leukotriene pathway polymorphisms on response to montelukast in asthma. *Am. J. Respir. Care Med.* **173**: 379-385
- Linehan L.A.**, Warren W.D., Thompson P.A., Grusby M.J. and Berton M.T. (1998). STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J. Immunol.* **161**(1): 302-310
- Little D.P.**, Braun A., Darnhofer-Demar B. and Koste H. (1997a). Identification of apolipoprotein E polymorphisms using temperature cycled primer oligo base extension and mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35**: 545-548
- Little D.P.**, Braun A., Darnhofer-Demar B., Filling A., Li Y. et al. (1997b). Detection of RET proto-oncogene codon634 mutations using mass spectrometry. *J. Mol. Med.* **75**(10): 745-750
- Liu J.Y.**, Qu K., Sferruzza A.D. and Bender R.A. (2007). Distribution of the UGT1A1*28 polymorphism in Caucasian and Asian populations in the US: a genomic analysis of 138 healthy individuals. *Anticancer Drugs* **18**(6): 693-696
- Locksley R.M.** (1994). Th2 cells: help for helminths. *J. Exp. Med.* **179**: 1405-1407
- Lopez A.F.**, Sanderson C.J., Gamble J.R., Campbell H.D., Young I.G. et al. (1988). Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* **167**: 219-224
- Los H.**, Postmus P.E. and Boomsma D.I. (2000). Asthma Genetics and Intermediate Phenotypes. A Review From Twin Studies. *Twin Research* **4**: 81-93
- Lottspeich F.** and Zorbas H. (1998). Kapitel: "Massenspektrometrie". In "Bioanalytik". Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg, Berlin. S.325-368
- Maggi E.** (1998). The TH1-/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology* **3**: 233-244
- Majewski J. and Ott J.** (2000). GT repeats are associated with recombination on human chromosome 22. *Genome Res.* **10**(8): 1108-1114
- Malerba G.**, Lauciello M.C., Scherpbier T., Trabetti E., Galavotti R. et al. (2000). Linkage analysis of chromosome 12q markers in Italian families with atopic asthmatic children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**: 1587-1590
- Mancini J.A.** and Evans J.F. (1995). Cloning and characterization of the human leukotriene A4 hydrolase gene. *Eur. J. Biochem.* **231**: 65-71
- Marone G.** (1998). Asthma: recent advances. *Immunology Today* **19**: 5-9

- Martínez B.**, Barrios K., Vergara C., Mercado D., Jiménez S. et al. (2007). A *NOS1* gene polymorphism associated with asthma and specific immunoglobulin E response to mite allergens in a Colombian population. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **144**(2): 105-113.
- Massaro A.F.**, Mehta S., Lilly C.M., Kobzik L., Reilly J.J. et al. (1996). Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**(5): 1510-1514
- Mateu E.**, Calafell F., Bonne-Tamir B., Kidd J.R., Casals T. et al. (1999). Allele frequencies in a worldwide survey of a CA repeat in the first intron of the *CFTR* gene. *Hum. Hered.* **49**: 15-20
- Mathew S.**, Murty V.V., Hunziker W. and Chaganti R.S. (1992). Subregional mapping of 13 single-copy genes on the long arm of chromosome 12 by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* **14**: 775-779
- Mathew A.**, MacLean J.A., DeHaan E., Tager A.M., Green F.H.Y. et al. (2001). Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J. Exp. Med.* **193**(9): 1087-1096
- Mazumder B.**, Seshadri V. and Fox P.L. (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *TIBS* **28**(2): 91-98
- McKenzie A.N.J.** (2000). Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. *Pharmacology & Therapeutics* **88**: 143-151
- Messner B.**, Stütz A.M., Albrecht B., Peiritsch S. and Woisetschlager M. (1997). Cooperation of binding sites for STAT6 and NF κ B/*rel* in the IL-4-induced up-regulation of the human *IgE* germline promoter. *J. Immunol.* **159**: 3330-3337
- Mignone F.**, Gissi C., Liuni S. and Pesole G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* **3**(3): reviews0004.1-0004.10
- Miyahara N.**, Takeda K., Kodama T., Joetham A., Taube C. et al. (2004). Contribution of antigen-primed CD8⁺ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J. Immunol.* **172**: 2549-2558
- Miyahara N.**, Takeda K., Miyahara S., Matsubara S., Koya T. et al. (2005). Requirement for leukotriene B4 receptor 1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**(2): 161-167
- Miyata S.**, Matsuyama T., Kodama T., Nishioka Y., Kuribayashi K. et al. (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**: 114-123
- Miyazaki B.T.** and Lemonnier F.A. (1998). Modulation of thymic selection by expression of an immediate-early gene, *early growth response 1* (*Egr-1*). *J. Exp. Med.* **188**(4): 715-723
- Moffatt M.F.** and Cookson W.O.C.M. (1998a). Gene identification in asthma and allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**: 247-252

- Moffatt M.F.** and Cookson W.O. (1998b). The genetics of asthma. Maternal effects in atopic disease. *Clin. Exp. Allergy* **28** (Suppl. 1): 56-61 (discussion: 65-66)
- Moffatt M.F.** and Cookson W.O.C.M. (1999). Genetics of asthma and inflammation: the status. *Curr. Opin. Immunol.* **11**: 606-609
- Moffatt M.F.**, Kabesch M., Liang L., Dixon A.L., Strachan D. et al. (2007). Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* **448**(7152): 470-473
- Moller M.**, Gravenor M.B., Roberts S.E., Sun D., Gao P. et al. (2007). Genetic haplotypes of Th2-immune signalling link allergy to enhanced protection to parasitic worms. *Hum. Mol. Genet.* **16**(15): 1828-1836
- Mosmann T.R.** and Sad S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**: 138-146
- Mullings R.E.**, Wilson S.J., Puddicombe S.M., Lordan J.L., Bucchieri F. et al. (2001). Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6) expression and function in asthmatic bronchial epithelium. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**(5): 832-838
- Munafò D.A.**, Shindo K., Baker J.R. and Bigby T.D. (1994). Leukotriene A₄ hydrolase in human bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Invest.* **93**: 1042-1050
- Nagarkatti R.** and Ghosh B. (2002). Identification of single-nucleotide and repeat polymorphisms in two candidate genes, interleukin 4 receptor (*IL4RA*) and signal transducer and activator of transcription protein 6 (*STAT6*), for Th2-mediated diseases. *J. Hum. Genet.* **47**: 684-687
- Nagarkatti R.**, B-Rao Ch., Vijayan V., Sharma S.K. and Ghosh B. (2004). Signal transducer and activator of transcription 6 haplotypes and asthma in the indian population. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**: 317-321
- Nakanishi K.**, Yoshimoto T., Chu C.C., Matsumoto H., Hase K., et al. (1995). IL-2 inhibits IL-4 dependent IgE and IgG1 production *in vitro* and *in vivo*. *Int. Immunol.* **7**(2): 259-268
- National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute (1997).** Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. Expert Panel Report 2. NIH Publication No. 97-4051. Chapter: Pathogenesis and Definition: 7-15
- Ng T.P.**, Niti M. and Tan W.C. (2003). Trends and ethnic differences in asthma hospitalization rates in Singapore, 1991 to 1998. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **90**: 51-55
- Nickel R.**, Wahn U., Hizawa N., Maestri N., Duffy D.L. et al. (1997). Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study. *Genomics* **46**: 159-162
- Nieminen M.M.**, Kaprio J. and Koskenvuo M. (1991). A population-based study of bronchial asthma in adult twin pairs. *Chest* **100**: 70-75

- Noguchi E.** and Arinami T. (2001). Candidate Genes for Atopic Asthma. Current Results from Genome Screens. *Am. J. Pharmacogenomics* **1**: 251-261
- North A.J.,** Star R.A., Brannon T.S., Ujiie K., Wells L.B. et al. (1994). Nitric oxide synthase type I and type III gene expression are developmentally regulated in rat lung. *Am. J. Physiol.* **266**: L635-L641
- Nowak D.,** Heinrich J., Jorres R., Wassmer G., Berger J. et al. (1996). Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *Eur. Respir. J.* **9**: 2541-2552
- Ott V.L.,** Cambier J.C., Kappler J., Marrack Ph. and Swanson B.J. (2003). Mast cell-dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B4. *Nat. Immunol.* **4**(10): 974-981
- Palmer L.J.** and Cookson W.O.C.M. (2000). Genomic Approaches to Understanding Asthma. *Genome Research* **10**: 1280-1287
- Palmer L.J.** and Cookson W.O.C.M. (2001). Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma. *Respir. Res.* **2**: 102-112
- Patel B.K.,** Keck C.L., O'Leary R.S., Popescu N.C. and LaRochelle W.J. (1998). Localization of the human *STAT6* gene to chromosome 12q13.3-q14.1, a region implicated in multiple solid tumors. *Genomics* **52**: 192-200
- Pene J.,** Rousset F., Briere F., Chretien I., Bonnefoy J.Y. et al. (1988). IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons α , γ and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(18): 6880-6884
- Perez-Castillo A.,** Pipaón C., García I. and Alemany S. (1993). *NGFI-A* gene expression is necessary for T lymphocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* **268**(26): 19445-19450
- Petro, W.** (1998). Lungenfunktionsdiagnostik leichtgemacht. 2. Auflage. Novartis Pharma GmbH. S. 9-22. ISBN Nr.: 3-925667-31-8
- Puga I.,** Lainez B., Fernandez-Real J.M., Buxade M., Broch M. et al. (2005). A polymorphism in the 3' untranslated region of the gene for tumor necrosis factor receptor 2 modulates reporter gene expression. *Endocrinology* **146**(5): 2210-2220
- Punnonen J.,** Aversa G., Cocks B., McKenzie A., Menon S. et al. (1993). Interleukin-13 induces interleukin-4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3730-3734
- Pykäläinen M.,** Kinoshita R., Valkonen S., Rydman P., Kilpeläinen M. et al. (2005). Association analysis of common variants of *STAT6*, *GATA3*, and *STAT4* to asthma and high serum IgE phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**: 80.87
- Rabe K.F.,** Munoz N.M., Vita A.J., Morton B.E., Magnussen H. et al. (1994). Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. *Am. J. Physiol.* **267**: L326-334

- Rabinowitz D.** (1997). A transmission disequilibrium test for quantitative trait loci. *Hum. Hered.* **47**: 342-350
- Reinhardt D.** (2000). Kapitel: "Erkrankungen der Atemwegsorgane". In "Kinderheilkunde". Ed. Prof. Dr. med. Bertholf Koletzko. Springer-Verlag, Berlin. S. 417-463
- Rengarajan J., Szabo S.J. and Glimcher L.H.** (2000). Transcriptional regulation of Th1-/Th2 polarization. *Immunol. Today* **21**: 479-483
- Rich A.** (1993). DNA comes in many forms. *Gene* **135**: 99-109
- Ring J.** (1997). Allergy and modern society: does 'Western life style' promote the development of allergies? *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **113**: 7-10
- Robinson D.S., Hamid Q., Bentley A., Ying S., Kay A.B. et al.** (1993). Activation of CD4⁺ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **92**: 313-324
- Roche W.R., Beasley R., Williams J. and Holgate S.T.** (1989). Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* **i**: 520-524
- Rohde K. and Fuerst R.** (2001). Haplotyping and estimation of haplotype frequencies for closely linked biallelic multilocus genetic phenotypes including nuclear family information. *Hum. Mutat.* **17**: 289-295
- Roldán A., Charreau E.H., Schillaci R., Eugui E.M. and Allison A.C.** (1989). Insulin-like growth factor-1 increases the mitogenic response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. *Immunol. Lett.* **20**: 5-8
- Rom W.N., Bassert P., Fells G.A., Nukiwa T., Trepnell B.C. et al.** (1988). Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *J. Clin. Invest.* **82**: 1685-1693
- Romagnani S.** (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* **18**: 263-266
- Rothenburg S., Koch-Nolte F., Rich A. and Haag F.** (2001a): A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98(16)**: 8985-8990
- Rothenburg S., Koch-Nolte F. and Haag F.** (2001b). DNA methylation and Z-DNA formation as mediators of quantitative differences in the expression of alleles. *Immunol. Res.* **184**: 286-298
- Rotwein P., Pollock K.M., Didier D.K. and Krivi G.G.** (1986). Organization and sequence of the human *insulin-like growth factor I* gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J. Biol. Chem.* **261**: 4828-4832
- Sambrook J. and Russel D.** (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

- Samuelsson B.**, Dahlen S.E., Lindgren J.A., Rouzer C.A. and Serhan C.N. (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**(4819): 1171-1176
- Sandford A.**, Weir T. and Pare P. (1996). The Genetics of Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**: 1749-1765
- Sandford A.J.** and Paré P.D. (2000). The Genetics of Asthma. The Important Questions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**: S202-S206
- Sanger F.**, Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467
- Schaller M.A.**, Lundy S.K., Huffnagle G.B. and Lukacs N.W. (2005). CD8⁺T cell contributions to allergen induced pulmonary inflammation and airway hyperreactivity. *Eur. J. Immunol.* **35**(7): 2061-2070
- Schedel M.**, Carr D., Klopp N., Woitsch B., Illig T. et al. (2004). A signal transducer and activator of transcription 6 haplotype influences the regulation of serum IgE levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**: 1100-5
- Schwartz M.** (1952). Heredity in Bronchial Asthma. Munksgaard Press, Copenhagen
- Sengler C.**, Lau S., Wahn U. and Nickel R. (2002). Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments. *Respir. Res.* **3**: 7
- Seyfert V.L.**, Sukhatme V.P. and Monroe J.G. (1989). Differential expression of a zinc finger-encoding gene in response to positive versus negative signaling through receptor immunoglobulin in murine B lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **9**(5): 2083-2088
- Seyfert V.L.**, McMahon S.B., Glenn W.D., Yellen A.J., Sukhatme V.P. et al. (1990). Methylation of an immediate-early inducible gene as a mechanism for B cell tolerance induction. *Science* **250**: 797-800
- Shao Ch.**, Suzuki Y., Kamada F., Kanno K., Tamari M. et al. (2004). Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet.* **49**: 115-122
- Shimoda K.**, van Deursen J., Sangster M.Y., Sarawar S.R., Carson R.T. et al. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class-switching in mice with disrupted *STAT6* gene. *Nature* **38**. 630-633
- Shirakawa T.**, Enomoto T., Shimazu S. and Hopkin J.M. (1997). The inverse association between tuberculin responses and atopic disorders. *Science* **275**: 77-79
- Sibbald B.**, Horn M.E.C., Brian E.A. and Gregg I. (1980). Genetic factors in childhood asthma. *Thorax* **35**: 674
- Singer V.L.**, Jones L.J., Yue S.T. and Haugland R.P. (1997). Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal. Biochem.* **249**: 228-238

- Sly M.** (2000). Kapitel: "Asthma"; Kapitel: "Allergy and the Immunological Basis of Atopic Disease". In "Nelson Textbook of Pediatrics"; Ed. R.E. Behrman, R.M. Kliegman and H.B. Jenson. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto. S. 645-649 und S. 664-680
- Smith P.J.,** Spurrell E.L., Coakley J., Hinds C.J., Ross R.J.M. et al. (2002). An exonic splicing enhancer in human IGF-1 pre-mRNA mediates recognition of alternative exon 5 by the serine-arginine protein splicing factor-2/alternative splicing factor. *Endocrinology* **143**(1): 146-154
- Spielman R.S.,** McGinnis R.E. and Ewens W.J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 506-516
- Spielman R.S.** and Ewens W.J. (1996). The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am. J. Hum. Genet.* **59**: 983-989
- Spitz E.,** Gelfand E.W., Sheffer A.L. and Austin K.F. (1972). Serum IgE in clinical immunology and allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **49**: 337
- Stanciu L.A.,** Roberts K., Papadopoulos N.G., Cho S.-H., Holgate S.T. et al. (2005). IL-4 increases type 2, but not type 1, cytokine production in CD8⁺T cells from mild atopic asthmatics. *Respir. Res.* **6**:67
- Stirling R.G.** and Chung K.F. (2000). New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. *Eur. Respir. J.* **16**: 1158-1174
- Stütz A.M.** and Woisetschlager M. (1999). Functional synergism of STAT6 with either NF- κ B or PU.1 to mediate IL-4-induced activation of IgE germline gene transcription. *J. Immunol.* **163**: 4383-4391
- Sur S.,** Gleich G.J., Swanson M.C., Bartemes K.R. and Broide D.H. (1995). Eosinophilic inflammation is associated with elevation of interleukin-5 in the airways of patients with spontaneous symptomatic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **96**: 661-668
- Svaren J.,** Severson B.R., Apel E.D., Zimonjic D.B., Popescu N.C. et al. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol. Cell Biol.* **16**: 3545-3553
- Svaren J.,** Apel E.D., Simburger K.S., Jenkins N.A., Gilbert D.J. et al. (1997). The *NAB2* and *STAT6* genes share a common transcription termination region. *Genomics* **41**: 33-39
- Takeda K.,** Kamanaka M., Tanaka T., Kishimoto T. and Akira S. (1996). Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in *STAT6*-deficient mice. *J. Immunol.* **157**: 3220-3222
- Takeda K.** and Akira S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Elsevier. Cytokine & Growth Factor Reviews* **11**: 199-207
- Tamura K.,** Arakawa H., Suzuki M., Kobayashi Y., Mochizuki H. et al. (2001). Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the *STAT6* gene is associated with allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* **31**: 1509-1514

- Tamura K.**, Suzuki M., Arakawa H., Tokuyama K. and Morikawa A. (2003). Linkage and association studies of *STAT6* gene polymorphisms and allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **131**: 33-38
- Taube Ch.**, Miyahara N., Ott V., Swanson B., Takeda K. et al. (2006). The leukotriene B4 receptor (BLT1) is required for effector CD8⁺ T cell-mediated, mast cell-dependent airway hyperresponsiveness. *J. Immunol.* **176**: 3157-3164
- Tergaonkar V.** (2006). NFκB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38(10)**: 1647-1653
- Thunnissen M.M.G.M.**, Nordlung P. and Haeggström J.Z. (2001). Crystal structure of human leukotriene A₄ hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struct. Biol.* **8(2)**: 131-135
- Tinnell S.B.**, Jacobs-Helber S.M., Sterneck E., Sawyer S.T. and Conrad D.H. (1998). STAT6, NF-κB and C/EBP in CD23 expression and IgE production. *Int. Immunol.* **10(10)**: 1529-1538
- Travers A.A. and Klug A.** (1990). In Cozzarelli N.R., Wang J.C., eds. DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Ukena D.** und Sybrecht G.W. (1999). Kapitel: "Pneumologie". In "TIM – Thiemes Innere Medizin". Thieme Verlag
- Ulbrecht M.**, Hergeth M.T., Wjst M., Heinrich J., Bickeböller H. et al. (2000). Association of β₂-adrenoreceptor variants with bronchial hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168(2)**: 469-474
- van Eerdewegh P.**, Little R. D., Dupuis J., del Mastro R.G., Falls K. et al. (2002). Association of the *ADAM33* gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* **418**: 426-430
- Venter J.C.**, Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351
- Vignola A.M.**, Merendino A.M., Chiappara G., Chanez P., Pace E. et al. (1997). Markers of acute airway inflammation. *Monaldi. Arch. Chest Dis.* **52**: 83-85
- Vignola A.M.**, Mirabella F., Costanzo G., Di Giorgi R., Gjomarkaj M. et al. (2003). Airway remodeling in asthma. *Chest* **123(3) Suppl.**: 417S-422S
- von Mutius E.**, Fritsch C., Weiland S.K., Roll G. and Magnussen H. (1992). Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* **1992**: 1395-1399
- von Mutius E.**, Martinez F.D., Fritsch C., Nicolai T., Roell G. et al. (1994). Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149 (2 Pt 1)**: 358-364
- von Mutiues E.** (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis - the epidemiological evidence. *Immunobiology* **212(6)**: 433-439

- Wahn U.** und Wahn V. (2000). Kapitel: "Erkrankungen des Immunsystems". In "Kinderheilkunde". Ed. Prof. Dr. med. Berthold Koletzko. Springer Verlag. Berlin. S. 289-318
- Walker C.,** Kaegi M.K., Braun P. and Blaser K. (1991). Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88**: 935-942
- Wang B.,** Ren J., Ooi L.L., Chong S.S. and Lee C.G (2005). Dinucleotide repeats negatively modulate the promoter activity of Cyr61 and is instable in hepatocellular carcinoma patients. *Oncogene* **24(24)**: 3999-4008
- Warke T.J.,** Fitch P.S., Brown V., Taylor R., Lyons J.D.M. et al. (2002). Exhaled nitric oxide correlates with airway eosinophils in childhood asthma. *Thorax* **57(5)**: 383-387
- Wassmer G.,** Jorres R.A., Heinrich J., Wjst M., Reitmeier P. et al. (1997). The association between baseline lung function and bronchial responsiveness to methacholine. *Eur. J. Med. Res.* **2**: 47-54
- Wechsler M.E.,** Grasemann H., Deykin A., Silverman E.K., Yandava C.N. et al. (2000). Exhaled nitric oxide in patients with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**: 2043-2047
- Weidinger S.,** Klopp N., Wagenpfeil S., Rümmler L., Schedel M. et al. (2004). Association of a *STAT6* haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. *J. Med. Genet.* **41**:658-663
- Wichmann H.E.** (1996). Possible explanation for the different trends of asthma and allergy in east and west Germany. *Clin. Exp. Allergy* **26**: 621-623
- Wichmann H.E.,** Gieger C. and Illig T., for the KORA Study Group (2005). KORA-gen - Resource for population genetics, controls and a broad spectrum of disease phenotypes. *Gesundheitswesen* **67**: S26-S30
- Whittaker P.A.** (2003). Genes for asthma: much ado about nothing? *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**: 212-219
- Wilkinson J.,** Grimley S., Collins A., Thomas N.S., Holgate S.T. et al. (1998). Linkage of asthma to markers on chromosome 12 in a sample of 240 families using quantitative phenotype scores. *Genomics* **53**: 251-259
- Wills-Karp M.** and Ewart S.L. (2004). Time to draw breath: Asthma-susceptibility genes are identified. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 376-387
- Wjst M.** and Wichmann H.E. (1995). Collaborative study on the genetics of asthma in Germany. *Clin. Exp. Allergy* **25 (Suppl. 2)**: 23-25
- Wjst M.,** Wassmer G. and Seuchter S. (1997). Genes for asthma? An analysis of the European Community Respiratory Health Survey. The European Community Respiratory Health Survey Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**: 1773-1780

- Wjst M.**, Fischer G., Immervoll T., Jung M., Saar K. et al. (1999a). A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* **58**: 1-8
- Wjst M.** (1999b). Genetik von Asthma. Habilitationsschrift
- Wong B.**, Chen S., Kwon J.A. and Rich A. (2007). Characterization of Z-DNA as a nucleosome-boundary element in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(7): 2229-2234.
- Xu W.**, Gorman P., Sheer D., Bates G., Kishimoto J. et al. (1993). Regional localization of the gene encoding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2-24.31 by fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **64**: 62-63
- Yabiku K.**, Hayashi M., Komiya I., Yamada T., Kinjo Y. et al. (2007). Polymorphisms of interleukin (IL)-4 receptor alpha and signal transducer and activator of transcription-6 (Stat6) are associated with increased IL-4Ra-Stat6 signalling in lymphocytes and elevated serum IgE in patients with Graves' disease. *Clin. Exp. Immunology* **148**: 425-431
- Yamashita N.**, Tashimo H., Ishida H., Matsuo Y., Arai H. et al. (2005). Role of insulin-like growth factor-1 in allergen-induced airway inflammation and remodeling. *Cell Immunol.* **235**(2): 85-91
- Zaitzu M.**, Hamasaki Y., Matsuo M., Kukita A., Tsuji K. et al. (2000). New induction of leukotriene A₄ hydrolase by interleukin-4 and interleukin-13 in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **96**(2): 601-609
- Zaitzu M.**, Hamasaki Y., Matsuo M., Ichimaru T., Fujita I. et al. (2003). Leukotriene synthesis is increased by transcriptional up-regulation of 5-lipoxygenase, leukotriene A₄ hydrolase, and leukotriene C₄ synthase in asthmatic children. *J. Asthma* **40**(2): 147-154
- Zamel N.** (1995). In search of the genes of asthma on the island of Tristan da Cunha. *Can. Respir. J.* **2**: 18-22
- Zamel N.**, McClean P.A., Sandell P.R., Siminovitch K.A. and Slutsky A.S. (1996). Asthma on Tristan da Cunha: Looking for the Genetic Link. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**: 1902-1906
- Zhang Y.**, Lefort J., Kearsey V., Lapa e Silva J.R., Cookson W.O.C.M. et al. (1999). A genome-wide screen for asthma-associated quantitative trait loci in a mouse model of allergic asthma. *Hum. Mol. Genet.* **8**(4): 601-695
- Zhang Y.**, Leaves N. I., Anderson G.G., Ponting C.P., Broxholme J. et al. (2003). Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 12q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma. *Nat. Genet.* **34**(2): 181-186
- Zhou X.**, Jiang Y., Lu L., Ding Q., Jiao Z. et al. (2007). MHC class II transactivator represses human IL-4 gene transcription by interruption of promoter binding with CBP/p300, STAT6 and NFAT1 via histone hypoacetylation. *Immunology* **122**(4): 476-485
- Zubiaga A.M.**, Belasco J.G. and Greenberg M.E. (1995). The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol. Cell Biol.* **15**: 2219-2230

6. Abkürzungsverzeichnis

APC	antigen-presenting cell
BAL	bronchoalveolare Lavage
BHR	bronchiale Hyperreaktivität
bp	Basenpaar(e)
cM	centi-Morgan
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	double-stranded DNA
ECRHS	European Community Respiratory Health Survey
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EM-Algorithmus	Expectation-Maximization-Algorithmus
FEV ₁	forced expiratory volume in 1 second
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
hME-Methode	homogeneous MassEXTEND TM -Methode
HPLC	High-Performance Liquid Chromatographie
HPSF	High Purity Salt Free
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IFN γ	Interferon gamma
<i>IFNγ</i>	Interferon gamma, Gensymbol
IgE	Immunglobulin E
IGF1	Insulin-like growth factor 1
<i>IGF1</i>	Insulin-like growth factor 1, Gensymbol
IgG2a	Immunglobulin G2a
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobase(n)
LD	Linkage Disequilibrium
LDI	laser desorption/ionization
LTA4	Leukotrien A4
LTA4H	Leukotrien A4 Hydrolase
<i>LTA4H</i>	Leukotrien A4 Hydrolase, Gensymbol

LTB4	Leukotrien B4
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MBP	major basic protein
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NAB2	NGF1 A-binding protein 2
<i>NAB2</i>	NGF1 A-binding protein 2, Gensymbol
NFY β	nuclear factor Y, β -Untereinheit
<i>NFYβ</i>	nuclear factor Y, β -Untereinheit, Gensymbol
NOS1	neuronal nitric oxide synthase
<i>NOS1</i>	neuronal nitric oxide synthase, Gensymbol
PAF	platelet-activating factor
PCR	polymerase chain-reaction
PEF	peak expiratory flow
PROBE	primer oligo base extension
QTDt	quantitativer Transmission-Disequilibrium-Test
RAST	radioallergosorbent assay
RC-TDT	Reconstruction-Combined Transmission-Disequilibrium-Test
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SCF	stem cell factor
<i>SCF</i>	stem cell factor, Gensymbol
SPT	Skin-Prick-Test
ssDNA	single-stranded DNA
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
<i>STAT6</i>	signal transducer and activator of transcription 6, Gensymbol
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TDT	Transmission-Disequilibrium-Test
3'UTR	3' untranslatierte Region
5'UTR	5' untranslatierte Region

7. Eigene Veröffentlichungen

Veröffentlichungen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

Dütsch G., Illig T., Loesgen S., Rohde K., Klopp N., Herbon N., Gohlke H., Altmueller J. and Wjst, M. (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

Veröffentlichungen, die Ergebnisse dieser Arbeit enthalten:

Immervoll T., Loesgen S., **Dütsch G.**, Gohlke H. Herbon N., Klugbauer S., Dempfle A., Bickeböller H., Becker-Follmann J., Rüschendorf F., Saar K., Reis A., Wichmann H.E. and Wjst M. (2001). Fine mapping and single nucleotide polymorphism association results of candidate genes for asthma and related phenotypes. *Hum. Mutat.* **18(4)**: 327-336

Weitere Veröffentlichungen:

Herbon N., Werner M., Braig C., Gohlke H., **Dütsch G.**, Illig T., Altmüller J., Hampe J., Lantermann A., Schreiber S., Bonifacio E., Ziegler A., Schwab S., Wildenauer D., van den Boom D., Braun A., Knapp M., Reitmeier P. and Wjst M. (2003). High-resolution SNP scan of chromosome 6p21 in pooled samples from patients with complex diseases. *Genomics* **81(5)**: 510-518

8. Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Dr. H.-Erich Wichmann** danke ich für die freundliche Vergabe des Themas, die Bereitstellung der KORA S4-Studie sowie der Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit an seinem Institut am Helmholtz-Zentrum München.

Herrn **PD Dr. Matthias Wjst** danke ich für die Bereitstellung der Asthma-Familienstudie und seine wertvollen Tipps bei der Anfertigung meiner Erstautoren-Publikation.

Herrn **PD Dr. Thomas Illig** danke ich für die Betreuung der Arbeit, seine fachliche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas sowie seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Herrn **Prof. Dr. Stephan Schneuwly** danke ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit seitens der Universität Regensburg.

Herrn **Guido Fischer** danke ich für die Hilfe bei der computergestützten Administration unzähliger Studien- sowie Genotypisierungsdaten.

Frau **Diplom-Statistikerin Sabine Loesgen** danke ich für die Durchführung der statistischen Berechnungen für die Einzelanalysen (RC-TDT und QTDT) sowie die geduldige Beantwortung unzähliger Fragen bezüglich der Interpretation der Ergebnisse.

Herrn **Dr. Klaus Rohde** danke ich für die Durchführung der Haplotypenanalysen sowie der Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Frau **Prof. Dr. Heike Bickeböller** danke ich für die Einführung in die genetische Epidemiologie sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn **Utz Linzner** danke ich für die Synthese unzähliger Oligonukleotide.

Frau **Bettina Wunderlich** danke ich für ihre Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Allen ehemaligen **Mitgliedern der damaligen Arbeitsgruppe** danke ich für das angenehme und teilweise lustige Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank geht an Frau **Dr. Caren Vollmert** und Herrn **Dr. Henning Gohlke** für das Korrekturlesen der Arbeit, ihre Anregungen hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse, ihre ständige Diskussionsbereitschaft, unzählige Biergartenbesuche und ihre freundschaftliche und ermutigende Unterstützung in der bisher schwersten Zeit meines Lebens.

Von Herzen danke ich meiner Mutter **Erika Dütsch** mit **Adalbert** und der **Familie Gloeckner** für ihre finanzielle Unterstützung, ihre ständigen Ermunterungen und die liebevolle Versorgung, insbesondere während der Phase des Zusammenschreibens. An dieser Stelle möchte ich mich speziell bei Herrn **Dr. Reiner-Joachim Gloeckner** für seine medizinische Betreuung sowie ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Danken möchte ich auch allen **Freunden** und **Vierbeinern**, die mich in den letzten Jahren begleitet haben, insbesondere meiner **Lilly**, für ihre täglichen Schmuseeinheiten und beruhigenden Schnurrtiraden, sowie **Jessica Gohlke**, **Jana Lang**, **Irina Werth-Beck mit Mecki** und Frau **Dr. Nicole Barth**.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meinen Verlobten Herrn **Dr. Christian Johannes Gloeckner** für seine fachliche Unterstützung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die Hilfe bei Computerfragen und seine Bereitschaft in allen Lebenslagen zu mir zu stehen und mich mit Rat und Tat zu unterstützen.

9. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Gabriele Dütsch

München, 09. Februar 2009

10. Anhang

10.1 *NOS1*-Primer

10.1.1 PCR-Primer

SNP	PCR-Primer	Richtung	Annealing-Temperatur in °C	Länge des PCR-Produkts in bp
<i>NOS1</i> Ex18SNP1	5'-GTTCTCAGTTTTTGGCCTCG-3' 5'-TTACCTTGAAGACCTTCTTGGC-3'	forward reverse	53°C	179 bp
<i>NOS1</i> Ex29SNP1	5'-GGGTTTACTCCTTGAGTTTTCC-3' 5'-TGTGCCTAGTTCCTGCAGC-3'	forward reverse	53°C	196 bp

10.1.2 Sequenzierprimer

SNP	Sequenzierprimer
<i>NOS1</i> Ex18SNP1	5'-TTACCTTGAAGACCTTCTTGGC-3'
<i>NOS1</i> Ex29SNP1	5'-GGGTTTACTCCTTGAGTTTTCC-3'

10.2 *STAT6*-Primer

10.2.1 PCR-Primer für die Suche nach Polymorphismen

Genregion	PCR-Primer	Richtung	Annealing- Temperatur in °C	Länge des PCR- Produkts in bp
<i>STAT6</i> Promotorregion Teil 1	5'-GTAGAGACGGGGCTTCACC-3' 5'-GTATGCAAGTCAGTCTCCAAGTTTC-3'	forward reverse	64°C	529 bp
<i>STAT6</i> Promotorregion Teil 2	5'-CTAATGCAATATGACTGGTATCCTTG-3' 5'-CAGGAGGCTGAGGCAGGG-3'	forward reverse	61°C	510 bp
<i>STAT6</i> Promotorregion Teil 3	5'-GGAGTGCAGTGGCTTGATCTC-3' 5'-GTGATCTCTGACTTTGGCTCC-3'	forward reverse	60°C	660 bp
<i>STAT6</i> Promotorregion Teil 4	5'-GCCAGATTTGCCTCTAAATTCTG-3' 5'-CTGAAGGCTTAGAACAAATGCC-3'	forward reverse	58°C	600 bp
<i>STAT6</i> Promotorregion Teil 5	5'-CTATGTAGGATGGAGACCCTTCTCC-3' 5'-GAGAGGCCTTTACTCCCGGAC-3'	forward reverse	64°C	548 bp
<i>STAT6</i> Promotorregion Teil 6	5'-CAGACACCACCTCTTCCACACAC-3' 5'-CGTGACCACTGACGGGAGG-3'	forward reverse	64°C	568 bp
<i>STAT6</i> Promotorregion Teil 7	5'-CCAGAATTCTGAGCTGAGGGTTC-3' 5'-CAGTGTAAGCAGTGGCTGCC-3'	forward reverse	64°C	564 bp
<i>STAT6</i> Exon 1	5'-GTCAGAGCTCCAGGGAGGGAC-3' 5'-GAATCCACCCCCATGCACTC-3'	forward reverse	56°C	347 bp
<i>STAT6</i> Exon 2	5'-CAGGAGGCTGGTCACTCTGC-3' 5'-GAGAGGTCCCTTCTCTGGACG-3'	forward reverse	56°C	220 bp
<i>STAT6</i> Exon 3	5'-CAGGAGATAGGCCAAGTTTC-3' 5'-CACATGGAATAACAGGTCTCAAG-3'	forward reverse	56°C	314 bp
<i>STAT6</i> Exon 4	5'-GAATGCTGACTTTTGGCTGTG-3' 5'-CCCAATGCTCAACCCAGTTC-3'	forward reverse	56°C	286 bp
<i>STAT6</i> Exon 5	5'-GATTGAAGGACATGGGTAAGAG-3' 5'-CTAGTTTGTCTATGGCTCAGG-3'	forward reverse	56°C	210 bp
<i>STAT6</i> Exon 6	5'-CAGAGCAGAGAGTGGAGGCC-3' 5'-GATAAGGTTGAGATCCAAGAGGC-3'	forward reverse	56°C	280 bp
<i>STAT6</i> Exon 7	5'-GCCTCTTGATCTCAACCTTATC-3' 5'-CTGAGGTCTAGCTTCCATCCC-3'	forward reverse	56°C	193 bp
<i>STAT6</i> Exon 8	5'-GACCGTATCCCAGGAGCTGG-3' 5'-CCTGTAGGGCCTTCAGCAGG-3'	forward reverse	56°C	290 bp

<i>Genregion</i>	PCR-Primer	Richtung	Annealing- Temperatur in °C	Länge des PCR- Produkts in bp
STAT6 Exon 9	5'-GAGCAAGCAGCCTTAATCCTG-3' 5'-CGAGGTCTGTTCTAGGCCAGAC-3'	forward reverse	60°C	223 bp
STAT6 Exon 10	5'-CTAGAGCTGTGGGGAGGGC-3' 5'-CCAGGCTGCCTCCATCAC-3'	forward reverse	56°C	318 bp
STAT6 Exon 11	5'-CATGCACTCGCCACACCTG-3' 5'-CGAGGTCTGTTCTAGGCCAGAC-3'	forward reverse	56°C	219 bp
STAT6 Exon 12	5'-GCGGTCTCTGTCCTCATGACC-3' 5'-GACTCGGGGTCCCAGATTG-3'	forward reverse	56°C	218 bp
STAT6 Exon 13	5'-GGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAC-3' 5'-CACTGCCCATGTTAGAACC-3'	forward reverse	56°C	200 bp
STAT6 Exon 14	5'-ACTGTGGAGAATCCAGTGGAAG-3' 5'-GCATGTTTGTGAGCGATATCAG-3'	forward reverse	58°C	441 bp
STAT6 Exon 15	5'-CACTGCCTGCCCTAAACAGG-3' 5'-GGCATGGGCAGTGAGTATGG-3'	forward reverse	60°C	232 bp
STAT6 Exon 16	5'-GAGCAGCCATACACCAGTCAC-3' 5'-GGTCAGGACATTTCAATCCCAG-3'	forward reverse	56°C	283 bp
STAT6 Exon 17	5'-CTTATGGTAGGGGTTGGGGAAG-3' 5'-GACCAAGGGTTGATGCCACC-3'	forward reverse	56°C	591 bp
STAT6 Exon 18	5'-CTTATGGTAGGGGTTGGGGAAG-3' 5'-GACCAAGGGTTGATGCCACC-3'	forward reverse	56°C	591 bp
STAT6 Exon 19	5'-GCTTATCTGCAGGAAGGAGG-3' 5'-AGCTGCCCATGCTAAGATTAG-3'	forward reverse	56°C	247 bp
STAT6 Exon 20	5'-CACCTGTTCAAAGCAGGGTG-3' 5'-CTCCTTTCTACAGAAGAGCCTC-3'	forward reverse	56°C	255 bp
STAT6 Exon 21	5'-CTTTGCACCACTCTGCATTTG-3' 5'-CCAGCAATGGAAATAAGGAGAG-3'	forward reverse	56°C	208 bp
STAT6 Exon 22	5'-CCTGCCCTTTGACCAGCC-3' 5'-CTGTTCACTGGGAGGCAGC-3'	forward reverse	57°C	379 bp
STAT6 Exon 23 Teil 1	5'-CCTCAGGGCACTTGGTGAG-3' 5'-GCTTGGCAGGGCATGAG-3'	forward reverse	54°C	378 bp
STAT6 Exon 23 Teil 2	5'-CCACTATGGGCAATCTGGGATC-3' 5'-GGAATTTGGGGCTTTGGGAG-3'	forward reverse	61°C	658 bp
STAT6 Exon 23 Teil 3	5'-GAGGATATTGGGTCTCAGCCC-3' 5'-CAGAGAGGCCAGCACACTTG-3'	forward reverse	60°C	379 bp

Genregion	PCR-Primer	Richtung	Annealing- Temperatur in °C	Länge des PCR- Produkts in bp
STAT6 Exon 23 Teil 4	5'-TGCACAGAAGACAGCAGCAAGTGTG-3' 5'-AAAAGATGCAGCAGGCAGGGCC-3'	forward reverse	66°C	224 bp

10.2.2 Sequenzierprimer

Genregion	Sequenzierprimer	Richtung
STAT6 Promotorregion Teil 1	5'-GTATGCAAGTCAGTCTCCAAGTTTC-3'	reverse
STAT6 Promotorregion Teil 2	5'-CTAATGCAATATGACTGGTATCCTTG-3'	forward
STAT6 Promotorregion Teil 3	5'-GGAGTGCAAGTGGCTTGATCTC-3'	forward
STAT6 Promotorregion Teil 4	5'-GCCAGATTTGCCTCTAAATTCTG-3'	forward
STAT6 Promotorregion Teil 5	5'-CTATGTAGGATGGAGACCCTTCTCC-3'	forward
STAT6 Promotorregion Teil 6	5'-CAGACACCACCTCTCCACACAC-3'	forward
STAT6 Promotorregion Teil 7	5'-CAGTGTAAGCAGTGGCTGCC-3'	reverse
STAT6 Exon 1	5'-GTCAGAGCTCCAGGGAGGGAC-3'	forward
STAT6 Exon 2	5'-CAGGAGGCTGGTCACTCTGC-3'	forward
STAT6 Exon 3	5'-GCCAAGTTTCTTTGGGCAC-3'	forward
STAT6 Exon 4	5'-GAATGCTGACTTTTGGCTGTG-3'	forward
STAT6 Exon 5	5'-GATTGAAGGACATGGGTAAGAG-3'	forward
STAT6 Exon 6	5'-CAGAGCAGAGAGTGGAGGCC-3'	forward
STAT6 Exon 7	5'-GCCTCTTGGATCTCAACCTTATC-3'	forward
STAT6 Exon 8	5'-GACCGTATCCCAGGAGCTGG-3'	forward

Genregion	Sequenzierprimer	Richtung
STAT6 Exon 9	5'-GAGCAAGCAGCCTTAATCCTG-3'	forward
STAT6 Exon 10	5'-CTAGAGCTGTGGGGAGGGC-3'	forward
STAT6 Exon 11	5'-CATGCACTCGCCACACCTG-3'	forward
STAT6 Exon 12	5'-GCGGTCTCTGTCCTCATGACC-3'	forward
STAT6 Exon 13	5'-CACTGCCCATGTTAGAACC-3'	reverse
STAT6 Exon 14	5'-ACTGTGGAGAATCCAGTGGAAG-3'	forward
STAT6 Exon 15	5'-CACTGCCTGCCCTAAACAGG-3'	forward
STAT6 Exon 16	5'-GAGCAGCCATACACCAGTCAC-3'	forward
STAT6 Exon 17	5'-CTTATGGTAGGGGTTGGGAAG-3'	forward
STAT6 Exon 18	5'-GCAATCCATGGCAGTCTTTTC-3'	forward
STAT6 Exon 19	5'-GCTTATCTGCAGGAAGGAGG-3'	forward
STAT6 Exon 20	5'-CACCTGTTCAAAAGCAGGGTG-3'	forward
STAT6 Exon 21	5'-CCAGCAATGGAAATAAGGAGAG-3'	reverse
STAT6 Exon 22	5'-GACCAGCCTCACCCCCAG-3'	forward
STAT6 Exon 23 Teil 1	5'-CCTCAGGGCACTTGGTGAG-3'	forward
STAT6 Exon 23 Teil 2	5'-CCACTATGGGCAATCTGGGATC-3'	forward
STAT6 Exon 23 Teil 3	5'-CAGAGAGGCCAGCACACTTG-3'	reverse
STAT6 Exon 23 Teil 4	5'-TGCACAGAAGACAGCAGCAAGTGTG-3'	forward

10.2.3 Primer für die Analyse des GT-Repeats

10.2.3.1 PCR-Primer

PCR-Primer	Richtung	Annealing-Temperatur in °C	Länge des PCR-Produkts
5'-Fam6-GAGGGACCTGGGTAGAAGGA-3' 5'-CACCCCCATGCACTCATAG-3'	forward reverse	58°C	326 bp - 334 bp

10.2.3.2 Sequenzierprimer

Sequenzierprimer	Richtung
5'-GAGGGACCTGGGTAGAAGGA-3'	forward

10.3 MALDI-TOF-Primer

10.3.1 PCR-Primer für die PROBE™-Reaktion

SNP	MALDI-TOF PCR-Primer	Richtung	Annealing- Temperatur in °C	Länge des PCR- Produkts in bp
<i>IGF1</i> In3SNP1	5'-ATTGGTACCCCTTAGACTGC-3' 5'-bio-AAGCTTTCCCACAGCTAGTG-3'	forward reverse	54°C	85 bp
<i>IGF1</i> In3SNP2	5'-bio-TCCTAATCCTACCATACCTC-3' 5'-TTTCAGGAGTGGGAGAGTTC-3'	forward reverse	54°C	105 bp
<i>IGF1</i> In3SNP3	5'-bio-TTAGAGCAAATGAGCGGCTG-3' 5'-CTTGTTTGGCACCATCCAAC-3'	forward reverse	54°C	86 bp
<i>IGF1</i> In3SNP4	5'-bio-GCTTCAAGCCTAGTAGTGTG-3' 5'-CTCTTAGCCTTCTATCTGGC-3'	forward reverse	56°C	84 bp
<i>IGF1</i> In5SNP1	5'-bio-AGAAGAAAGAGCAGAGGAGG-3' 5'-CCTCCTGTCCTTCATTTTCC-3'	forward reverse	56°C	79 bp
<i>IGF1</i> In5SNP2	5'-bio-AAAGGAACCTCCTTTCTGCC-3' 5'-TCCTGGGTTTTCTAGTGAACC-3'	forward reverse	54°C	92 bp
<i>IGF1</i> In5SNP3	5'-GCAGCCACATAAACAAGGAG-3' 5'-bio-ACTCAGCACTTTGGGATGTG-3'	forward reverse	54°C	84 bp
<i>IGF1</i> In5SNP4	5'-AGGAGGATTGTGTAAGCCTG-3' 5'-bio-GACAGGGTCTCACTCTGTTG-3'	forward reverse	56°C	92 bp
<i>IGF1</i> In5SNP5	5'-bio-CTCAGCCCAGTATGTCTATG-3' 5'-AGAGCAAGGCAGAGTTTCAG-3'	forward reverse	54°C	87 bp
<i>IGF1</i> In5SNP6	5'-bio-GCCTTGCTCTAGAGGAAAAC-3' 5'-TCTGGATTCATCCTCTGTTG-3'	forward reverse	56°C	107 bp
<i>IGF1</i> In5SNP7	5'-GGGTACATAGAAGATGCCTG-3' 5'-bio-TTGGTTTTCTGAGAAGGGC-3'	forward reverse	56°C	84 bp
<i>LTA4H</i> In3SNP1	5'-bio-CCAAAGTTGGCAAGAAATG-3' 5'-CCACCATTGCTGCCAATAAG-3'	forward reverse	56°C	89 bp
<i>LTA4H</i> In6SNP1	5'-bio-CATCTGACAGGATTTCTTC-3' 5'-ATTACAGGCATGAGCCACAG-3'	forward reverse	56°C	140 bp
<i>LTA4H</i> Ex19SNP1	5'-bio-ATGATCAAGCTGTCCGAACC-3' 5'-TTAAGTCTTTCCCCACCAGC-3'	forward reverse	56°C	81 bp
<i>LTA4H</i> Ex19SNP2	5'-TAAAGACCTGCGTATTGATG-3' 5'-bio-AGCCAAAATAAAAAGACAG-3'	forward reverse	56°C	108 bp

SNP	MALDI-TOF PCR-Primer	Richtung	Annealing- Temperatur in °C	Länge des PCR- Produkts in bp
<i>NAB2</i> In2SNP1	5'-TTCAGCTCCTTGCTCACTCAG-3' 5'-bio-TTTCTGAGGTGGGAAGACAG-3'	forward reverse	56°C	98 bp
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	5'-AATTCTGACTCTCCTGGCTG-3' 5'-bio-AAGAGAAGAGCTCCACTCTC-3'	forward reverse	56°C	113 bp
<i>NAB2</i> In3SNP1	5'-ATAACACATGCCTCTGGCTG-3' 5'-bio-TAAAGTGGATGAGGCTGACG-3'	forward reverse	56°C	70 bp
<i>NAB2</i> In6SNP1	5'-ATAAGGGAAGCTCAGATGGC-3' 5'-bio-AAAGCATCACTGCTTTGGGC-3'	forward reverse	56°C	120 bp
<i>STAT6</i> 5'flankingSNP1	5'-bio-GGTGAAACCTGGCTTCACCTAC-3' 5'-GCCATGCTAGGATCAAGGTG-3'	forward reverse	56°C	121 bp
<i>STAT6</i> 5'flankingSNP2	5'-CCACAGTCCAGTCTTTTAAC-3' 5'-bio-CTGGTGCCTGAATTGATTC-3'	forward reverse	56°C	151 bp
<i>STAT6</i> In2SNP1	5'-TATTGGAGGAACCTGAGCAG-3' 5'-bio-GAAAATGGAGAGGTCCCTTC-3'	forward reverse	54°C	136 bp
<i>STAT6</i> In2SNP2	5'-bio-CTCCATCCTCTTCATCATC-3' 5'-TGCAGTGAGCAGAGATCGAG-3'	forward reverse	56°C	134 bp
<i>STAT6</i> In2SNP3	5'-bio-CATCTCAGGCATTGACTCAG-3' 5'-GAAACTTGGCCTATCTCCTG-3'	forward reverse	58°C	128 bp
<i>STAT6</i> In8SNP1	5'-bio-AGGAGGGCTTTTCCATTGG-3' 5'-TTATCAGTTGCCTACACCCC-3'	forward reverse	56°C	145 bp
<i>STAT6</i> In8SNP2	5'-GGTGTAGGCAACTGATAATG-3' 5'-bio-CAGGGAGAAAGGCTATCATG-3'	forward reverse	56°C	134 bp
<i>STAT6</i> In12SNP1	5'-TTTGAGACAGAGTCTCGCTC-3' 5'-bio-AAATTAGCCAGGCATGGTGG-3'	forward reverse	58°C	154 bp
<i>STAT6</i> In16SNP1	5'-GAGCAGCCATACACCAGTCAC-3' 5'-bio-GGTCAGGACATTTTCATCCAG-3'	forward reverse	56°C	283 bp
<i>STAT6</i> In17SNP1	5'-bio-TGGCAGCTCTGATTCCTTCC-3' 5'-ATGAAATAGGGAGTGACATCAG-3'	forward reverse	54°C	100 bp
<i>STAT6</i> In18SNP1	5'-GAACAGATGGGTAAGGATGG-3' 5'-bio-TGACTGACCAAGGGTTGATG-3'	forward reverse	61°C	150 bp
<i>STAT6</i> 3'UTRSNP1	5'-CCAATCCACTCCTTCCTTTC-3' 5'-bio-CTCAGAGAGCTCTGTATGTG-3'	forward reverse	56°C	147 bp
<i>STAT6</i> 3'UTRSNP2	5'-bio-GGATAGAGGATATTGGGTCTCAG-3' 5'-CATACACGTATCAGAAGCCTCC-3'	forward reverse	60°C	177 bp

10.3.2 Extensions-Primer

SNP	MALDI-TOF Extensions-Primer	Richtung	Stop-Mix	mögliche Extensions-Produkte
<i>IGF1</i> In3SNP1	5'-GTGTGACAGCTGGTCAAA-3'	forward	ddACT	5'-GTGTGACAGCTGGTCAAAT-3' 5'-GTGTGACAGCTGGTCAAAGT-3'
<i>IGF1</i> In3SNP2	5'-TGGGAGAGTTCCTATAG-3'	reverse	ddCGT	5'-TGGGAGAGTTCCTATAGG-3' 5'-TGGGAGAGTTCCTATAGAG-3'
<i>IGF1</i> In3SNP3	5'-AAAAGGCAAGTGAGGATAAA-3'	reverse	ddACT	5'-AAAAGGCAAGTGAGGATAAAA-3' 5'-AAAAGGCAAGTGAGGATAAAGA-3'
<i>IGF1</i> In3SNP4	5'-GCCTGAACTTCTGCATTTC-3'	reverse	ddACG	5'-GCCTGAACTTCTGCATTTC-3' 5'-GCCTGAACTTCTGCATTTC-3'
<i>IGF1</i> In5SNP1	5'-CTTTTTGCCTCTGCATTCA-3'	reverse	ddACT	5'-CTTTTTGCCTCTGCATTCA-3' 5'-CTTTTTGCCTCTGCATTGAG-3'
<i>IGF1</i> In5SNP2	5'-TGGAGTAAAAGCATGGCA-3'	reverse	ddACT	5'-TGGAGTAAAAGCATGGCAC-3' 5'-TGGAGTAAAAGCATGGCAGA-3'
<i>IGF1</i> In5SNP3	5'-GGAGTACACGTTTCTCAA-3'	forward	ddCGT	5'-GGAGTACACGTTTCTCAAAG-3' 5'-GGAGTACACGTTTCTCAAAT-3'
<i>IGF1</i> In5SNP4	5'-AGTGACCTGAGATGGCAC-3'	forward	ddACG	5'-AGTGACCTGAGATGGCAC-3' 5'-AGTGACCTGAGATGGCACTA-3'
<i>IGF1</i> In5SNP5	5'-AGTTTCAGAAATCGAAGATTA-3'	reverse	ddCGT	5'-AGTTTCAGAAATCGAAGATTAG-3' 5'-AGTTTCAGAAATCGAAGATTAAG-3'
<i>IGF1</i> In5SNP6	5'-AAAAGAGACATTTATTTTCATT-3'	reverse	ddACT	5'-AAAAGAGACATTTATTTTCATT-3' 5'-AAAAGAGACATTTATTTTCATTGT-3'
<i>IGF1</i> In5SNP7	5'-TGCCTGAGTGAGGTTTGG-3'	forward	ddACT	5'-TGCCTGAGTGAGGTTTGGC-3' 5'-TGCCTGAGTGAGGTTTGGGA-3'
<i>LTA4H</i> In3SNP1	5'-AAATTAACATTTTCATGACTCA-3'	reverse	ddAGT	5'-AAATTAACATTTTCATGACTCAT-3' 5'-AAATTAACATTTTCATGACTCACA-3'
<i>LTA4H</i> In3SNP2	5'-TGTATGCATATTTGCCTGG-3'	forward	ddACT	5'-TGTATGCATATTTGCCTGGA-3' 5'-TGTATGCATATTTGCCTGGGT-3'
<i>LTA4H</i> In3SNP3	5'-CTCCCAAATAGATTTCCTAA-3'	reverse	ddACT	5'-CTCCCAAATAGATTTCCTAA-3' 5'-CTCCCAAATAGATTTCCTAAGA-3'
<i>LTA4H</i> In6SNP1	5'-AGCCACAGAGCCAGCCT-3'	reverse	ddCGT	5'-AGCCACAGAGCCAGCCTG-3' 5'-AGCCACAGAGCCAGCCTAT-3'

SNP	MALDI-TOF Extensions-Primer	Richtung	Stop-Mix	mögliche Extensions-Produkte
<i>LTA4H</i> In11SNP1	5'-CCTTACATAGAACAGTGAAC-3'	reverse	ddACT	5'-CCTTACATAGAACAGTGAACA-3' 5'-CCTTACATAGAACAGTGAACGGT-3'
<i>LTA4H</i> Ex19SNP1	5'-TTCCCCACCAGCATTGCA-3'	reverse	ddACT	5'-TTCCCCACCAGCATTGCAC-3' 5'-TTCCCCACCAGCATTGCAGT-3'
<i>LTA4H</i> Ex19SNP2	5'-AGAAATATAAACTTCAGCTC-3'	forward	ddCGT	5'-AGAAATATAAACTTCAGCTCC-3' 5'-AGAAATATAAACTTCAGCTCAC-3'
<i>NAB2</i> In1SNP1	5'-TGTTGAGACTGCTGAGTG-3'	forward	ddCGT	5'-TGTTGAGACTGCTGAGTGT-3' 5'-TGTTGAGACTGCTGAGTGAT-3'
<i>NAB2</i> In2SNP1	5'-ACCCACAGGAGAGGAGG-3'	forward	ddCGT	5'-ACCCACAGGAGAGGAGGC-3' 5'-ACCCACAGGAGAGGAGGAG-3'
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	5'-CTGCATGAGGGACAACAC-3'	forward	ddCGT	5'-CTGCATGAGGGACAACACG-3' 5'-CTGCATGAGGGACAACACAC-3'
<i>NAB2</i> In3SNP1	5'-TGGGTTCTGTGCTCTGCC-3'	forward	ddCGT	5'-TGGGTTCTGTGCTCTGCCG-3' 5'-TGGGTTCTGTGCTCTGCCAG-3'
<i>NAB2</i> In6SNP1	5'-CAGGCTAGGAGTTGTGGG-3'	forward	ddACT	5'-CAGGCTAGGAGTTGTGGGT-3' 5'-CAGGCTAGGAGTTGTGGGA-3'
<i>NAB2</i> In6SNP2	5'-AGGGGAAGAGGGAGTGGGC-3'	forward	ddCGT	5'-AGGGGAAGAGGGAGTGGGCC-3' 5'-AGGGGAAGAGGGAGTGGGCAG-3'
<i>NAB2</i> In6SNP3	5'-CTGTCTCTGTCTGTCTCT-3'	reverse	ddACT	5'-CTGTCTCTGTCTGTCTCTC-3' 5'-CTGTCTCTGTCTGTCTCTGT-3'
<i>NAB2</i> In6SNP4	5'-GGGAGAGAAAGAGAGAGA-3'	forward	ddACT	5'-GGGAGAGAAAGAGAGAGAA-3' 5'-GGGAGAGAAAGAGAGAGAGA-3'
<i>STAT6</i> 5'flankingSNP1	5'-GTGCTTTGTATGTGCTCC-3'	reverse	ddGTP, ddTTP	5'-GTGCTTTGTATGTGCTCCT-3' 5'-GTGCTTTGTATGTGCTCCCG-3'
<i>STAT6</i> 5'flankingSNP2	5'-CACACACGTGCACTCATG-3'	forward	ddATP, ddCTP	5'-CACACACGTGCACTCATGC-3' 5'-CACACACGTGCACTCATGTA-3'
<i>STAT6</i> In2SNP1	5'-AGGTCTTGAGCAGAAAC-3'	forward	ddGTP, ddTTP	5'-AGGTCTTGAGCAGAAACG-3' 5'-AGGTCTTGAGCAGAAACAT-3'
<i>STAT6</i> In2SNP2	5'-CGACAGAGAGAGACTCTG-3'	reverse	ddTTP	5'-CGACAGAGAGAGACTCTGT-3' 5'-CGACAGAGAGAGACTCTGCT-3'
<i>STAT6</i> In2SNP3	5'-GATAGCCCTCCTAGGGAC-3'	reverse	ddCTP, ddGTP	5'-GATAGCCCTCCTAGGGACC-3' 5'-GATAGCCCTCCTAGGGACTG-3'

SNP	MALDI-TOF Extensions-Primer	Richtung	Stop-Mix	mögliche Extensions-Produkte
<i>STAT6</i> In8SNP1	5'-GTGCTTTGTGGCAAATTGG-3'	reverse	ddATP	5'-GTGCTTTGTGGCAAATTGGA-3' 5'-GTGCTTTGTGGCAAATTGGGA-3'
<i>STAT6</i> In8SNP2	5'-ATAATGAACCTCCCACCCA-3'	forward	ddATP, ddCTP	5'-ATAATGAACCTCCCACCCAC-3' 5'-ATAATGAACCTCCCACCCAGA-3'
<i>STAT6</i> In12SNP1	5'-ACTCAGGCTGGAGTGCAG-3'	forward	ddGTP, ddTTP	5'-ACTCAGGCTGGAGTGCAGT-3' 5'-ACTCAGGCTGGAGTGCAGCG-3'
<i>STAT6</i> In16SNP1	5'-CCAGGATGGTGAGGCC-3'	forward	ddCTP	5'-CCAGGATGGTGAGGCC-3' 5'-CCAGGATGGTGAGGCCAC-3'
<i>STAT6</i> In17SNP1	5'-GTGACATCAGGATGACAC-3'	reverse	ddATP, ddCTP	5'-GTGACATCAGGATGACACA-3' 5'-GTGACATCAGGATGACACGC-3'
<i>STAT6</i> In18SNP1	5'-GGGCTTAGTGCTTATCTG-3'	forward	ddATP, ddCTP	5'-GGGCTTAGTGCTTATCTGC-3' 5'-GGGCTTAGTGCTTATCTGTA-3'
<i>STAT6</i> 3'UTR SNP1	5'-GTTTCAGGCTCTGAGACAC-3'	forward	ddCTP, ddGTP	5'-GTTTCAGGCTCTGAGACACG-3' 5'-GTTTCAGGCTCTGAGACACAC-3'
<i>STAT6</i> 3'UTR SNP2	5'-GTAACCACATGTCCAGAC-3'	reverse	ddCTP	5'-GTAACCACATGTCCAGACC-3' 5'-GTAACCACATGTCCAGACTC-3'

10.3.3 PCR-Primer für die hME-Methode

SNP	MALDI-TOF PCR-Primer	Richtung	Annealing- Temperatur in °C	Länge des PCR- Produkts in bp
<i>LTA4H</i> In3SNP2	5'-ACGTTGGATGCTTACGGTTGTTCTGTATGC-3' 5'-ACGTTGGATGTGACATGGCAACACCAAAGG-3'	forward reverse	56°C	107 bp
<i>LTA4H</i> In3SNP3	5'-ACGTTGGATGGTGTGGCCATGTACCTAAC-3' 5'-ACGTTGGATGTAAGTAGGACTAGCAGAGCC-3'	forward reverse	56°C	125 bp
<i>LTA4H</i> In6SNP1	5'-ACGTTGGATGCATCTGACAGGATTCCTTC-3' 5'-ACGTTGGATGATTACAGGCATGAGCCACAG-3'	forward reverse	56°C	160 bp
<i>LTA4H</i> In11SNP1	5'-ACGTTGGATGGCTGGTATAACACTGTGTTG-3' 5'-ACGTTGGATGCTCCCTATTTAGACCAGGTC-3'	forward reverse	56°C	99 bp
<i>NAB2</i> In1SNP1	5'-ACGTTGGATGTGGGTGACTTCACTTCAGTG-3' 5'-ACGTTGGATGCTCTCCCCCAAACACAATC-3'	forward reverse	54°C	94 bp

SNP	MALDI-TOF PCR-Primer	Richtung	Annealing- Temperatur in °C	Länge des PCR- Produkts in bp
<i>NAB2</i> In2SNP1	5'-ACGTTGGATGTTTCAGCTCCTTGTCACCTCAG-3' 5'-ACGTTGGATGTTTCTGAGGTGGGAAGACAG-3'	forward reverse	56°C	118 bp
<i>NAB2</i> Ex3SNP1	5'-ACGTTGGATGAATTCTGACTCTCCTGGCTG-3' 5'-ACGTTGGATGAAGAGAAGAGCTCCACTCTC-3'	forward reverse	56°C	133 bp
<i>NAB2</i> In3SNP1	5'-ACGTTGGATGATAACACATGCCTCTGGCTG-3' 5'-ACGTTGGATGTAAAGTGGATGAGGCTGACG-3'	forward reverse	56°C	90 bp
<i>NAB2</i> In6SNP1	5'-ACGTTGGATGATAAGGGAAGCTCAGATGGC-3' 5'-ACGTTGGATGAAAGCATCACTGCTTTGGGC-3'	forward reverse	56°C	140 bp
<i>NAB2</i> In6SNP2	5'-ACGTTGGATGCCCAAAGCAGTGATGCTTTG-3' 5'-ACGTTGGATGTTGTCTGCTGCGTCACTCTC-3'	forward reverse	56°C	116 bp
<i>NAB2</i> In6SNP3	5'-ACGTTGGATGACCAGAAATTCCAGCGCAAC-3' 5'-ACGTTGGATGGTTCCATTCCCATGTGTGTG-3'	forward reverse	56°C	133 bp
<i>NAB2</i> In6SNP4	5'-ACGTTGGATGACCAGAAATTCCAGCGCAAC-3' 5'-ACGTTGGATGTCCATTCCCATGTGTGTGAG-3'	forward reverse	54°C	131 bp